

Levensduur van *E. coli* in steriel leidingwater en peptonwater

Inleiding

Het aantal over colibacteriën verschenen publikaties is welhaast onoverzienbaar. Gegevens over de tijd die deze bacteriën in water in leven kunnen blijven zijn echter betrekkelijk schaars en bovendien vaak tegenstrijdig. De overlevingstijden, die in de literatuur worden gevonden, variëren van enkele dagen tot verscheidene maanden.

Deze tegenstrijdigheid is waarschijnlijk ten dele schijn, omdat de overlevingstijd sterk



D. J. LINDENBERGH
Rijksdienst voor de
IJsselmeerpolders

afhankelijk van de proefomstandigheden, met name van de onderzoeksmethodiek, de soort water, het wel of niet gesteriliseerd zijn van het water, de pH, de wijze van incuberen en de incubatietemperatuur, enz. Over deze proefomstandigheden wordt in veel gevallen echter weinig of niets vermeld, waardoor de uitkomsten ook nauwelijks met elkaar zijn te vergelijken. Om enig inzicht in de overlevingstijd van colibacteriën te verkrijgen was het daarom gewenst zelf enig onderzoek op dit gebied te verrichten. De overlevingstijd is immers belangrijk omdat het opsporen van faecale colibacteriën steeds belangrijker is geworden bij het bacteriologisch (drink-)wateronderzoek.

In het kader van dit onderzoek zijn reeds proeven uitgevoerd over het afsterven van *E. coli* in bakken met leidingwater resp. met en zonder biezen (Koridon, 1971) en in cultuurvaten met Eem-, Eemmeerwater en leidingwater (Lindenbergh en Eenkhoorn, 1972). In het onderstaande wordt een (nog niet afgesloten) proef beschreven over de overlevingstijd van *E. coli* in steriel leidingwater en peptonwater en zijn de verkregen uitkomsten vermeld.

Proefopzet, uitvoering en resultaten

Cultuurkolven met een inhoud van 4 liter (afb. 1) zijn gevuld met 3 liter leidingwater (zie voor samenstelling tabel I) of 3 liter peptonwater (N 3043, 1956) en vervolgens 30 minuten bij 120 °C in een autoclaaf gesteriliseerd. Ze zijn daarna geënt met 3 ml van een vloeibare cultuur van *Escherichia coli*. De cultuur is verkregen door een *E. coli* stam drie dagen te kweken in peptonwater bij 29 °C met toepassing van aëratie. Deze stam is betrokken van het Microbiologisch Laboratorium van de Technische Hogeschool te Delft en aldaar ca. 50 jaar geleden geïsoleerd uit de faeces van een baby. De cultuur bleek bij de

tellingen op bouillonagar bij 37 °C en bij tellingen met Eijkmanvloeistof bij 37 °C en 45 °C resp. 6×10^8 , 8×10^8 en 5×10^8 bacteriën per ml te bevatten.

De bouillonvoedingsbodem is bereid volgens N 3043 (1956). Voor de Eijkmanvloeistof is Eijkmanlactose gebruikt volgens Standard Methods (1946).

Bevestigingstesten (de indol- en methyl-roodreactie, de reacties volgens Voges Proskauer en volgens Koser, N 3043, 1956) en een oxidasetest volgens Voets (1956) wezen uit dat de gebruikte stam zuiver was en van faecale oorsprong. Uit het feit dat voor het aantal thermotolerante gistingbacteriën (Eijkman bij 45 °C) ongeveer gelijke waarden zijn gevonden als voor beide andere bepalingen, volgt dat de stam zijn thermotolerantie had behouden.

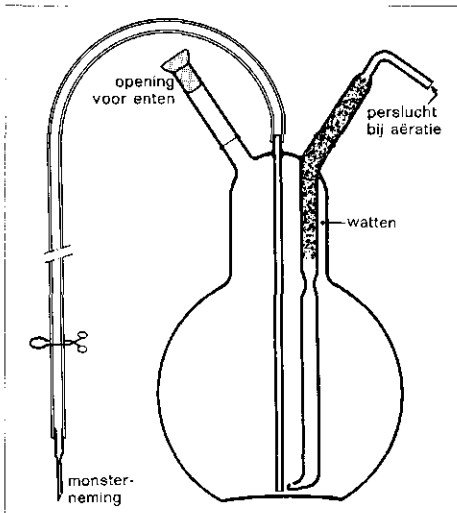
De kolven zijn na de enting bewaard bij kamertemperatuur en in (van boven invallend) diffuus daglicht.

Het was mogelijk om tijdens de proef via een injectienaald op steriele wijze monstertjes uit de kolven te nemen (zie afb. 1).

Het onderzoek bestond uit het verrichten van reeds genoemde bacterietellingen (op bouillonagar bij 37 °C en met Eijkmanvloeistof bij 37 °C en 45 °C) in met meer of minder grote tijdsintervallen uit de kolven genomen monstertjes. De bepaling van het totaal bacteriegetal (tbg) op bouillonagar geschiedde volgens de plaatmethode. Die van de thermotolerante gistingbacteriën bij 45 °C (MPN) en van de bacteriën die gisting veroorzaken in Eijkmanvloeistof bij 37 °C (eveneens MPN) volgens de zogenaamde verdunningsmethode in cultuurbuizen. Na elke telling zijn bevestigingstests uitgevoerd.

De tellingen zijn eerst om de week verricht; geleidelijk zijn de tijdsintervallen groter gekozen tot ze tenslotte meer dan 100

Afb. 1 - Kolf die voor de incubatie gebruikt is.



TABEL I - Fysisch-chemische analyse van het leidingwater van Kampen op 15-7-71 en 19-10-71 door het Keuringsinstituut voor Waterleiding-artikelen (KIWA).

	15-7-71	19-10-71
Kleur, mg Platina per liter	2	1
Geleidingsvermogen (mikrosiemens)	117	139
Waterstofexponent (pH) gemeten	6,9	7,6
Kaliumpermanganaatverbruik in mg (gef. water)	1	1
Chloride (Cl ⁻) in mg/l	15	15
Nitriet (NO ₂ ⁻) in mg/l	< 0,02	< 0,02
Nitraat (NO ₃ ⁻) in mg/l	< 2	< 2
Sulfaat (SO ₄ ⁻) in mg/l	9	10
Hydrocarbonaat (HCO ₃ ⁻) in mg/l	43	62
Vrij koolzuur (CO ₂) in mg/l	15	2
Carbonaat (CO ₃ ⁻) in mg/l	0	0
Fosfaat (PO ₄ ⁻) in mg/l	0,15	0,15
Ammonium (NH ₄ ⁺) in mg/l	< 0,05	< 0,05
IJzer (Fe) in mg/l	0,05	0,07
Mangaan (Mn) in mg/l	0,04	< 0,03
Natriumhydrocarbonaat (NaHCO ₃) in mg/l	0	0
Zuurstof (O ₂) in mg/l	7,0	5,4
Calcium (Ca ⁺⁺) in mg/l	16	18
Natrium (Na ⁺) in mg/l	9	9
Kalium (K ⁺) in mg/l	< 1	1,0
Totale hardheid in °D/-aequ	2,4	3,2
Hydrocarbonaathardheid in °D/m-aequ	2,0	2,8
Agressiviteit t.o.v. calciumcarbonaat	sterk	± 1 mg/l

dagen bedragen. Dit omdat de afsterving zeer langzaam blijkt te verlopen en het proces zo mogelijk tot het einde gevolgd zal worden.

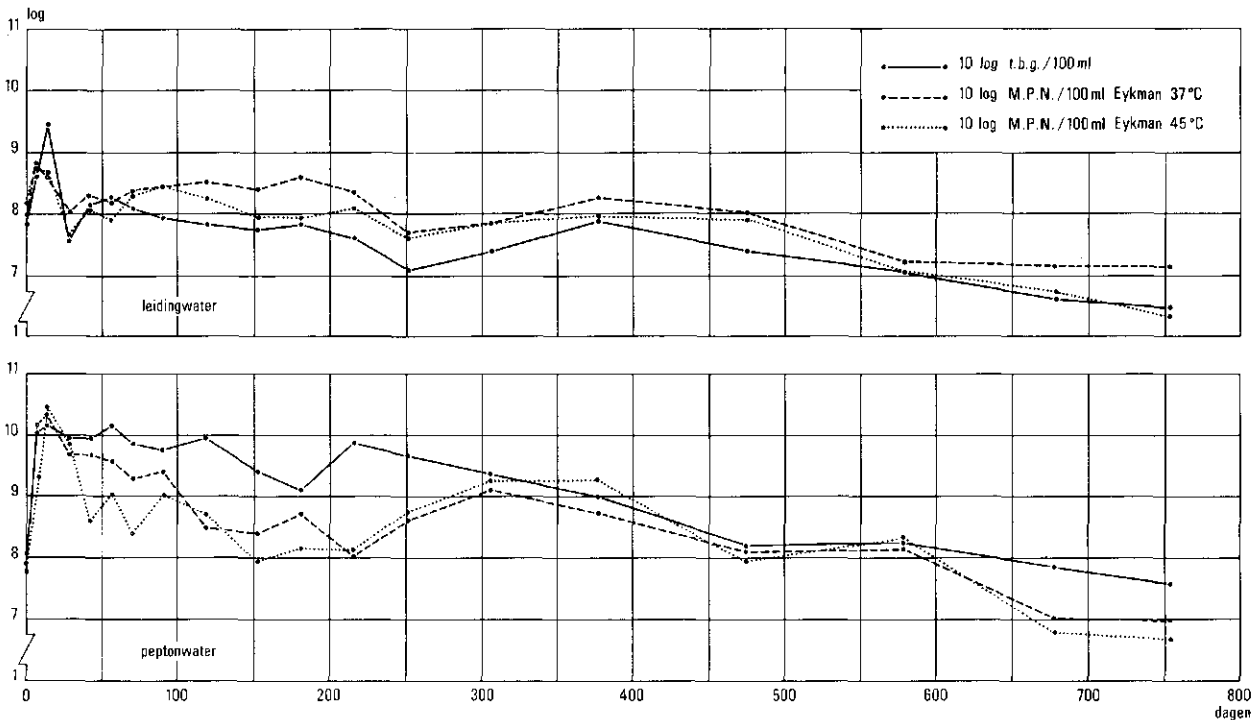
De tot dusver verkregen resultaten zijn weergegeven in afb. 2.

Discussie

Het blijkt dat zowel in leidingwater (met entsuspensie) als in peptonwater de bacterie-aantallen na de enting nog vrij sterk zijn toegenomen, nl. respectievelijk tot ongeveer 10 en 100 maal de uitgangstoestand. Daarna bleven ze met wat ups and downs, mogelijk als gevolg van onnauwkeurigheden in de bepalingen en in de bemonsteringstechniek, ongeveer een jaar constant om vervolgens langzaam en geleidelijk te dalen. Bij het leidingwater is na ongeveer 500 dagen het begin-aantal weer bereikt (het tbg iets eerder), bij het peptonwater is dat ongeveer 100 dagen later het geval.

De verschillen tussen de waarden verkregen met de verschillende bepalingwijzen zijn op enkele uitzonderingen na relatief gering. Van enige degeneratie (in de zin van verlies van thermotolerantie) is nog geen sprake*). Enigszins merkwaardig is dat tot nu toe in het leidingwater voor het tbg

*) Een aantal onderzoekers (bijv. Smit, 1931) is van mening dat faecale colibacteriën door een min of meer langdurig verblijf in water degenereren en daarbij o.a. hun oorspronkelijk aanwezige thermotolerantie kunnen verliezen, zodat ze niet meer bij 45 °C kunnen gisten.



Afb. 2 - Verloop van het *E. coli* in leidingwater en peptonwater bepaald als tbg op bouillonagar bij 37 °C en als MPN met behulp van Eijkman-vloeistof bij resp. 37 en 45 °C. De bacterieaantallen zijn uitgedrukt als 10 log. van het aantal per 100 ml.

vrijwel steeds de laagste waarden worden gevonden, terwijl dat bij het peptonwater meestal de hoogste zijn.

De proef wordt voortgezet, maar uit de geringe afneming van de bacterieaantallen tot nu toe (dus over een periode van ruim 2 jaar) volgt al wel dat *E. coli*, althans in steriel leidingwater, meerdere jaren in leven kan blijven. Het lijkt er dus op dat colibacteriën in water zich zonder meer lange tijd kunnen handhaven, maar dat de dikwijls snelle verdwijning in „natuurlijk water” wordt veroorzaakt door andere organismen, vergiftiging, verdunning of iets dergelijks.

Hiermee is echter niet verklaard waarom en hoe deze bacteriën in een milieu vrijwel zonder voedingsstoffen bij deze temperatuur zo lang in leven blijven. Volgens elders verrichte onderzoeken (Bigger 1937, Bigger and Wilson 1941 en 1943) meent men echter te hebben aangetoond dat colibacteriën onder dergelijke omstandigheden ammoniak en koolzuurgas, die in het water en/of de lucht aanwezig zijn als voedingsstoffen kunnen benutten. Colibacteriën zouden nl. facultatief auto-roof zijn. De benodigde energie zou door oxydatie van ammoniak worden verkregen. Wellicht zijn hiervoor ook nog zeer kleine hoeveelheden van sommige andere gasvormige produkten nodig.

Bij de onderzoeken van Bigger (1937) en Bigger and Wilson (1941, 1943) bleken o.a. colibacteriën in gedestilleerd water niet alleen lange tijd in leven te blijven

(335 d bij 22 °C) maar zich na de enting ook sterk te vermenigvuldigen. Gedurende de proef zijn afwisselend hoge en lage bacterie-aantallen gevonden, variërend van bijna 0 tot maximaal 400.000 per ml. Verder is ook gevonden dat gesteriliseerd water een gunstiger milieu voor deze bacteriën is dan ongestiliseerd water. Dit laatste wordt niet alleen veroorzaakt door de uitschakeling van de concurrentie van andere organismen, maar ook omdat ongestiliseerd water dikwijls groei-remmende en toxische thermolabele stoffen bevat. Toevoeging van talkpoeder aan het water had een gunstig effect op de groei. Het is echter niet duidelijk waarom dit zo is.

Naar aanleiding van de verkregen uitkomsten is een nieuwe proef begonnen waarbij dezelfde *E. colistam* in verschillende concentraties is geënt in kolven met steriel leidingwater. Een aantal kolven worden op dezelfde wijze bewaard als bij de bovenomschreven proef. Enkele zijn 3 maanden op deze wijze bewaard en vervolgens in een stikstofatmosfeer geplaatst. De duur van deze proef is echter nog te kort om nu al conclusies te kunnen trekken.

Samenvatting

In het kader van een onderzoek naar de overlevingstijd van colibacteriën in water zijn in het voorgaande de uitkomsten vermeld van een (nog voortdurende) proef. Bij deze proef zijn kolven met steriel

leidingwater en met een voedingsoplossing (peptonwater) geënt met een suspensie van *E. coli*. De kolven worden reeds ruim 2 jaar bewaard bij kamertemperatuur en in diffuus daglicht. Uit de periodiek uitgevoerde tellingen blijkt dat de bacterie-aantallen in beide milieus kort na de enting vrij sterk zijn gestegen (in peptonwater sterker dan in leidingwater), vervolgens ongeveer een jaar min of meer constant zijn gebleven en daarna geleidelijk en langzaam zijn afgenomen.

Literatuur

- Bigger, J. W. (1937). *The growth of coliform bacilli in water*. J. Path. Bacteriol. 49: 167-211.
 Bigger, J. W. and Nelson, J. H. (1941). *The growth of coliform bacilli in distilled water*. J. Path. Bacteriol. 53: 189-206.
 Bigger, J. W. and Nelson, J. H. (1943). *The metabolism of coliform bacilli in distilled water*. J. Path. Bacteriol. 55: 321-327.
 Koridon, A. H. (1971). *De invloed van biezen (Scirpus Lacustris L. SSP LAC) op het afsterven van Escherichia coli en op de afbraak van fenol*. H₂O, 4, 13, 296-298.
 Smit, J. (1931). *Het bacteriologisch drinkwater-onderzoek*. Ned. Tijdschrift. Hyg. Microbiol. en Serologie, 19-39.
 American Public Health Association (1946). *Standard Methods for the Examination of Water and Sewage*, 9th Edition: 232.
 Voets, J. P. (1966). *Leerboek in de Algemene Microbiologie*. Uitgeverij Vyncke Gent: 216.
 Lindenbergh, D. J. en Eenkhoorn, W. (1972). *Afsterving van darmbacteriën in een watermonster van de Eem en het Eemmeer*. Flevovericht nr. 83, 1972. Rijksdienst voor de IJsselmeerpolders. N 3043 (1956). Hoofdcommissie voor de Normalisatie in Nederland. *Bacteriologisch onderzoek van drinkwater*.