

Aëromonas in oppervlaktewater in Nederland

Inleiding

Onlangs is in dit blad aandacht besteed aan het vóórkomen van *Aëromonas* in drinkwater en de betekenis van dit organisme voor de mens als ziekteverwekker [1].

Om een beter inzicht te krijgen in de kringloop van deze bacterie en de rol van drinkwater als besmettingsroute te evalueren is door het RIVM tevens onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van dit organisme in oppervlaktewater. In deze bijdrage worden de resultaten van dit

Samenvatting

Aëromonas is een vrij-levende bacterie die voorkomt in water (drink-, afval- en oppervlaktewater), voedsel (vlees, vis en melk) en bij patiënten (faeces, wondvocht en bloed). Er wordt een overzicht gegeven van onderzoek naar het vóórkomen van *Aëromonas* in oppervlaktewater. De belangrijkste oorzaken van het vóórkomen in oppervlaktewater zijn autochtone vermeerdering (10-100 cfu/ml) en lozing van rioolwatereffluent (tot maximaal 1.000 cfu/ml). De soortenverdeling van *Aëromonas* hangt duidelijk samen met de herkomst van de bacteriën. *A.hydrophila* en *A.sobria* komen vaker voor in relatief onbelaste wateren tengevolge van autochtone vermeerdering, terwijl *A.caviae* vooral voorkomt in met (on)gezuiverd rioolwater belaste wateren.



J. F. M. VERSTEEGH
Rijksinstituut voor
Volksgezondheid en
Milieuhygiëne



A. H. HAVELAAR
Rijksinstituut voor
Volksgezondheid en
Milieuhygiëne



M. DURING
Rijksinstituut voor
Volksgezondheid en
Milieuhygiëne

onderzoek besproken en waar mogelijk vergeleken met de literatuur. In aparte kaders wordt aandacht besteed aan enkele relevante eigenschappen van de bacterie en aan de gebruikte isolatie- en identificatietechnieken.

Aëromonas in oppervlaktewater

In de periode 1965-1980 is er in diverse landen veel onderzoek gedaan naar het voorkomen van *Aëromonas* in oppervlaktewater. Hieruit blijkt dat het organisme in oppervlaktewater zeer algemeen voorkomt [2, 3]. In afvalwater (10^2 - 10^7 /ml), stromend zoet water met afvalwaterlozing (1 - 10^4 /ml); zonder afvalwaterlozing (1 - 10^2 /ml), in stagnant zoet water en in zeewater komt *Aëromonas* in uiteenlopende aantallen voor. Afvalwater blijkt een belangrijke bron te zijn voor *Aëromonas* in zoet maar ook in zout oppervlaktewater.

Schubert [4] legde als eerste een verband tussen de waterkwaliteit (trofische niveaus) met zowel de aantallen als de soorten *Aëromonas*-kiemen. Het aantal kiemen neemt toe met een hoger trofisch niveau. Ook blijkt dat bij sterke afvalwaterberlasting één soort dominant is nl. *A.caviae* die ook in afvalwater het meest voorkomt. Ook in oligotroof water komt

Aëromonas voor, zij het in lagere aantallen, terwijl de soort *A.caviae* daar het minst voorkomt. Rippey & Cabelli [5] toonden in een studie met 68 meren in de Verenigde Staten een significant verband aan tussen trofisch niveau en *Aëromonas*-aantallen. De parameters totaal-fosfor, chlorofyl-*a* en de zichtdiepte vertoonden volgens een statistische analyse de meeste samenhang met de aantallen *Aëromonas*. Zij zien de *Aëromonas*-dichtheid als een veelbelovende parameter voor het definiëren van trofische niveaus. Het is een goedkope en eenvoudig te meten parameter die een hoge correlatie heeft met het trofisch niveau van het oppervlaktewater [6].

De Nederlandse situatie

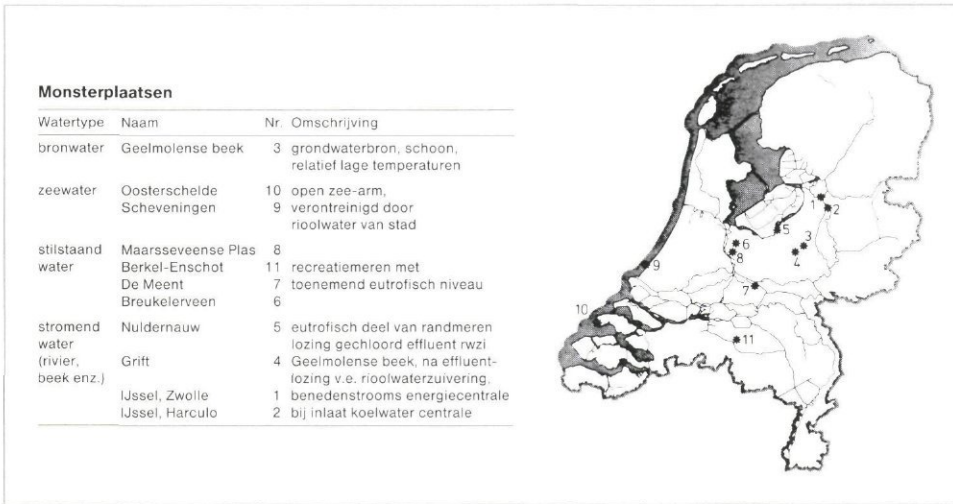
Om een inzicht te krijgen in de aanwezigheid van *Aëromonas* in het Nederlandse oppervlaktewater zijn elf monsterpunten uitgekozen (afb. 1). De monsterpunten zijn in vier groepen ingedeeld (stilstaand en stromend zoet water, zeewater en beekwater direct na de oorsprong). In 1985 werd vanaf april tot en met oktober tweemaandelijks bemonsterd (14-16 monsters per punt). De monsters werden onderzocht op *Aëromonas*-aantallen en op andere bacteriologische (*E.coli*

en heterotrofe kolonietallen) en chemisch/fysische eigenschappen (fosfaat, nitraat, zuurstof, temperatuur, chlorofyl-*a*, pH en geleidbaarheid). Deze parameters zijn zodanig gekozen dat de waterkwaliteit (trofisch niveau) en de seizoensinvloed konden worden beschreven.

Uit de zomergemiddelden (tabel I) blijkt dat de *Aëromonas*-aantallen sterk beïnvloed worden door het watertype. In beekwater werden incidenteel slechts enkele *aëromonassen* per 100 ml aangetroffen. In schoon zeewater (Oosterschelde) waren de aantallen laag, in Scheveningen daarentegen waren zowel de *E.coli* als de *Aëromonas*-aantallen veel hoger. Dit laatste kan worden toegeschreven aan de lozing van ongezuiverd afvalwater voor de kust aldaar.

In het stilstaande water van de recreatieplassen (monsterpunten 8, 11, 7 en 6) lag het aantal *aëromonassen* tussen 10 en 100 per 100 ml. Er was weinig tot geen faecale verontreiniging (lage *E.coli*-aantallen). In stromend water waarop lozing van rioolwater plaatsvond, was de dichtheid van beide bacteriegroepen het hoogst (*Aëromonas*: 500-1.000 per ml, *E.coli* groter dan 10 per ml). In het Nulder nauw was het aantal *E.coli* lager, mogelijk omdat het effluent van de rioolwaterzuiveringen

Afb. 1 - Monsterplaatsen.



in de zomerperiode werd gehoord. In tegenstelling tot *Aëromonas*, is *E.coli* niet in staat zich in dit milieu te vermeerderen.

Seizoensinvloed

De seizoensinvloed op de *Aëromonas*-aantallen tijdens de monsterperiode was veel minder duidelijk dan verwacht (tabel I, afb. 2). Er was echter weinig variatie in de watertemperatuur als gevolg van een koele zomer en vrij warm najaar. Om toch een indruk van de seizoensvariatie te krijgen is er in januari 1986 nogmaals een éénmalige bemonstering uitgevoerd. Hieruit blijkt dat in januari, alleen in stagnant zoet water op drie van de vier monsterplaatsen, de *Aëromonas*-aantallen duidelijk verlaagd waren (zie tabel I). Dit kan duiden op invloed van de watertemperatuur. Dit ondersteunt de hypothese dat in deze plassen autochtone vermeerdering de belangrijkste verklaring is voor de aanwezigheid van *Aëromonas*. *E.coli*-aantallen waren op de meeste plaatsen in de winter niet significant lager dan in de zomer, behalve in de recreatieplas De Meent. Uit afb. 2 blijkt dat in een type water waar slechts sprake is van

TABEL I – Voorkomen van *Aëromonas* en *Escherichia coli* in Nederlands oppervlaktewater in de zomer van 1985 en in januari 1986 [8].

Oppervlaktewater	Aëromonas		E.coli	
	zomer 1985 ¹	januari 1986 ²	zomer 1985 ¹	januari 1986 ²
<i>Beekwater:</i>				
Geelmolense beek	0,02	< 0,01	0,07	0,02
<i>Zeewater:</i>				
Oosterschelde	0,23	0,33	0,02	0,08
Scheveningen	10	34	1,7	5,6
<i>Stagnant zoet water:</i>				
Maarsseveense Plas	13 >>	0,17	0,05	0,03
Berkel-Enschot	15 >>	0,89	0,13	0,07
De Meent	74 >>	5,3	0,23 >>	0,03
Breukelerveense Plas	100	68	0,56	1,2
<i>Stromend zoet water:</i>				
Nuldernauw	460	210	1,2	7,9
De Grift	680	260	35	56
IJssel, Zwolle	740	850	17	30
IJssel, Harculo	1.100	360	18	20

¹ Geometrisch gemiddelde (cfu/ml) van 14-15 waarnemingen met twee-wekelijkse intervallen van april-oktober 1985.
² cfu/ml
>> significant groter dan (t-test, α = 5%)

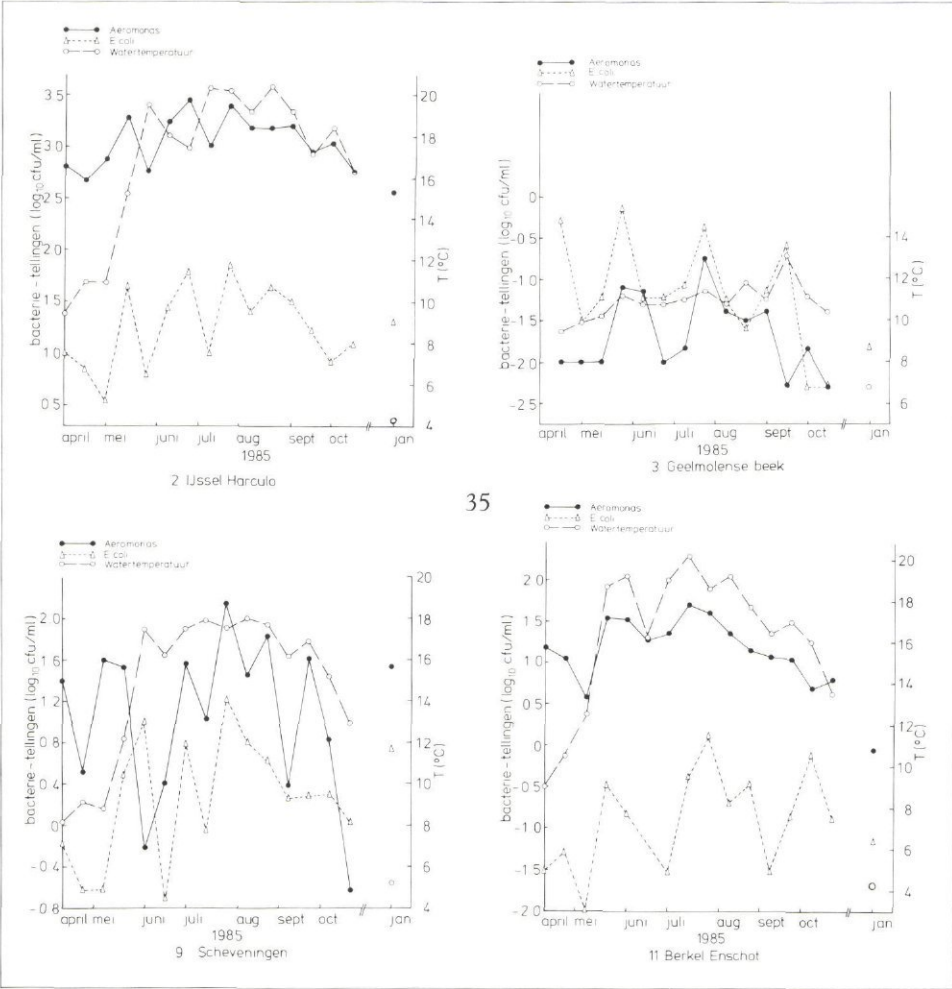
autochtone vermeerdering (Berkel-Enschot) de *Aëromonas*-aantallen afnamen wanneer de temperatuur daalde. In de IJssel werden deze aantallen nauwelijks

lager; door middel van lozingen van rioolwater (effluent) werden de bacteriën continu aangevoerd. In Scheveningen wisselden de *Aëromonas*- en *E.coli*-aantallen sterk zodat er geen parallel met de watertemperatuur was te trekken. Wisselende stromingspatronen op de monsterplaats kunnen hiervan de oorzaak zijn.

Mogelijke verklaringen

Met behulp van statistische methoden (variantie-analyse met behulp van GENSTAT) is een duidelijk en consistent verschil gevonden tussen *Aëromonas*-aantallen op de verschillende monsterplaatsen. Alleen de temperatuur en de *E.coli*-aantallen leverden een significante bijdrage aan de verschillen tussen de monsterplaatsen (van de totale variantie kan door deze twee parameters slechts 21% verklaard worden). Met de andere waterkwaliteitsparameters werd geen algemeen geldende significante relatie gevonden. In tabel II zijn een aantal van deze parameters voor de recreatieplassen weergegeven. Hieruit blijkt dat de Breukelerveense Plas aanzienlijk sterker geëutrofeerd is dan de andere plassen. De *Aëromonas*-aantallen zijn hier het hoogst, echter in De Meent zijn de aantallen niet significant verschillend hiervan. De mate van eutrofiëring in De Meent komt echter meer overeen met die in de andere twee plassen. Het is uit onderzoek in De Meent bekend dat er in de zomer door de zwimmers veel slib wordt opgewerveld waardoor het aantal bacteriën in de waterfase toeneemt [7]. Dit zou een verklaring kunnen zijn dat de aantallen in de zomer relatief hoog zijn in

Afb. 2 – Seizoensvariatie op enkele monsterplaatsen.



35

TABEL II – De relatie tussen *Aëromonas*-aantallen en enkele waterkwaliteitsparameters in de vier recreatieplassen [8].

Monsterplaats	<i>Aëromonas</i> ¹ (cfu/ml)	Totaal ² fosfor (mg/l)	Totaal ² stikstof (mg/l)	Chlorofyl (µg/l)
Maarsseveense Plas	13	0,06	0,47	7 ³
Berkel-Enschot	15	0,03	0,41	5
De Meent	74	0,04	0,57	12
Breukelerveense Plas	100	0,11	2,60	120 ⁴

¹ Geometrisch gemiddelde (cfu/ml) van 14-15 waarnemingen met twee-wekelijkse intervallen van april-oktober 1985.
² Rekenkundig gemiddelde van 14-15 waarnemingen met twee-wekelijkse intervallen van april-oktober 1985.
³ Gegevens beschikbaar gesteld door dr. B. Flik (Vakgroep Aquatische Ecologie, Universiteit van Amsterdam). Voor chlorofyl is het zomergemiddelde over 1982 vermeld, dit is over een aantal jaren constant gebleken.
⁴ Gegevens beschikbaar gesteld door dr. L. van Liere (Limnologisch Instituut, Nieuwersluis).

vergelijking met de dan heersende waterkwaliteit. Dit opgewervelde slib kan ook een verklaring zijn voor de hogere *E.coli*-aantallen in de zomer die alleen op dit monsterpunt worden aangetroffen.

Soortensamenstelling

Tijdens het onderzoek zijn per monsterpunt zesmaal (vijfmaal in de zomerperiode en eenmaal in de winterperiode) tien *Aëromonas*-kolonies op soort gedetermineerd. Uit de resultaten (afb. 3) bleek dat *A.caviae* dominant was in oppervlaktewater waarop rioolwater(effluent) werd geloosd (nr. 94, 1 en 2). In recreatieplassen was *A.sobria* dominant (nr. 8, 11, 7 en 6). In het oligotrofe water van de Geelmolense beek werd bijna alleen *A.hydrophila* aangetroffen en geen

A.caviae. Het is nog niet duidelijk op welke fysiologische eigenschappen de voorkeur van de soorten voor de verschillende typen oppervlaktewater is gebaseerd.

Discussie

Uit het beschreven onderzoek blijkt dat de aanwezigheid van *Aëromonas* in oppervlaktewater het gevolg kan zijn van twee processen te weten autochtone vermeerdering en externe besmetting via afvalwater. Wanneer er sprake is van autochtone vermeerdering dan zijn er circa 10-100 kienen/ml te verwachten en is er een verband met de watertemperatuur. Als soorten komen dan meestal *A.hydrophila* en *A.sobria* voor. In het geval van verontreiniging met riool-

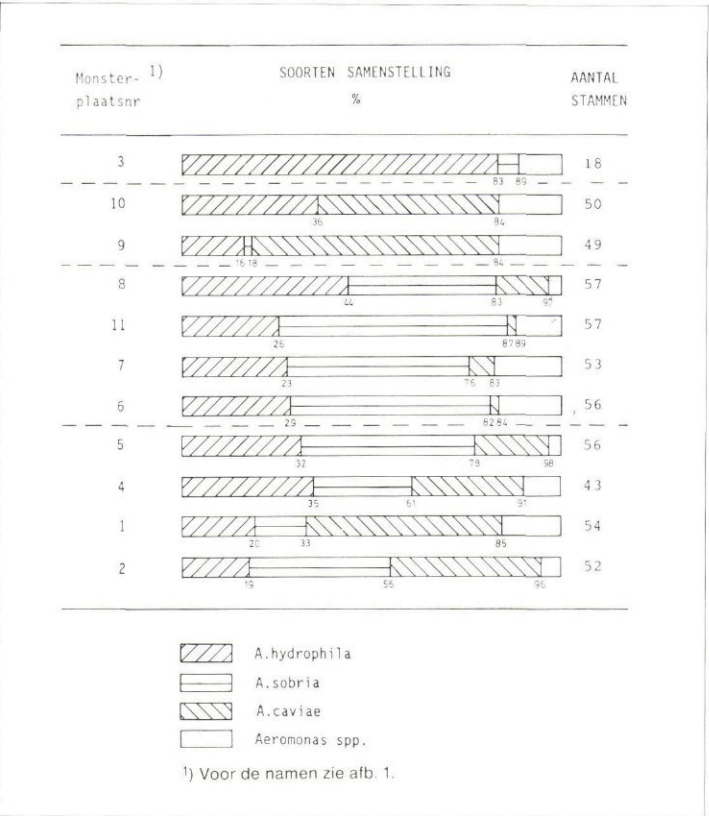
Intermezzo

Eigenschappen

Het geslacht *Aëromonas* behoort tot de familie van de *Vibrionaceae* en bestaat uit twee groepen; de onbeweeglijke psychrofiële *Aëromonas salmonicida* (een vispathogeen welke op het moment bij de Nederlandse viskwekerijen niet vaak als zodanig voorkomt, pers. med. H. J. Boon, LU Wageningen) en de beweeglijke vrij levende soorten die op veel plaatsen in het milieu worden aangetroffen. De kiem kan dan ook worden geïsoleerd uit afvalwater, oppervlaktewater, grondwater, drinkwater en voedsel maar ook uit faeces, sputum, bloed en wondvocht. De vrij levende beweeglijke soorten zijn door middel van een aantal biochemische toetsen te onderscheiden in drie soorten te weten: *A.hydrophila*, *A.sobria*, *A.caviae* [11]. De beweeglijke soorten kunnen zich vermeerderen in het temperatuurgebied tussen 0 en 41 °C met een optimum bij 28 °C. Het pH-gebied waarbinnen groei mogelijk is ligt tussen 5,5 en 9,0 [11]. *Aëromonas*, met name *A.hydrophila* kan zich vermeerderen bij zeer lage substraatconcentraties in water [12]. Uit bovenstaande is af te leiden dat de kiem op veel plaatsen en in verschillende regio's op de wereld kan voorkomen.

Isolatie- en identificatiemethoden

In een vergelijkend onderzoek naar de recovery van zeven in de literatuur beschreven selectieve media waren de resultaten voor twee media (mA-agar en dextrine-fuchsine-sulfiet agar) voldoende, echter de selectiviteit van beide media was onvoldoende [13]. De positieve punten van deze twee media, te weten de specifieke koolstofbron dextrine en het selectieve antibioticum ampicilline in het basismedium mA werden samengevoegd tot Ampicilline-Dextrine-Agar (ADA). Broomthymolblauw is als pH-indicator gebruikt, waardoor gele kolonies op een blauwe voedingsbodem worden gevormd. De optimale concentratie van het antibioticum ampicilline is 10 mg/l medium; de optimale incubatietijd is 24 uur bij 30 °C onder aërobe condities. Onderzoek naar de specificiteit toonde aan dat in het algemeen meer dan 90% van de gele kolonies tot het geslacht *Aëromonas* behoorden, vals negatieven werden niet gevonden. Het medium dat inmiddels is beschreven in een Nederlandse norm [14], kan worden gebruikt voor onderzoek van drink-, oppervlakte- en afvalwater met behulp van de membraanfiltratietechniek een voor voedselmonsters met de spreidplaatstechniek. Voor de isolatie van *Aëromonas* uit patiëntenmateriaal kan gebruik gemaakt worden van voedingsbodems waarin humaan bloed (10%) en ampicilline (10 mg/l) zijn verwerkt [15]. Biochemische kenmerken die kunnen worden gebruikt voor een globaal onderscheid van kolonies in de drie soorten (*A.hydrophila*, *A.sobria*, *A.caviae*) zijn: productie van gas bij de fermentatie van glucose en het vermogen om aesculine te hydrolyseren.



Afb. 3 – Soortensamenstelling op de monsterplaatsen. Op 6 data zijn maximaal 10 stammen per monster onderzocht.

water zijn de aantallen hoger (400-1.000 cfu/ml), is *A. caviae* dominant, is er een verband met *E. coli* en is de seizoensvariatie minder duidelijk aanwezig.

In de Maas is in 1988 een onderzoek [9] uitgevoerd naar het voorkomen van *Aëromonas* met het oog op de recreatiefunctie van de Maasplassen. De aangetroffen *Aëromonas*-aantallen in de Maas waren hoger dan die in de Maasplassen. Voor deze watertypen geldt dat de aantallen circa een factor 100 lager zijn dan in overeenkomstige watertypen uit het hier beschreven onderzoek, respectievelijk de IJssel en de recreatieplassen. Een harde conclusie kan hieruit niet worden getrokken doordat de monstername in het Maas-onderzoek in de winter en het voorjaar heeft plaatsgevonden en de isolatiemethoden niet identiek waren. De resultaten van dit onderzoek komen voor wat betreft de oorzaken van de aanwezigheid van *Aëromonas* overeen met hetgeen in de literatuur is beschreven [2, 3, 4, 5, 6, 9]. De gevonden aantallen zijn redelijk in overeenstemming met die in overeenkomstige watertypen in de literatuur. Een goede vergelijking is in verband met de verschillende gebruikte onderzoeksmethoden niet te maken.

In de recreatieplassen is geen statistisch significante relatie tussen waterkwaliteitsparameters (N, P, chlorofyl-*a*) en *Aëromonas*-aantallen te leggen. In het onderzoek van de Maas kon een dergelijk verband ook niet worden gelegd. Hieruit blijkt dat het erg moeilijk is, om met behulp van een model, voor kleine aantallen monsterplaatsen een algemeen geldende uitspraak te doen over waterkwaliteitsparameters die het voorkomen van *Aëromonas* in oppervlaktewater kunnen verklaren. Amerikaanse onderzoekers toonden een dergelijk verband wel aan [5, 6]; zij gebruikten een veel groter aantal watertypen. De waterkwaliteitsparameters werden ondergebracht in een relatieve-trofie-index (RTI). Met behulp van drie parameters (totaal-P, chlorofyl-*a* en doorzicht) werd de relatieve-trofie-index (RTI) berekend waarmee een indeling in zes niveaus werd gemaakt. Er werd een significante correlatie ($r = -0,84$) gevonden tussen deze RTI en de *Aëromonas*-aantallen voor een groep van 209 [5] respectievelijk 68 [6] monsterplaatsen.

De betekenis van de aanwezigheid van *Aëromonas* in recreatieplassen voor de gezondheid van de recreanten is nog onduidelijk. In de literatuur zijn veel gevallen beschreven van vaak ernstige wondinfecties na contact van open

wonden met oppervlaktewater. Hierbij kan bloedvergiftiging optreden, soms met een fatale afloop. Er is geen onderzoek gedaan naar het bestaan van een oorzakelijk verband tussen gastro-enteritis bij zwemmers ten gevolge van het voorkomen van *Aëromonas* in recreatieplassen. Kuiper [10] voerde in de periode 1982-1986 een screeningsonderzoek uit op circa 30.000 faecesmonsters. In 0,67% van de monsters werd *Aëromonas* aangetroffen. Uit een enquête onder personen waarbij de bacterie werd aangetroffen bleek dat van de 137 geënquêteerden waarbij *Aëromonas* wel, maar geen andere pathogene bacterie werd geïsoleerd, 13 personen (9%) in contact waren geweest met oppervlaktewater. Deze personen hadden allemaal diarree. Andere factoren die werden genoemd zijn medicijngebruik (19%), ziekenhuisopname (13%) en reizen (7%). Echter bij 45% kon geen reden worden aangegeven. Hoewel uit deze, enigszins beperkte, cijfers geen oorzakelijk verband kan worden afgeleid kan ook niet uitgesloten worden dat contact met oppervlaktewater een aanleiding voor een *Aëromonas*-infectie kan zijn.

Relaties tussen de aantallen *Aëromonas* die in oppervlaktewater zijn aangetroffen en een eventuele kans op een infectie met *Aëromonas* kunnen niet worden gelegd. Voor het krijgen van een maag-darminfectie na een blootstelling spelen zeer veel factoren een rol, juist bij opportunistische bacteriën als *Aëromonas*. Wel is aan te raden contact met oppervlaktewater te vermijden indien er sprake is van een open wond.

Conclusies

- In oppervlaktewater komt *Aëromonas* zeer algemeen voor. Hieraan liggen twee processen ten grondslag: autochtone vermeerdering (aantallen 10-100 cfu/ml) en lozing van rioolwater (effluent) (aantallen tot 1.000 cfu/ml).
- De soortensamenstelling wordt bepaald door de trofiegraad van het water; *A. hydrophila* en *A. sobria* komen relatief vaker voor in meso/oligotroof water terwijl *A. caviae* in eutroof water vaker voorkomt.
- Het bleek niet mogelijk te zijn om met behulp van een regressiemodel algemeen geldende uitspraken te doen over de waterkwaliteitsparameters die het voorkomen van *Aëromonas* kunnen verklaren.
- Het gebruik van *Aëromonas*-aantallen als een belangrijke discriminerende factor voor het bepalen van het trofisch niveau van oppervlaktewater werd in dit onderzoek niet bevestigd.

Literatuur

1. Versteegh, J. F. M., Havelaar, A. H. en During, M. (1990). Het voorkomen en de betekenis van *Aëromonas* in drinkwater in Nederland. H₂O (23) 1990, nr. 13, 342-345.
2. Schubert, R. H. W. (1967). Das Vorkommen der *Aeromonaden* in oberirdischen Gewässern. Arch. Hyg. 150: 688-708.
3. Hazen, T. C., Fliermans, C. B., Hirsch, R. P. and Esch, G. W. (1978). Prevalence and distribution of *Aëromonas hydrophila* in the United States. Appl. Environ. Microbiol. 36: 731-738.
4. Schubert, R. H. W. (1975). Die Relation von anaerogenen *Aeromonaden* der 'hydrophila-punctata-Gruppe' in Fließgewässern in Abhängigkeit von der Abfallstoffbelastung. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Org. B 160, 237-245.
5. Rippey, S. R. and Cabelli, V. J. (1980). Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in limnetic environments. Relationship of the organism to trophic state. Microb. Ecol. 6: 45-54.
6. Rippey, S. R. and Cabelli, V. J. (1989). Use of the thermotolerant *Aeromonas* group for the trophic state classification of freshwaters. Wat. Res. 23, 9: 1107-1114.
7. Havelaar, A. H., Leussink, A. B. en Reijnders, H. F. R. (1984). Veranderingen in de waterkwaliteit in 'De Meent' te Beusichem onder invloed van recreatiedruk. H₂O (17) 1984, nr. 17, p. 367-372.
8. Havelaar, A. H. en Versteegh, J. F. M. (1987). Voorkomen van *Aëromonas* in oppervlaktewater en voedsel. In KIWA-VWN-RIVM, *Aëromonas* in drinkwater.
9. Essers, J. H., Houben, A. W. en Stobberingh, E. E. (1989). Het voorkomen van *Aeromonas* species in verschillende Limburgse oppervlaktewateren. H₂O (22) 1989, nr. 13, p. 406-410.
10. Kuiper, E. J. (1989). *Aeromonas*-associated diarrhea in the Netherlands. Proefschrift, Universiteit van Amsterdam.
11. Popoff, M. (1984). *Aeromonas*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. I, ed. Krieg, N. R., pp. 545-548. Baltimore: Williams and Wilkins.
12. Kooij, D. v. d. (1987). Vermeerdering van *Aëromonas* in drinkwater. In KIWA-VWN-RIVM, *Aëromonas* in drinkwater.
13. Havelaar, A. H., During, M. and Versteegh, J. F. M. (1987). Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. J. of Appl. Bacteriol. 62, 279-287.
14. Anon. (1989). Bacteriologisch onderzoek van water – Onderzoek met behulp van membraanfiltratie naar de aanwezigheid en het aantal kolonievormende eenheden van *Aëromonas*-bacteriën. Nederlandse Norm NEN 6263. Delft: Nederlands Normalisatie Instituut: 12 pp.
15. Havelaar, A. H., Guinée, P. A. M., During, M. en Peeters, M. F. namens een werkgroep (1989). *Aëromonas* species als verwekker van diarree en infecties buiten het maag-darmkanaal in Nederland. Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde, geaccepteerd voor publicatie.

