

Thermotolerante klebsiellae in afvalwater van papier- en suikerfabrieken

1. Inleiding

Bij de beoordeling van de hygiënische betrouwbaarheid van water speelt het onderzoek naar de aan- of afwezigheid van bacteriën, afkomstig uit de darm van mensen of warmbloedige dieren (indicatororganismen) een centrale rol. Een bruikbaar indicatororganisme moet onder andere aan de volgende eisen voldoen: de bacterie dient uitsluitend voor te komen in faeces en het aantonen van het organisme dient met eenvoudige en snelle technieken mogelijk te zijn. Uit deze laatste eis vloeit



IR. A. H. HAVELAAR
Rijks Instituut voor de
Volksgezondheid, Bilthoven



P. D. TIPS
Rijks Instituut voor de
Volksgezondheid, Bilthoven

voort dat de aan- of afwezigheid van een indicatororganisme herkenbaar moet zijn aan slechts enkele karakteristieke biochemische eigenschappen.

De van oudsher belangrijkste groep indicatororganismen bij het onderzoek van water is de coligroep, met als gemeenschappelijke eigenschap het vermogen lactose bij 37 °C te vergisten tot zuur en gas (in aanwezigheid van bepaalde selectieve stoffen). De coligroep omvat de geslachten *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* en *Klebsiella*. Deze bacteriëngeslachten worden aangetroffen in faeces, maar kunnen met uitzondering van *Escherichia coli* ook worden geïsoleerd uit niet faecaal besmette bronnen als vegetatie en insecten (Geldreich, 1966). Hierdoor en door het vermogen, wederom met uitzondering van *E. coli*, tot nagroei in nutriënten-rijk water (Kitrell and Furfari, 1963) is de aanwezigheid van bacteriën van de coligroep niet in alle gevallen een indicatie voor faecale verontreiniging.

Teneinde een betere indicatie voor faecale verontreiniging te verkrijgen wordt tegenwoordig veelal uitsluitend de aanwezigheid van *E. coli* bepaald. Hiertoe wordt het onderzoek naar de lactose-vergisting niet bij 37 °C, maar bij 44 °C uitgevoerd (thermotolerante bacteriën van de coligroep). In de afgelopen jaren is echter gebleken dat soms bacteriën, behorende tot het geslacht *Klebsiella*, ook in staat zijn lactose bij 44 °C te vergisten. Grote aantallen van

dergelijke thermotolerante lactosevergisters van niet-faecale herkomst kunnen worden aangetroffen in het afvalwater van papierfabrieken (Dutka et al, 1969; Knowles et al, 1974; Huntley et al, 1976), textiel fabrieken (Dufour and Cabelli, 1975), aardappelmeel fabrieken (Bagley and Seidler, 1977) en een grote verscheidenheid van andere substraten als hout (Bagley et al, 1978), zaagsel (Newman and Kowalsi, 1973), suikerriet (Nunez and Colmer, 1968), groenten en zaden (Seidler et al., 1975).

Als een dergelijk substraat of oppervlaktewater waarop wordt geloosd door industrieën die deze natuurstoffen verwerken op de bovenbeschreven wijze wordt onderzocht, zal dit tot de onjuiste conclusie kunnen leiden dat er sprake is van een sterke faecale verontreiniging.

In het onderstaande wordt een onderzoek beschreven waarvan het doel was na te gaan in hoeverre thermotolerante klebsiellae ook in het Nederlandse oppervlaktewater kunnen voorkomen, en op welke wijze een onderscheid met *Escherichia coli* kan worden gemaakt. Daartoe werd een aantal monsters afvalwater van papier- en suikerfabrieken onderzocht met voor *Klebsiella* selectieve media en met standaardmethoden voor de isolatie van *Escherichia coli*.

2. Materialen en methoden

2.1 Bemonstering

De monsters afvalwater werden genomen door medewerkers van het Rijksinstituut voor de Zuivering van Afvalwater. De monsters werden nog dezelfde dag ongekeld naar het R.I.V. te Bilthoven vervoerd, waar zij gedurende de nacht in een koelkast werden bewaard. De volgende dag werden de monsters onderzocht.

2.2 Bacteriologisch onderzoek

2.2.1 Telling met selectieve media

De monsters werden verdund in peptonfysiologische zoutoplossing waarna steeds tweemaal 10 ml van een zodanige verdunning door een membraanfilter (Gelman GN-6 Metricel 0,45 µm) werd gezogen dat hoeveelheden van 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ en 10⁻⁵ ml monster in duplo werden onderzocht. De membraanfilters werden overgebracht op een selectief medium voor *Klebsiella*: mK-agar volgens Dufour en Lupo (1977) en op een selectief medium voor *Escherichia coli*: 0,4 % Teepolagar (PHLS, 1969). Naast mK-agar werden twee andere selectieve media voor *Klebsiella* uitgetest, t.w. acriflavine-violet-red-bile-agar (Fung and Niemic, 1977) en double-violet-agar (Campbell and Roth, 1977). De resultaten met deze media waren minder goed dan die met mK-agar. Voor verdere

details wordt verwezen naar RIV-rapport nr. 58/79 waarin tevens de bereiding van alle gebruikte media is beschreven.

De mK-agar werd gedurende 20-24 h bij 37 °C geïncubeerd (in enkele gevallen werd de incubatie vanwege het voorkomen van kleine kolonies verlengd tot ca 40 h); 0,4 % Teepol-agar werd 4 h bij 30 °C en vervolgens 14-18 h bij 44 °C geïncubeerd in een broedstof met geforceerde ventilatie. De petrischalen met dit medium werden in plastic zakjes verpakt om uitdroging te voorkomen. Aan het einde van de incubatieperiode werden membraanfilters, geïncubeerd op mK, overgebracht op een met urease-reagens geïmpregneerd schijfje filtreerpapier. Daarna werden de kolonies op alle filters geteld en onderscheiden in twee groepen: typische kolonies welke voldeden aan de in de literatuur gegeven omschrijvingen van de groeiwijze van *Klebsiella* op mK-agar (dat wil zeggen kleurloze tot lichtgele kolonies die bij uitvoeren van de ureasetest verkleurden naar rose) of van *Escherichia coli* op 0,4 % Teepol-agar (dat wil zeggen gele kolonies) en niet-typische kolonies die een andere vorm vertoonden.

Verder werd een MPN-bepaling uitgevoerd in Eijkman-medium met lactose. Daartoe werden buizen, waarin 10 ml van het medium en een Durhambuis, in vijfvoud beënt met 1 ml van een verdunning welke 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ en 10⁻⁷ ml van het monster bevatte. Na incubatie gedurende 24 en 48 h bij 44 °C in een broedstof met geforceerde ventilatie werd van de buizen waarin gasvorming was opgetreden ter bevestiging een oogje (ø 3 mm) overgeënt in briljantgroen-gal-lactose-bouillon (BGGL), eveneens in buizen met 10 ml medium en een Durham-buisje. Deze buizen werden na 24 en 48 h bij 44 °C in een waterbad gecontroleerd op gasvorming. Buizen Eijkman-medium waarin bacteriën voorkwamen die gasvorming in BGGL konden veroorzaken werden als typisch beschouwd. Een negatieve reactie in BGGL (uitgaande van een Eijkman-buis met gas) werd niet-typisch genoemd.

2.2.2. Identificatie

Van alle membraanfilters werd steeds bij benadering de wortel van het aantal typische kolonies op de in duplo ingezette filters overgeënt op Endo-agar. Buizen Eijkman-medium, waarin gasvorming was opgetreden, werden eveneens op Endo-agar afgestreeken. De Endo-platen werd 24 h bij 37 °C geïncubeerd. Met het materiaal van een losliggende kolonie werden de volgende tests uitgevoerd volgens standaardmethodieken: indol-vorming, ornithinedecarboxylase-activiteit, groei met

natriummalonaat als enige koolstofbron en groei met ammoniumcitraat (volgens Simmons) als enige koolstofbron. Op grond van de uitslagen van deze tests werden de geïsoleerde stammen onderverdeeld in drie groepen: *Klebsiella* (— — + +, + — + + en — + + —), *Escherichia* (+ + — —, + — —) en diversen (alle andere patronen). In de groep diversen kwamen voor de geslachten *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Levinea* en *Acinetobacter*.

De aantallen *Klebsiella*, geïsoleerd met een bepaald medium, werden vervolgens berekend door het bevestigde percentage van het aantal kolonies (gemiddelde van twee duplo's) te vermenigvuldigen met de verdunningsfactor.

2.2.3 Determinatie

Ter controle van de juistheid van bovengenoemde indeling werd een aantal reïncultures volledig gedetermineerd.

3. Resultaten

In 3 monsters werden (met het mK-medium) zeer hoge aantallen (10^6 — 10^7 /ml) klebsiellae gevonden, te weten in de monsters 1, 6 en 10. Een aanzienlijk gedeelte van deze populatie bleek ook op voor *E. coli* selectieve media tot ontwikkeling te kunnen komen (zie tabel I). Op Teepol-

TABEL I - Isolatie van klebsiellae uit afvalwater van papier- en suikerfabrieken met verschillende selectieve media.

Monster nummer	Monster-soort ¹⁾	¹⁰ log aantal klebsiellae per ml		
		mK	Teepol	Eijkman
1	S	7,1	6,8	5,4
2	P	1,0	<1,0	<2,3
3	P	3,4	4,0	3,1
4	S	<1,0	<1,0	<2,3
5	S	4,3	<2,0	<2,3
6	P	6,3	5,1	4,4
7	P	2,2	<1,0	<2,3
8	P	3,8	<1,0	<2,3
9	P	<1,0	1,5	<2,3
10	P	6,7	6,7	5,3
11	P	2,0	2,2	<2,3
12	S	2,8	<1,0	<2,3
13	V	4,6	<4,0	<2,3

¹⁾ S: suikerfabriek
P: papierfabriek
V: veenkoloniale afvalwaterleiding

agar groeiden meer klebsiellae dan met een MPN-bepaling in Eijkman-medium werden gevonden. In zeven monsters met 10^2 — 10^6 klebsiellae per ml bleek eveneens een wisselend gedeelte van de populatie tot ontwikkeling te kunnen komen op voor *E. coli* selectieve media. Op Teepol-agar werden zowel bij de lactosepositieve (= typische) als de lactose-negatieve kolonies klebsiellae aangetroffen. De resultaten van de identificatie van

reïncultures, geïsoleerd vanaf de verschillende selectieve media, staan vermeld in tabel II. Het mK-medium vertoonde bij

TABEL II - Identificatie van een aantal reïncultures, geïsoleerd van de gebruikte selectieve media.

	Isolatiemedium		
	mK	Teepol	Eijkman
<i>Typisch</i> ¹⁾			
<i>Klebsiella</i>	78	28	16
<i>Escherichia</i>	0	8	6
Diversen ²⁾	4	25	10
<i>Niet-typisch</i> ¹⁾			
<i>Klebsiella</i>	17	17	0
<i>Escherichia</i>	0	0	0
Diversen ²⁾	2	29	14
Totaal	101	107	46

¹⁾ zie tekst

²⁾ Diversen: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Levinea*, *Acinetobacter*

deze monsters een uitstekende selectiviteit: 94 % van het medium voorkomende kolonies bleek tot het geslacht *Klebsiella* te behoren. De urease-test, die door Dufour en Lupo (1979) wordt aanbevolen voor een onderscheid tussen kolonies van *Klebsiella* en die van andere bacteriën was in de door ons onderzochte monsters misleidend. Zowel urease-positieve (typische) als urease-negatieve (niet-typische) kolonies bleken namelijk voor meer dan 90 % tot het geslacht *Klebsiella* te behoren. De aantallen urease-negatieve kolonies waren overigens gewoonlijk klein, zodat de invloed van het al of niet uitvoeren van de urease-test op de uiteindelijke telling slechts gering was. Wel werd door uitvoeren van de urease-test de afleesbaarheid van de plaatjes verbeterd omdat de kolonies verkleurden van wit naar rose (op de witte achtergrond van het membraanfilter).

Escherichia coli bleek zich op geen van de onderzochte voor *Klebsiella* selectieve media te kunnen ontwikkelen.

Een aantal monsters was licht verontreinigd met afvalwater van sanitaire voorzieningen op de bedrijfsterreinen. Om deze reden werd *Escherichia coli* regelmatig aangetroffen. Daarnaast bleken echter ook andere bacteriën in de monsters voor te komen, die zich zodanig op Teepol-agar en in Eijkman-medium ontwikkelden, dat zij niet van *Escherichia coli* waren te onderscheiden. Onder deze bacteriën nam *Klebsiella* de meest belangrijke plaats in, doch ook vertegenwoordigers van andere geslachten werden regelmatig geïsoleerd.

De gehanteerde indeling op grond van de identificatie van geïsoleerde reïncultures bleek bij volledige determinatie grotendeels juist te zijn. In totaal werden 61 *Klebsiella*-stammen geïsoleerd waarvan 56 (92 %) juist ingedeeld waren; 8 *E. coli*-stammen waren alle juist ingedeeld, terwijl slechts 3 van 30 (10 %) van de stammen uit de groep diversen ten onrechte als *Klebsiella* werden beschouwd. Wanneer ook de beweeglijkheid van de bacteriën als onderdeel van de identificatie zou zijn uitgevoerd, waren ook deze drie stammen juist ingedeeld.

In tabel III is een overzicht gegeven van de biochemische eigenschappen van de geïsoleerde reïncultures. 12 % van de *Klebsiella*-stammen bleek in staat tot gasvorming in briljantgroen-gal-lactose-bouillon en dus te beantwoorden aan de definitie van thermotolerante bacteriën van de coligroep. Van de geïsoleerde stammen van andere geslachten bleek een aantal wel tot groei bij 44 °C in staat te zijn, doch niet tot gasvorming uit lactose bij deze temperatuur.

4. Discussie

In 10 van 13 onderzochte monsters afvalwater van papierfabrieken werden klebsiellae aangetroffen in aantallen variërend van 10^2 — 10^7 /ml. Een gedeelte (12 — 16 %) van de nader onderzochte stammen bleek in staat te zijn gas te vormen uit lactose bij 44 °C. Door de grote aantallen waarin deze bacteriën in effluënten kunnen voorkomen, dient daarom rekening te worden gehouden met een „vals positieve reactie" bij het onderzoek naar faecale verontreiniging van oppervlaktewater op sommige punten. Het is daarom van belang een onderscheid te kunnen maken tussen *Escherichia coli* en *Klebsiella*. Een mogelijkheid biedt de in dit onderzoek toegepaste korte bonte rij, waarmee tevens een globale identificatie wordt verkregen. Waarschijnlijk kan de nauwkeurigheid nog worden vergroot door een onderzoek naar beweeglijkheid toe te voegen.

In deze korte bonte rij zijn twee biochemische reacties (de indol-test en groei met citraat als enige koolstofbron) opgenomen die ook deel uitmaken van de in het wateronderzoek veel toegepaste IMViC-test. De twee andere reacties uit deze test (de methylroodreactie en de Voges-Proskauer test) zijn niet geschikt om een onderscheid te maken tussen *Escherichia* en *Klebsiella* spp. Uit tabel III kan namelijk afgelezen worden dat deze reacties bij *Klebsiella* als variabel moeten worden beschouwd. Wanneer het onderzoek uitsluitend gericht is op de vraag of een bacterie die bij 44 °C lactose kan vergisten tot de soort *Escherichia coli* behoort, kan met het uitvoeren van uitsluitend de indol-test worden volstaan. De in dit onderzoek geïsoleerde indol-positieve *Klebsiella*-stammen bleken namelijk niet bij 44 °C te kunnen groeien. Deze waarneming werd weliswaar gedaan

TABEL III - Biochemische eigenschappen van de geïsoleerde reïncultures.

Kenmerk	Klebsiella	Enterobacter	Escherichia	Citrobacter	Levinae	Acinetobacter
Aantallen stammen	61	21	8	2	3	4
beweeglijkheid	0 ¹⁾	76	38	100	67	0
katalase	100	100	100	100	100	100
oxydase	0	0	0	0	0	0
β -galactosidase	100	100	100	100	100	0
nitraatreductie	100	100	100	100	100	0
glucose, zuur	100	100	100	100	100	100
glucose, gas	84	100	100	50	100	0
mannitol, zuur	100	100	100	100	100	0
adonitol, zuur	93	0	0	0	0	0
dulcitol, zuur	21	19	100	50	0	0
inositol, zuur	90	0	0	0	0	0
lactose, zuur	100	81	100	100	100	0
salicine, zuur	100	57	50	0	100	0
sucrose, zuur	100	86	50	50	100	0
indol	18	0	100	0	100	0
gelatinase	0	0	0	0	0	0
H ₂ S (TSI)	0	0	0	100	0	0
citraat (Christensen)	98	95	0	100	100	100
methylrood	68	67	100	100	100	0
Voges-Proskauer	70	52	0	0	0	0
urease	89	95	0	100	0	25
malonaat	93	38	0	0	100	75
fenylalaninedeaminase	0	0	0	0	0	0
lysinedecarboxylase	97	29	100	0	33	25
ornithinedecarboxylase	2	62	50	50	67	100
Eijkman 44 °C, groei	44 ³⁾	52	100	50	50	75
Eijkman 44 °C, gas	16 ³⁾	14	100	0	0	0
BGGL ²⁾ 44 °C, groei	36 ³⁾	0	100	0	0	0
BGGL ²⁾ 44 °C, gas	12 ³⁾	0	100	0	0	0

1) percentage positieve stammen
 2) briljantgroen-gal-lactose bouillon
 3) aantal stammen = 50

aan een beperkt aantal reïncultures, maar wordt ondersteund door het feit dat op de bij 44 °C geïncubeerde media (Teepol en Eijkman) slechts éénmaal een indol-positieve *Klebsiella* werd gevonden. Ook Naemura en Seidler (1978) constateerden dat indol-positieve klebsiellae niet bij 44 °C kunnen groeien.

De uit afvalwater geïsoleerde klebsiellae kunnen volgens de geldende taxonomische literatuur (Buchanan and Gibbons, 1974; Sadlák und Rische, 1968) niet tot op species worden gedetermineerd. De in de Amerikaanse literatuur veelvuldig gebruikte naam *Klebsiella pneumoniae* is uitsluitend gerechtvaardigd omdat volgens Bergey's manual of determinative bacteriology (Buchanan and Gibbons, 1974) deze soort alle *Klebsiella*-stammen omvat die niet behoren tot *K. ozaenae* en *K. rhinoscleromatis*. Een vergelijking met de taxonomische literatuur (Buchanan and Gibbons, 1974; Sedlák und Rische 1968) leert dat de eigenschappen van uit water geïsoleerde klebsiellae sterk afwijken van *K. pneumoniae sensu stricto*, zowel in het huidige onderzoek als in eerdere Amerikaanse onderzoeken (Matsen et al., 1974; Seidler et al., 1975; Dufour and Cabelli, 1976). Een

bruikbare indeling kan worden gemaakt aan de hand van de tabellen van Bascomb et al. (1973). De uit water geïsoleerde klebsiellae behoren volgens dit schema tot de *K. aerogenes/K. oxytoca*-groep.

Dankbetuiging

De bemonstering van de verschillende bedrijven werd uitgevoerd door medewerkers van het Rijksinstituut voor de Zuivering van Afvalwater, gecoördineerd door ing. J. E. Hulshof. Het onderzoek kon worden uitgevoerd dankzij de toestemming van de volgende firma's om monsters op hun bedrijven te verzamelen:

Centrale Suiker Maatschappij
 Coöperatieve Vereniging Suikerunie
 Koninklijke Nederlandse Papier
 Van Gelder Papier
 Waardevolle adviezen bij opzet en uitvoering van het project en bij de determinatie werden geleverd door dhr. J. Valkenburg (RIV, afdeling Enterobacteriaceae).

Literatuur

Bagley, S. T. and Seidler, R. J. (1977). Significance of fecal coliform positive *Klebsiella*.

Appl. Env. Microbiol. 33, 141-1448.
 Bagley, S. T.; Seidler, R. J. et al. (1978a). Isolation of *Klebsiella* from within living wood. Appl. Env. Microbiol. 36, 178-185.
 Bagley, S. T. and Seidler, R. J. (1978b). Comparative pathogenicity of environmental and clinical *Klebsiella*. Hlth. Lab. Sci. 15, 104-111.
 Bascomb, S.; Lapage, S. P. et al. (1973). Identification of bacteria by computer: Identification of reference strains. J. Gen. Microbiol. 77, 291-315.
 Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. (eds) (1974). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, pp. 321-324.
 Campbell, L. M. and Roth, I. L. (1975). Methyl violet: a selective agent for differentiation of *Klebsiella pneumoniae* from *Enterobacter aerogenes* and other Gram-negative organisms. Appl. Env. Microbiol. 30, 258-261.
 Dufour, A. P. and Cabelli, V. J. (1976). Characteristics of *Klebsiella* from textile finishing plant effluents. Jour. Wat. Poll. Contr. Fed 48, 872-879.
 Dufour, A. P. and Lupo, L. B. (1977). A membrane filter method for enumerating *Klebsiella* species. Annual Meeting Am. Soc. Microbiol., New Orleans.
 Dutka, B. J.; Bell, J. B. et al. (1969). A bacteriological study of the Rainy River. Department of National Health and Welfare, manuscript no. Cl-1, Canada.
 Fung, P. Y. C. and Niemic, N. (1977). Acriflavine violet red bile agar for the isolation of *Klebsiella*. Hlth. Lab. Sci. 14, 273-278.
 Geldreich, E. E. (1966). Sanitary significance of fecal coliforms in the environment. US. Department of the Interior, publication WP-20-3.
 Huntley, B. E.; Jones, A. C. and Cabelli, V. J. (1976). *Klebsiella* densities in waters receiving wood pulp effluents. Jour. Wat. Poll. Contr. Fed. 48, 1766-1771.
 Kittrell, F. W. and Furfari, S. A. (1963). Observations of coliform bacteria in streams. Jour. Wat. Poll. Contr. Fed. 35, 1361-1385.
 Knowles, R.; Neufeld, R. and Simpson, S. (1974). Acetylene reduction (nitrogen fixation) by pulp- and paper mill effluents and by *Klebsiella* isolated from effluents and environmental samples. Appl. Microbiol. 28, 608-613.
 Matsen, J. N.; Spindler, J. A. and Blosser, R. O. (1974). Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. Appl. Microbiol. 28, 627-678.
 Naemura, L. G. and Seidler, R. J. (1978). Significance of low temperature growth, associated with the fecal coliform response, indole production and pectin liquefaction in *Klebsiella*. Appl. Microbiol. 35, 392-396.
 Newman, L. E. and Kowalski, J. J. (1973). Fresh sawdust bedding — a possible source of *Klebsiella* organisms. Am. J. Vet. Res. 34, 979-980.
 Nunez, W. and Colmer, R. A. (1968). Differentiation of *Aerobacter* — *Klebsiella* isolate from sugarcane. Appl. Microbiol. 16, 1875-1878.
 PHLS Standing Committee on the bacteriological examination of water supplies. (1969). Report nr. 71. Her Majesty's Stationery Office, London.
 Sedlák, J. and Rische, H. (eds) (1968). *Enterobacteriaceae-Infektionen*. Georg Thieme, Leipzig, pp. 531-557.
 Seidler, R. J.; Knittel, M. D. and Brown, C. (1975). Potential pathogens in the environment: cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella pneumoniae* from clinical and environmental sources. Appl. Microbiol. 29, 819-825.