

# E. coli met Resistentiefactoren in effluenten en oppervlaktewateren

Resistentie tegen antibiotica bij Enterobacteriaceae is gedurende de laatste decennia sterk toegenomen. Dit is niet alleen het geval bij de pathogene species van de Enterobacteriaceae, zoals Shigella en Salmonella (Manten, Guinée, Kampelmacher, Voogd, 1971), doch vooral ook bij niet-pathogene species zoals E.coli, die als normale darmbewoner bij mens en dier voorkomt (Guinée, 1971; Guinée, Ugueto, v. Leeuwen, v. Kol, 1971; Guinée, Frik, Ugueto, v. Leeuwen, v. Kol, 1972).

Deze resistentie wordt meestal veroorzaakt



DR. P. A. M. GUINÉE  
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Bilthoven



DRS. V. M. SEKHUIS  
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Bilthoven



N. R. UGUETO  
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Bilthoven

door de aanwezigheid van een buiten het bacteriechromosoom gelegen DNA molecuul. Meestal is dit molecuul in staat zichzelf tijdens de replicatie over te dragen naar een andere bacterie van dezelfde of van een andere soort. Men noemt een dergelijke molecuul een R-factor.

Er zijn ook incomplete R-factoren, die wel resistentie tegen een of meer antibiotica veroorzaken, doch niet op eigen kracht kunnen overdragen.

Men kan verwachten dat vele E.coli bacteriën die een complete R-factor dragen (= R<sup>+</sup>E.coli), speciaal die afkomstig van de mens, op den duur, al dan niet na passage door een rioolwaterzuiveringsinstallatie, in het oppervlaktewater terecht komen.

Door Smith (1970), Sturtevant en Feary (1969) en Sturtevant, Cassel en Feary (1971) werd het voorkomen van R<sup>+</sup>E.coli in rioolwater en oppervlaktewater beschreven.

Het hierna te beschrijven onderzoek werd verricht met het doel informatie te verkrijgen over het voorkomen van R<sup>+</sup>E.coli in effluenten en oppervlaktewater in Nederland.

## Methoden van onderzoek

Afhankelijk van het verwachte aantal

bacteriën per ml werd het watermonster al of niet geconcentreerd bijv. door 100 of 200 ml van het monster bij 15.000 r.p.m. gedurende 30 minuten te centrifugeren of een zelfde hoeveelheid door een millipore filter (0,45 µm) te trekken en vervolgens het sediment resp. het residu in 1 of 2 ml fysiologische zoutoplossing te suspenderen. Voor kwantitatieve bepalingen werd deze suspensie decimaal verdund en van iedere verdunning 0,1 ml uitgespateld op McConkey-agarplaten (Difco) al of niet gesupplementeerd met 50 γ/ml van één der volgende antibacteriële stoffen: tetracycline, chloramphenicol, nitrofurantoïne, kanamycine en ampicilline. De platen werden na 18-20 uur incubatie bij 37° beoordeeld.

Door telling werd het totaal-aantal E.coli per ml alsmede de aantallen resistente E.coli bepaald. Deze laatste worden hierna uitgedrukt als percentage ten opzichte van het totaal-aantal per ml.

Tot aanwezigheid van een complete R-factor werd geconcludeerd indien een stam in staat bleek te zijn, zijn resistentiekenmerken over te dragen naar een nalididine-zuur-resistente mutant van E.coli K12 (E.coli K12 Na<sup>r</sup>) volgens eerder beschreven methoden (Guinée, Ugueto, v. Leeuwen, 1971).

## Resultaten

### 1. E.coli met R-factoren in effluent van de waterzuiveringsinstallatie te Utrecht

Het effluent van de rioolwaterzuiveringsinstallatie te Utrecht (350.000 inwonerequivalenten = i.e.) werd op 10 achtereenvolgende dagen in april 1970 bemonsterd. Het gemiddelde van de totaal-aantallen E.coli per ml effluent bedroeg ongeveer  $1 \times 10^4$ . De percentages resistente E.coli zijn vermeld in tabel I.

TABEL I - Antibioticum-resistente E.coli in effluent te Utrecht \*)

Resistent tegen	Aantal resistente E.coli per 1000 E.coli	
	geometrisch gemiddelde in 10 monsters	(95 % betrouwbaarheidsinterval voor het geometrisch gemiddelde)
Tetracycline	78	(37—160)
Chloramphenicol	4	(2—12)
Nitrofurantoïne	14	(4—58)
Kanamycine	26	(9—78)
Ampicilline	22	(9—56)

\*) Het totaal-aantal E.coli bedroeg gemiddeld  $1 \times 10^4$  per ml (laagste gehalte van de 10 monsters:  $4 \times 10^3$ , hoogste gehalte:  $4 \times 10^4$ ).

In ieder monster werd R<sup>+</sup>E.coli aangetroffen; 43 van 61 onderzochte resistente stammen (70 %) droegen hun resistentie over naar E.coli K12 Na<sup>r</sup> (tabel II).

TABEL II - R<sup>+</sup>E.coli in monsters effluent te Utrecht.

	met resistentie tegen T*) C F K A					
aantal resistente stammen	61	47	35	10	16	31
aantal R+ stammen	43	30	21	0	10	15
%	70%					

\*)

T = tetracycline

C = chloramphenicol

F = furantoïne

K = kanamycine

A = ampicilline

### 2. Reductie van het totaal-aantal E.coli, en van de aantallen resistente E.coli in de waterzuiveringsinstallatie te De Bilt

Ter bepaling hiervan werd het influent en het effluent van deze installatie (100.000 i.e.) gedurende 12 dagen in januari 1973 1 à 2 maal per dag bemonsterd.

Alle monsters influent bevatten E.coli met resistentie tegen tetracycline, chloramphenicol, kanamycine en ampicilline. Niet alle monsters influent bevatten nitrofurantoïne-resistente E.coli en in de monsters effluent werd geen enkele maal nitrofurantoïne-resistente E.coli aangetoond. Gebaseerd op de gemiddelde waarden bedroeg de reductie-factor van het E.coli-gehalte 67 (totaal-aantal E.coli per ml influent gedeeld door het totaal-aantal E.coli per ml effluent) en de reductiefactor van het aantal ampicilline-resistente E.coli 29.

Het percentage ampicilline-resistente E.coli bleek bij 7 monsterparen lager te zijn dan in het influent en bij 11 andere monsterparen hoger. Er was dus geen systematisch verschil en aan het bovengenoemde verschil van reductiefactoren (67 resp. 29) kan dan ook geen bijzondere betekenis worden gehecht.

Bij 14 monsterparen influent-effluent was het percentage tetracycline-resistente E.coli in het effluent lager dan in het influent en bij 4 monsterparen hoger. Dit zou er op kunnen wijzen, dat tetracycline-resistente E.coli gevoeliger is voor het zuiveringsproces dan tetracycline-gevoelige E.coli. Ten aanzien van kanamycine-resistente E.coli bedroegen de overeenkomstige aantallen monsterparen 11 resp. 7.

### 3. Onderzoek van het effluent van waterzuiveringsinstallaties en van afvalwater van slagerijen op Walcheren

Bij het eerste deel van dit onderzoek werden in 1972 alle 14 zuiveringsinstallaties op het eiland Walcheren 4 x bemonsterd. De per installatie op 4 verschillende dagen (maandag en vrijdag) gemeten totaal aantallen E.coli per ml effluent verschilden niet significant van elkaar. De 14 installaties

bleken onderling significant van elkaar te verschillen. Het gemiddelde van het totaal-aantal E.coli van de monsters per installatie varieerde van  $1 \times 10^4$  tot  $3 \times 10^6$  E.coli/ml effluent. In alle monsters werden tetracycline-resistente en ampicilline-resistente E.coli gevonden met een overall gemiddeld percentage van 0,7 % respectievelijk 3,5 %. Het percentage tetracycline-resistente E.coli in de verschillende monsters vertoonde aanzienlijke variabiliteit; systematische verschillen tussen installaties of tussen dagen van monsternamen werden niet gevonden. Ten aanzien van het percentage ampicilline-resistente E.coli werden wel systematische verschillen tussen de installaties gevonden; ook de dag van monstername was op dit percentage van invloed; op maandagen werden over het algemeen hogere percentages gevonden dan op vrijdagen.

Chloramphenicol-, nitrofurantoin- en kanamycine-resistente E.coli werd niet in alle monsters aangetroffen. Voor zover de hier bedoelde zuiveringsinstallaties faecaliën verwerken, zijn deze praktisch geheel van humane oorsprong. Het was echter bekend dat ook een aantal slagerijen het afvalwater op het riool lozen. In het tweede deel van het onderzoek werden kwantitatieve bepalingen verricht inzake resistente E.coli in het afvoerriool van deze slagerijen (meestal 1 per installatie) als ook in het effluent van de installatie waarop deze slagerij is aangesloten, om na te gaan in hoeverre het afvalwater van een slagerij van invloed is op het percentage resistente E.coli in het effluent van de zuiveringsinstallatie, waarop deze slagerij loost. Hierbij werd er van uitgegaan dat de procentuele samenstelling van E.coli in het rioolwater niet wezenlijk verandert tijdens het transport naar de installatie, alsook tijdens de zuivering. Het afvoerriool van de slagerijen werd bemonsterd door er enige dagen een tampon in te hangen, waardoor in feite een met E.coli 'verrijkt' monster werd verkregen dat verder op de gebruikelijke wijze werd geanalyseerd. Een vergelijking tussen de beide soorten monsters wat betreft absolute aantallen E.coli en resistente E.coli is om deze reden niet mogelijk, wel een vergelijking tussen de percentages resistente E.coli. Per slagerij annex installatie werden 2 à 3 monsters met een interval van enige dagen genomen.

De percentages tetracycline- en chloramphenicol-resistente E.coli in de slagerij afvalwatermonsters waren in 17/18 monsterparen lager dan die in het effluent van de bijbehorende installaties en in één monsterpaar hoger.

Met betrekking tot ampicilline-resistente E.coli bedroegen deze getallen 5/18 lager en 13/18 hoger; kanamycine-resistente E.coli was even vaak hoger als lager. Gezien deze bevindingen kan worden gesteld dat het afvalwater van slagerijen niet bepalend is geweest voor het percentage resistente E.coli in het aan de zuiveringsinstallatie aangeboden rioolwater. Uit 14/15 monsters effluent en uit 9/19 'verrijkte' slagerij afvalwatermonsters werden R<sup>+</sup>E.coli stammen geïsoleerd, die hun resistentie konden overdragen. Het percentage R<sup>+</sup>E.coli onder resistente stammen geïsoleerd uit effluent bedroeg 43, onder resistente stammen geïsoleerd uit slagerij afvalwater was dit percentage 26.

4. *Resistente respectievelijk R<sup>+</sup>E.coli in oppervlaktewateren*

Gezien de positieve bevindingen in effluents, werd een aantal monsters uit oppervlaktewater onderzocht. Deze monsters zijn in te delen in 3 categorieën:

- Stadsgrachten te Utrecht* (6 monsters), deze staan in verbinding met de rivier waar het effluent van de onder 1 genoemde zuiveringsinstallatie wordt geloosd; bovendien wordt hier en daar nog direct afvalwater op deze grachten geloosd.
- Sloten in agrarisch gebied, in de omgeving van Utrecht* (12 monsters), waar faecale verontreiniging voornamelijk door dieren mogelijk is.
- Beken in recreatiegebieden op diverse plaatsen in Nederland* (10 monsters).

Aangezien relatief lage kiemcijfers/ml werden verwacht, werd van ieder monster 100 ml onderzocht na concentratie en zijn de gevonden waarden per 100 ml monster weergegeven. In het stadsgebied werd in alle 6, verspreid over de stad genomen, monsters E.coli met resistentie tegen tetracycline, kanamycine

en ampicilline gevonden. Het gemiddeld aantal E.coli per 100 ml bedroeg ongeveer  $1 \times 10^6$ . In agrarisch gebied werd weliswaar in alle monsters E.coli aangetroffen (gemiddeld ongeveer  $3 \times 10^4/100$  ml), doch slechts een beperkt aantal monsters bevatte resistente E.coli. De monsters water uit beken en vijvers in 'recreatiegebieden' bevatten niet alle E.coli en slechts sporadisch resistente E.coli (tabel III). Er blijkt dus een duidelijk verschil te zijn in besmettingsgraad met al of niet resistente E.coli tussen de 3 verschillende soorten oppervlaktewater. Ten aanzien van het vermogen van de geïsoleerde stammen om hun resistentie over te dragen, bestond geen duidelijk verschil: 36 (44 %) van 82 uit stadsgrachten geïsoleerde resistente stammen droegen over, 25 (38 %) van 66 uit de agrarische wateren geïsoleerde stammen, terwijl 3 uit recreatiewater geïsoleerde resistente E.coli stammen hun resistentie niet overdroegen.

5. *E.coli met R-factoren in Maas en Rijn bij binnenstromen in Nederland*

Beide rivieren werden 8 x in de loop van één jaar (1971-1972) bemonsterd en de monsters werden behandeld zoals onder 4 aangegeven. Het gemiddelde van het totaal-aantal E.coli per 100 ml in de Maas bedroeg  $1 \times 10^5$ , het laagste gehalte was  $1 \times 10^4$  en het hoogste ruim  $1 \times 10^6$  (tabel IV). Voor de Rijn bedroeg het gemiddelde ca.  $1 \times 10^5$  met een laagste waarde van  $2 \times 10^4$  en een hoogste waarde van  $3 \times 10^6$  (tabel IV). Uit 6/8 Rijnmonsters en 5/8 Maasmonsters werden R<sup>+</sup>E.coli geïsoleerd; 12/32 (38 %) resp. 13/30 (43 %) van de onderzochte resistentie stammen waren R<sup>+</sup>. Met vrijwel alle effluents van zuiveringsinstallaties wordt voortdurend ongeveer  $1 \times 10^5$  E.coli/ml in het oppervlaktewater geloosd. Hiervan kan tot 10 % resistent zijn

TABEL III - E.coli en resistente E.coli in monsters oppervlaktewater.

	Gemiddelde van de logaritmische van het aantal E.coli per 100 ml									
	Totaal E.coli			Resistente E.coli						
		T *)		C	N	K	A			
Stadsgrachten	6,2 (6/6) <sup>1)</sup>	4,6 (6/6)	<2,4 (3/6)	<2,5 (4/6)	4,9 (6/6)	5,2 (6/6)				
Agrarisch gebied	4,5 (12/12)	<2,1 (6/12)	<1,3 (2/12)	<1,3 (2/12)	<1,6 (4/12)	<3,3 (7/12)				
Recreatiegebied	<2,1 (8/10)	<0,7 (0/10)	<0,7 (0/10)	<0,7 (0/10)	<0,8 (1/10)	<0,8 (1/10)				

\*) Zie tabel II.

1) Aantal monsters waarin E.coli werd aangetoond, op het totaal aantal onderzochte monsters.

TABEL IV - E.coli en resistente E.coli in monsters Maas- en Rijnwater.

	Gemiddelde van de logaritmische van het aantal E.coli per 100 ml									
	Totaal E.coli			Resistente E.coli						
		T *)		C	N	K	A			
Maaswater	5,0 (8/8) <sup>1)</sup>	<3,0 (6/8)	<2,3 (6/8)	<2,3 (3/8)	3,0 (8/8)	4,2 (8/8)				
Rijnwater	4,9 (8/8)	2,9 (8/8)	<2,3 (3/8)	<2,1 (3/8)	3,3 (8/8)	4,2 (8/8)				

\*) Zie tabel II.

1) Aantal monsters waarin E.coli werd aangetoond, op het totaal aantal onderzochte monsters.

terwijl ongeveer de helft van de resistente bacteriën in staat is zijn resistentie over te dragen. Het percentage tetracycline-resistente *E.coli* ten opzichte van het totaal-aantal is min of meer een afspiegeling van de situatie bij de mens; ruim 1 % van alle *E.coli* bacteriën die door de mens worden uitgescheiden is tetracycline-resistent (Guinée, Ugueto en Van Leeuwen, 1971). De aantallen *E.coli* in de stadsgrachten te Utrecht zijn ongeveer gelijk aan die in het effluent te Utrecht. Dit hangt vermoedelijk samen met het feit dat in het centrum van de stad nog veelal direct op de grachten worden geloosd.

Smith (1970) suggereert dat in de door hem onderzochte zuiveringsinstallaties (actief slibmethode of biologische filtratie) een sterke reductie van resistente *E.coli* optrad. De resultaten van Sturtevant en Feary (1969) alsook de hier boven beschreven resultaten wijzen erop dat de reductie van resistente *E.coli* ongeveer parallel loopt aan die van het totaal-aantal *E.coli*.

Wel werd een indicatie gevonden dat tetracycline-resistente *E.coli* mogelijk iets gevoeliger is voor het zuiveringsproces dan tetracycline-gevoelige *E.coli*.

Uit de hier beschreven gegevens alsook uit de aangehaalde literatuur blijkt dat met het effluent voortdurend  $R^+$ *E.coli* in het oppervlaktewater terecht komen.

### Samenvatting

Bacteriën van het geslacht *E.coli* zijn normale darmbewoners bij mens en dier en worden derhalve met de faecaliën uitgescheiden. De laatste decennia is de resistentie ten opzichte van antibiotica bij *E.coli* voortdurend toegenomen. Deze door zogenaamde Resistentie-factoren veroorzaakte on-gevoeligheid kan in principe van de ene bacterie (soort) naar de andere worden overgedragen. Resistente *E.coli* bacteriën, met al of niet complete Resistentie-factoren, blijken veelvuldig voor te komen in gezuiverd afvalwater, en konden ook in monsters oppervlaktewater worden aangetoond.

### Literatuur

- Guinée, P. A. M., Ann. N.Y. Acad.Sc., 1971, 182, 40-51.  
 Guinée, P. A. M., Ugueto, N. R., Leeuwen, W. J. v., Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1971, 96, 141-150.  
 Guinée, P. A. M., Frik, J., Ugueto, N. R., Leeuwen, W. J. v., Kol, P. J. van, Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1972, 97, 705-718.  
 Manten, A., Guinée, P. A. M., Kampelmacher, E. H., Voogd, C. E., Bull. Wld. Hlth. Org., 1971, 45, 85-93.  
 Smith, H. W., 1970, Nature 228, 1286-1288.  
 Sturtevant, P. A. B., Feary, Th. W., Appl. Microb. 1969, 18, 918-925.  
 Sturtevant, P. A. B., Cassell, G. H., Feary, Th. W., Appl. Microb., 1971, 21, 487-491.

