



150.241004

MO 86 - 03

Onderzoek naar de levensduur van
Escherichia coli in "verrijkt" zeewater
bij verschillende temperaturen.

M. Kat en J. Speur.

mb/c

lia

MO 86-02

RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK
RIJMUIDEN

RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK

Haringkade 1 - Postbus 68 - IJmuiden - Tel. (02550) 3 16 14

Afdeling: Milieu Onderzoek

Rapport: MO 86 - 03
Onderzoek naar de levensduur van
Escherichia coli in "verrijkt" zeewater
bij verschillende temperaturen.

Auteur: M. Kat en J. Speur.

mb/c
Escherichia

Project: 2 - 7128

Projectleider: Mw. M. Kat

Datum van verschijnen: Maart 1986.

	pag.
Inhoud:	
1 - Inleiding	1
2 - Methode	2
3 - Resultaten	3
3.1 - Steriel zeewater	3
3.2 - Vers zeewater	3
4 - Conclusie	4
5 - Discussie	5
6 - Literatuur	7

**DIT RAPPORT MAG NIET GECITEERD WORDEN ZONDER TOESTEMMING VAN DE
DIRECTEUR VAN HET R.I.V.O.**

2291822

1 - INLEIDING

Bij het onderzoek naar de faecale verontreiniging in de bedrijfsgeul voor Yerseke, werd geconstateerd dat de watertemperatuur een belangrijke factor bleek voor het zich handhaven of vermeerderen van Escherichia coli bacteriën in - met mosseleiwitten verrijkt - zeewater.

Uit een laboratoriumonderzoek bleek (RIVO-rapport CA 85-03), dat E. coli bacteriën zich bij 7°C in met mosseleiwitten verrijkt zeewater konden handhaven terwijl bij 23°C zelfs een enorme toename van E. coli plaats vond. Teneinde de voorwaarden voor E. coli toename in zeewater te onderzoeken, werd het laboratoriumonderzoek voortgezet in zowel steriel gefiltreerd "aged" zeewater als in natuurlijk vers zeewater, bij meer uitgebreide temperatuur variatie, gedurende 7 dagen.

Ondermeer werd daarbij nagegaan of organische verbindingen afkomstig van zeesla (Ulva lactuca) - een mogelijk probleem in de omgeving van Yerseke - van invloed zouden kunnen zijn op de levensduur van E. coli in zeewater.

2 - METHODE

Voor het onderzoek werd "aged" zeewater en vers kustwater gebruikt met een zoutgehalte van 28 g/kg. "Aged" zeewater werd steriel gefiltreerd door een cellulose acetaat-filter met een poriënwijsdte van 0.45 µm (I). Het verse zeewater werd door een steriel vouwfilter (Ederol no. 1) geleid, waardoor het grootste gedeelte van de natuurlijk aanwezige bacterie-flora behouden bleef (II).

Beide portie's behandeld zeewater werden vervolgens beënt met E. coli (eigen stam). In deze bacterie suspensies werd na zorgvuldige menging ($\frac{1}{2}$ uur) het aantal bacteriën bepaald waarna deze suspensies in porties van 100 ml over 2 x 16 steriele infusie-flessen werden verdeeld, volgens schema:

°C	zonder toevoeging	mossel suspensie		Ulva suspensie
		0,1 ml	1 ml	
7	A	B	C	D
14	A	B	C	D
18	A	B	C	D
25	A	B	C	D

De toegevoegde mosselsuspensie bestond uit het supernatans van 10 gehakte mosselen gemengd met een dubbel volume steriel water. De organische verbindingen uit Ulva lactuca werden bereid, door de Zeesla in de Waring Blendor fijn te maken, met aged zeewater te mengen in de verhouding 3:5. Na centrifugeren werd 7,5 ml van het lichtgroene supernatans gebruikt. Vervolgens werden de blanco's (A), het met mosseleiwitten (B en C) en Ulva (D) verrijkte zeewater, bij respectievelijk 7, 14, 18 en 25°C in het donker weggezet, teneinde afsterving onder invloed van zonlicht te vermijden. Na 24, 48, 72 uur en 7 dagen werd in alle flessen het gehalte aan E. coli bacteriën bepaald in Mac Conkey medium na - resuscitatie bij 37°C - bebroeden bij 44°C.

3 - RESULTATEN

3.1 - Steriel zeewater

De resultaten van het onderzoek uitgevoerd in het door filtratie gesteriliseerde zeewater worden weergegeven in figuur 1 A t/m D.

Figuur 1 A. In het steriele zeewater zonder toevoegingen neemt de die-off van E. coli geleidelijk toe, naarmate de temperatuur stijgt. Na een week bebroeden bij 25°C was van de oorspronkelijke E. coli-concentratie nog slechts 20% over, terwijl bij de laagste temperatuur van 7°C de aanvangsconcentratie vrijwel gehandhaafd bleef. Bij de tussenliggende temperatuur van 14 en 18°C verloopt de afname over 7 dagen naar resp. 66 en 50% van de oorspronkelijke E. coli-concentratie.

Figuur 1 B. Door geringe toevoeging van mosseleiwitten vindt bij de hoogste temperatuur van 25°C een geleidelijke toename plaats in de eerste 3 dagen, daarna viel na 7 dagen een geringe afname te bespeuren. Bij 7, 14 en 18°C bleef de aanvangconcentratie aan E. coli gedurende de periode van onderzoek vrijwel gehandhaafd.

Figuur 1 C. Bij hogere dosering aan mosseleiwitten wordt bij 25°C zelfs een iets grotere geleidelijke toename aan E. coli aangetroffen dan in geval B, welke na 7 dagen nog niet is geeindigd.

Deze geleidelijke toename werd - hoewel op lager niveau eveneens aangetroffen bij 18°C, waardoor deze voor E. coli blijkbaar gunstige omstandigheden zich onderscheidde van de waarnemingen bij 7 en 14°C waar de E. coli-concentratie's gedurende de gehele periode van onderzoek vrijwel constant bleven.

Figuur 1 D. De zeewater - Ulva Suspensie had een gunstige invloed op de groei van E. coli. Bij 25°C en in mindere mate bij 18°C. Bij 18°C vond geleidelijke toename plaats, bij 25°C daarentegen was de groei explosief te noemen.

Bij 7°C en 14°C bleef de E. coli-concentratie op hetzelfde niveau.

3.2 - Vers zeewater

De resultaten van het onderzoek uitgevoerd in het over steriel filtreerpapier (Ederol No. 1) geleide zeewater worden weergegeven in figuur 2 A t/m D.

Figuur 2 A. In het zeewater zonder toevoegingen bleef bij 14, 18 en 25°C de E. coli-concentratie gedurende 2 dagen vrij constant. Na 7 dagen was de die-off bij genoemde 3 temperaturen volledig in tegenstelling tot de waarnemingen bij 7°C, waar de aanvangsconcentratie gedurende de onderzoeksperiode nauwelijks was afgenomen.

Figuur 2 B. In het verse zeewater met de geringe hoeveelheid mosseleiwitten

vond aanvankelijk (na 1 dag) toename plaats van E. coli bij 25°C. Na 2 dagen werd reeds afname geconstateerd en na 7 dagen was de die-off volledig. Ook bij 14 en 18°C werd na het aanvankelijk handhaven van de E. coli-concentratie, een volledige die-off geconstateerd na 7 dagen. Alleen bij 7°C vond vrijwel geen verandering plaats in de E. coli-hoeveelheid.

Figuur 2 C. Bij de hogere dosering aan mosseleiwitten in vers zeewater vond bij 25°C gedurende de eerste 2 dagen zelfs een forse toename plaats.

Na 7 dagen was de E. coli-concentratie afgenomen en weinig minder dan de aanvangsconcentratie. Bij de lagere temperaturen van 7, 14 en 18°C vonden slechts geringe fluctuaties in E. coli-concentratie plaats.

Figuur 2 D. Een verrassende toename leverde de organische stof uit Ulva op de E. coli-concentratie bij 25°C. Deze hoge concentratie lijkt zich ook na 7 dagen nog voort te kunnen zetten. Ook bij 18°C vond - hoewel minder snel - toename van E. coli plaats in de gehele onderzoeksperiode van 7 dagen. Bij 7 en 14°C werden wederom vrij constante E. coli-concentraties aangetroffen.

4 - CONCLUSIE

Uit de tot dusver beschreven resultaten blijkt, dat zeewater (28 g/kg) verrijkt met organische stoffen uit zowel mosselen als Ulva lactuca een voedingsbodem kan gaan vormen voor Escherichia coli. De temperatuur en de aanwezigheid van andere zeewater-bacteriën zijn daarop van invloed. Hoe hoger de temperatuur van het verrijkte zeewater (tot 25°C) des te groter de E. coli-ontwikkeling terwijl daarentegen bij temperaturen van 14°C of lager een toename achterwege blijft.

Wanneer inplaats van steriel zeewater gebruik wordt gemaakt van vers zeewater waarin nog een groot gedeelte van de natuurlijke bacterieflora, treedt in de eerste dagen nog wel een ontwikkeling van E. coli op, in het met mosseleiwitten verrijkte zeewater, doch daarna neemt deze drastisch af, vermoedelijk door competitie met de natuurlijke zeewaterbacteriepopulaties. In het met Ulva lactuca verrijkte zeewater vindt daarentegen bij 25°C na 7 dagen nog geen afsterving plaats. Ook bij 18°C wordt zowel in gefiltreerd als in natuurlijk zeewater ook na een week nog toename van E. coli waargenomen. Bij de verrijking van Ulva ziet het er zelfs naar uit, dat de natuurlijke flora de ontwikkeling van E. coli zelfs ondersteunt.

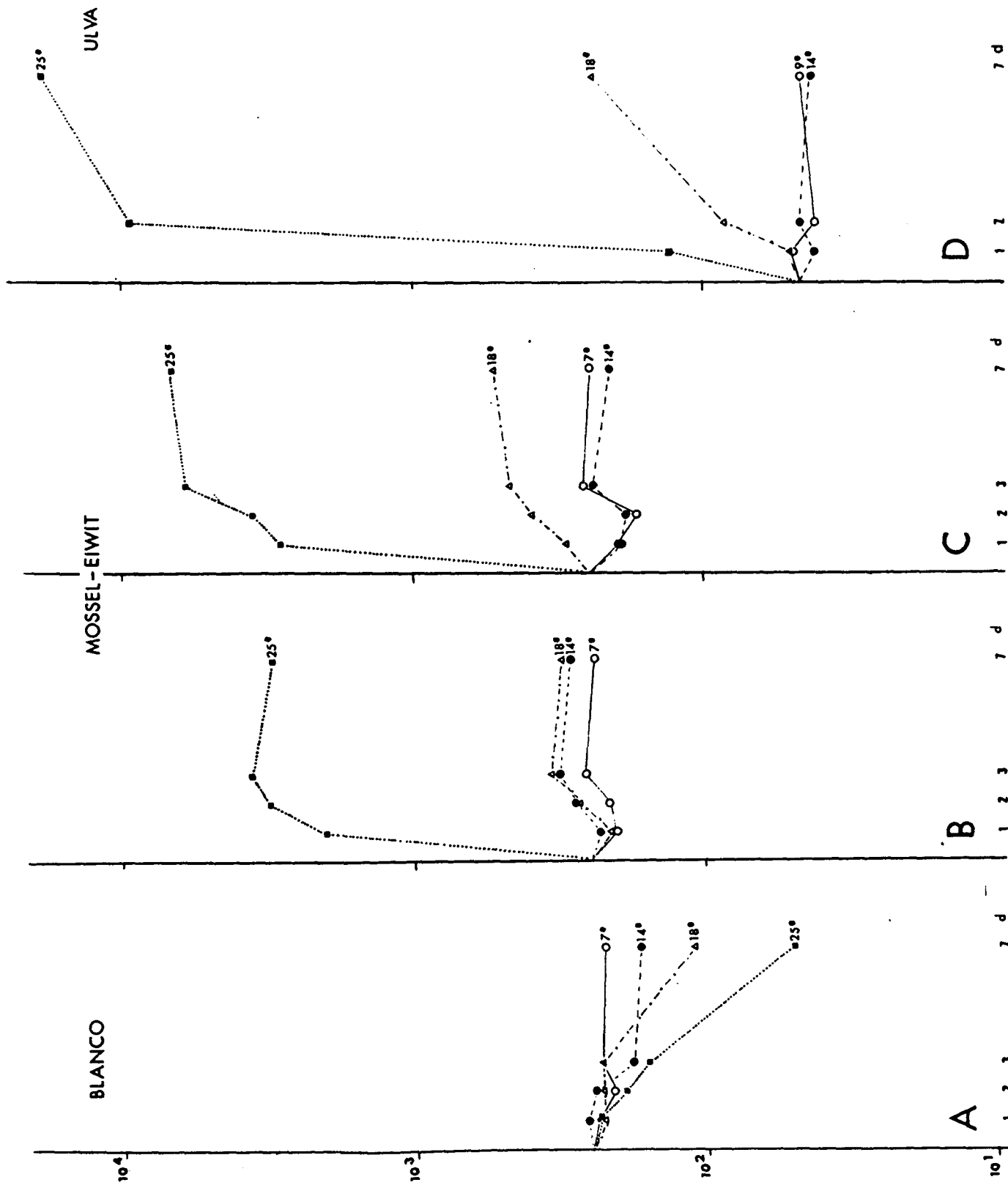
5 - DISCUSSIE

Het voortbestaan van darmbacteriën in zeewater hangt af van een groot aantal factoren. Zoals uit dit RIVO-onderzoek bleek, kunnen E. coli-bacteriën in zeewater, bij betrekkelijk lage temperaturen onder geringe lichtomstandigheden zich tenminste een week handhaven. Een soortgelijk resultaat kwam uit het onderzoek van Nakayama en Ohno (1981) naar voren. In het donker kunnen E. coli-bacteriën zich gedurende 6 dagen in zuiver zeewater handhaven, daarin overtroffen door Salmonella typhimurum-bacteriën, welke het onder dezelfde omstandigheden zelfs 15 dagen volhielden. De geconstateerde toename van het aantal E. coli-bacteriën in zowel steriel als natuurlijk zeewater boven 14°C (18 en 25°C) werd ondersteund door de aanwezigheid van mosseleiwitten en celinhoud van Ulva lactuca. Onder natuurlijke omstandigheden werd reeds de invloed van sediment op de E. coli-concentratie in zeewater belicht (RIVO-rapport CA 85-03). Zelfs het geautoclaveerde slib uit gebieden welke bloot staan aan lozingen van huishoudelijk afvalwater, bracht voldoende nutriënten in het zeewater om E. coli tot ontwikkeling te brengen (Gerba en MacLeod, 1976). Daartegenover staat, dat in de natuur ook antibacteriële activiteiten optreden zoals predatie, bacteriofagen, nutriëntentekort. Sommige (micro)-organismen kunnen stoffen uitscheiden, welke de bacteriegroei remmen (Aubert e.a. 1964), terwijl lysis van E. coli kan worden veroorzaakt door een natuurlijke bacteriepopulatie van Pseudomonas, welke E. coli als koolstofbron benut (Mitchell and Morris, 1969). Fysisch chemische factoren, zoals verschillen in osmotische druk en pH oefenen invloed uit op de bacteriepopulaties terwijl zonlicht eveneens een bactericide effect teweegbrengt. Naast het aantal effecten, welke het bestaan en de ontwikkeling van E. coli-bacteriën ondersteunen, - zoals genoemd in RIVO-rapport CA 85-03 en dit rapport, - wordt in de natuur de afsterving van faecale coli bacteriën grotendeels bevordert door het zonlicht. Direct zonlicht kan bij 15 - 25°C ongeveer 90% van het aantal faecale coliforme (waaronder E. coli) binnen 30 minuten doen afsterven. Dit onderzoeksresultaat werd verkregen op Hawaï (Fujioka and Narikawa 1981). Het bactericide effect van het zonlicht is echter sterk aan plaats en seizoen (=zonnestand) gebonden. In Vineyard Sound (Massachusetts) varieerde de T 90 (= 90% sterfte) voor E. coli van 14 uur in juli tot 46 uur in november (Vaccaro e.a. 1950). Ook is het bactericide effect van zonlicht in de oppervlaktelaag groter dan in de diepte, hoewel het genoemd effect tot op 3,30 m diepte merkbaar kan zijn, zolang het zeewater helder is.

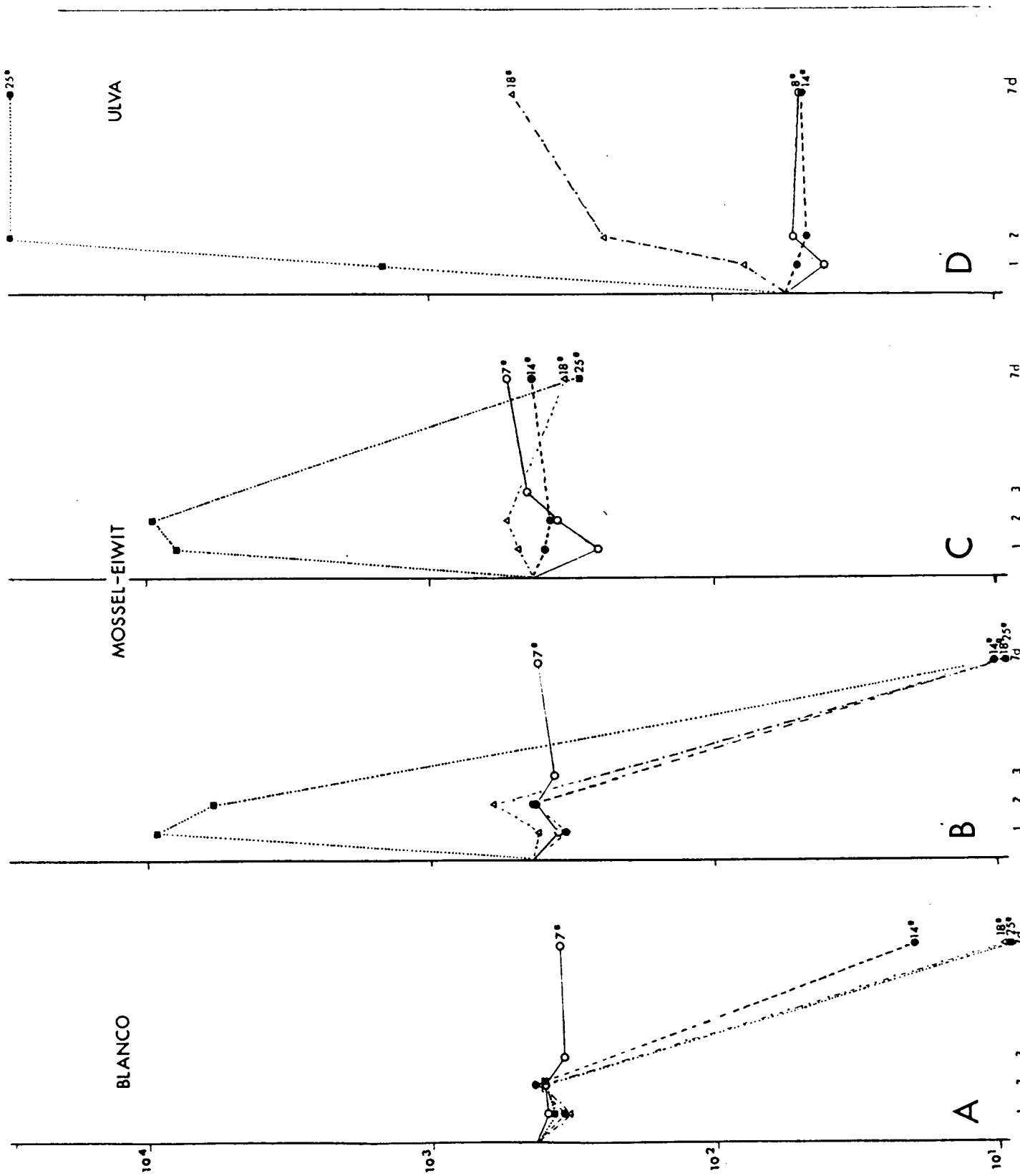
De resultaten van dit onderzoek wijzen erop, dat de groei van de E. coli-bacteriën, zoals veelvuldig aangetroffen in de bedrijfsgeul, niet alleen door slib (RIVO-rapport CA 85-03) maar ook door mosseleiwitten en organische stoffen uit zeesla kan worden aangewakkerd, naarmate de temperatuur van het water stijgt. Wanneer op enige afstand van de kust bij Yerseke, de zichtdiepte door vertroebeling van het water sterk afneemt, zal het bacteriedodend effect door directe zonnestraling eveneens sterk afnemen. De balans zal daarbij doorslaan in het voordeel van de (E.coli) bacteriën. Onder genoemde omstandigheden zal dan ook de kans op drastische verbetering van de sanitaire waterkwaliteit gering zijn. Zolang de troebelheid van het water door lozing van afvalwater, rijk aan organisch materiaal onverkort voortgang vindt, zal de kans op een drastische verbetering van de sanitaire waterkwaliteit gering zijn.

6 - LITERATUUR

- Aubert, M., H. Lebout and J. Aubert, 1964 - Role of plankton in the antibiotic activity of seawater.
Ann. Inst. Pasteur, Paris. 106 p.p. 147 - 150.
- Fujioka, R.S., O.T. Narikawa, 1982 - Effect of Sunlight and Enumeration of Indicator Bacteria under Field Conditions.
Applied and Environmental Microbiology. Aug. 1982 p.p. 395 - 401.
- Gerba, C.P., and J.S. MacLeod, 1976 - Effects of Sediments on the Survival of Escherichia coli in Marine Waters.
Applied and Environmental Microbiology. July 1976 p.p. 114 - 120.
- Kat, M., en J. Speur, 1985 - Samenvatting onderzoek naar de oorzaak en gevolg van de onbevredigende Sanitaire Waterkwaliteit in de Bedrijfsgeul voor Yerseke.
RIVO-rapport CA 85-03.
- Mitchell, R., and J.C. Morris, 1969 - The fate of intestinal bacteria in the Sea .
Proc. 4th int. Conf. Wat. Pollut.Res. Prague p.p. 811 - 821
- Nakayama, O., and M. Ohno, 1981 - Bactericidal effect of Seawater Containing Digested Night Soil and Marine Plankton against Intestinal Bacteria.
Bull. Jap Soc. Sci. Fish 47(2) p.p. 165 - 169.
- Vaccaro, R.F., M.P. Briggs, C.L. Carey and B.H. Ketchum, 1950 - Viability of Escherichia coli in Sea Water.
Am. J. Public Health, 40, p.p. 1257 - 1266.



FIGUUR 1 - Verloop *E. coli* concentratie in steriel zeeewater



FIGUUR 2 - Verloop *E. coli* concentratie in vers natuurlijk zeeewater