

# Sulfittreducerende klostridier som mål på vannkvalitet

Av Ivar Hellesnes og Bjørn Mære

Ivar Hellesnes er veterinær fra NVH 1971 og arbeider som kontrollveterinær i Trondheim kommune.

Bjørn Mære er veterinær fra NVH 1977 og driver privat praksis i Åndalsnes.

Arbeidet som er referert nedenfor, er utført ved Institutt for næringsmiddelhygiene, NVH.

## Innledning

Interessen for bruk av bakteriologiske metoder ved overvåking av vannkvalitet er økende i vårt land. Betegnelsen «resipientbakteriologi» har vært brukt om slike undersøkelser (9). De aktuelle metodene har mange anvendelsesområder. De er følsomme og spesifikke og vil kunne supplere tradisjonelle fysikalsk-kjemiske metoder, og dessuten gi kunnskap om forhold i vann som ikke kan oppnås på annen måte (6, 7 og 12).

Betegnelsen «indikatorbakterier for fekal forurensing» nyttes om bakterier som finnes konstant i avføring fra varmblodige dyr og mennesker, og som ikke kan formere seg i naturlige vannforekomster. Påvisning av slike bakterier forteller om forekomst av avføring i vannet (7).

I den bakteriologisk-hygieneiske kontrollen av drikkevann har undersøkelse for koliforme bakterier (KB) og termostabile koliforme bakterier (TKB) vært nærmest enerådende her i landet. I vår eneste standardmetode for bakteriologisk undersøkelse av vann, Norsk Standard 4751, er disse parameterne det sentrale.

Dette er naturlig fordi TKB er den mest følsomme og sikreste parameter for fekal forurensing.

Det er imidlertid også andre bakterietyper som egner seg som indikatorer ved bakteriologisk-hygieneiske vannundersøkelser. De viktigste er sulfittreducerende klostridier og fekale streptokokker. Klostridiene, og spesielt *Clostridium perfringens*, har de siste åra fått ny oppmerksomhet som vannkvalitetsindikatorer (2, 4 og 8).

I denne artikkelen skal det redegjøres for undersøkelser med hensyn på sulfittreducerende klostridier i ureint vann. En diskusjon over bruken av denne parameteren i vannovervåkingssammenheng vil også bli gitt.

## Om parameteren «sulfittreducerende klostridier» (SK)

Den viktigste bakteriearten i gruppa SK er *Clostridium perfringens*. Dette er en gram-positiv, anaerob, sporedannende stavbakterie som fermenterer laktose, sukrose og inositol med gassproduksjon, gir

«stormgjæring» på lakmusmelk, reduserer sulfitt til sulfid ( $H_2S$ , reduserer nitrat, hydrolyserer gelatin og produserer lecitinase og sur fosfatase.

Ifølge *Bergey's Manual* (1) omfatter slekta *Clostridium* 61 arter. Av disse er *C. perfringens* den som oftest finnes i avføring i store mengder, i humanfeces  $10^4$ — $10^5$  bakt. pr. gram. Antallet fekale streptokokker og TKB ligger for sammenlikning i området  $10^5$ — $10^7$  bakt. pr. gram. I alt 28 klostridiearter kan produsere  $H_2S$ , men det er angitt at mer enn 95% av SK som finnes i human avføring, er *C. perfringens*. I naturen vil *C. perfringens* ikke formere seg, men gå langsomt til grunne. Både sporer og vegetative celler er relativt motstandsdyktige mot miljøpåvirkninger (3).

Noen av de andre sulfittreduserende sporedannerne er naturlig forekommende i visse akvatiske miljøer og kan derved gi falske positive resultater. Dette gjelder klostridier som bryter ned organisk stoff i sedimenter og jordsmonn, og resultater fra undersøkelse av slikt materiale må derfor vurderes med forsiktighet.

Utenom *C. perfringens* er det også andre klostridier med tarmen som sitt naturlige habitat som reduserer sulfitt til  $H_2S$ . Påvisning av disse vil dermed også være indikasjon på fekal forurensing.

### Epidemiologisk interesse

*C. perfringens* er en viktig årsak til sjukdom på mennesker og dyr. Den er kjent som matforgiftningsbakterie (eks. oppvarmet lapskaps), og på spebarn og speddyr kan den gi ei rekke ulike sjukdomstilstander med utgangspunkt i tarminfeksjon og toksindannelse.

Det må imidlertid påpekes at det ikke fins data som antyder at overføring med

vann er viktig i de nevnte sjukdommenes epidemiologi (4). Betydningen innen vannbakteriologien begrenser seg derfor til SK som indikator på fekal forurensing.

### Materiale

Vannprøver ble henta fra fire prøvesteder i Oslo, hver gang mandag morgen ca. kl. 0900. Prøvestedene var:

Frognerelva ut fra Frognerparken

— «forurensa elv»

Oset av Frognerelva i Frognerkilen

— «brakkvann, kloakktilblanda»

Råkkloakk til Skarpsno renseanlegg

— «råkkloakk»

Fullrensa vann fra Skarpsno renseanlegg

— «kloakkvann, fullrensa».

Skarpsno kloakkrenseanlegg er et fullrenseanlegg med simultantfelling. Anlegget er belasta med 65.000 personenheter, mens det er dimensjonert for 50.000 p.e. Tilførselen er hovedsakelig boligkloakk med noe tilblending fra næringsvirksomhet.

### Metoder

#### *Sulfittreduserende klostridier*

Prøvevannet ble fortynnet med steril 0,9% NaCl til passende konsentrasjoner. Deretter ble det sådd ut 5 paralleller à 5 ml vann fra hver fortykning i reagensrør. Det ble brukt ca. 15 ml jernsulfittagar til hvert reagensrør med prøvevann. Mediet hadde følgende sammensetning:

Trypton (Difco 0123)	15,0 g
Natriumsulfid ( $Na_2SO_3$ )	1,8 g
Jerncitrat ( $Fe(III) C_6 H_5 O_7$ )	0,75 g
Agar-agar	22,5 g
Destillert vann	ad 1000 ml

Mediet ble autoklavert ved tillaging, lagra ved +4°C inntil 14 dager og smelta før bruk. Når agaren var størknet etter utsæd, ble det helt på enda 2—3 ml agar for å sikre anaerobe forhold.

Inkubering ble foretatt på vannbad ved 44°C.

Avlesing etter 24 t av nøsteformete, svarte kolonier > 1 mm i diameter.

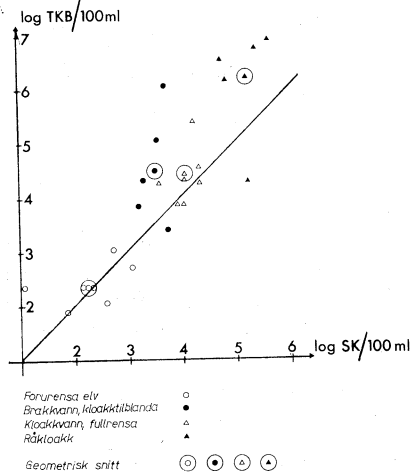
### Termostabile koliforme bakterier

TKB ble bestemt i henhold til Norsk Standard 4751 (Most Probable Number, MPN-metode). Ved primærutsæd ble det benyttet McConkey's buljong (Oxoid) istedenfor laktose-peptonbuljong.

### Verifisering av *Clostridium perfringens*

For å finne ut hvor mange av de registrerte SK fra forurensa elv og fullrensa kloakkvann som var *C. perfringens*, ble kolonier fra jernsulfittagar overført til Robertsons medium (11) og inkubert ved 37°C i 24 t. Deretter utsæd på blodagar med anaerob inkubering ved 37°C i 24 t. Koloniene på blodagar ble så undersøkt

Forekomst av indikatorbakterier i ureint vann.



Figur 1.

m.h.p. kolonimorfologi, mikroskopisk bilde, hemolyseforhold, lecitinaseproduksjon og aerob vekst før diagnosen *C. perfringens* ble stilt. I alt 206 kolonier ble testa.

Tabell 1

Sulfittreduserende klostridier (SK) og termostabile koliforme bakterier (TKB) i ulike vanntyper.

	SK		TKB		Antall obser- vasjo- ner
	geometr. middel- tall	laveste og høyeste tall	geometr. middel- tall	laveste og høyeste tall	
Forurensa elv	$1,8 \times 10^2$	$(1,2 \times 10^1 - 1,2 \times 10^3)$	$2,5 \times 10^2$	$(7,9 \times 10^1 - 1,1 \times 10^3)$	7
Brakkvann kloakktil- blanda	$3,2 \times 10^3$	$(1,6 \times 10^3 - 5,5 \times 10^3)$	$3,3 \times 10^4$	$(2,2 \times 10^3 - 1,1 \times 10^6)$	5
Kloakkvann fullrensa	$1,3 \times 10^4$	$(4,0 \times 10^3 - 2,3 \times 10^4)$	$3,0 \times 10^4$	$(7,0 \times 10^3 - 2,4 \times 10^5)$	7
Råkloakk	$1,6 \times 10^5$	$(5,5 \times 10^4 - 4,6 \times 10^5)$	$1,7 \times 10^6$	$(2,0 \times 10^4 - 8,0 \times 10^6)$	6

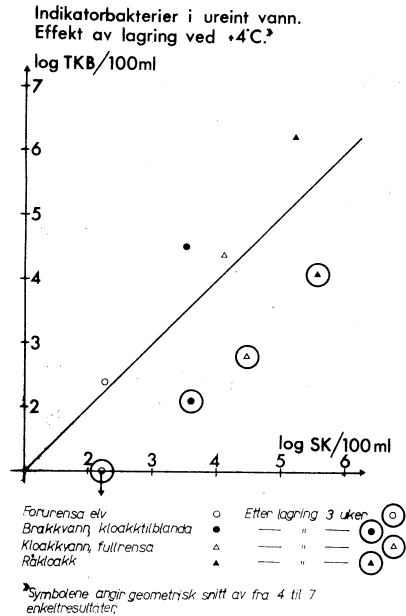
### Pasteurisering av prøvene

En del av prøvene ble sådd ut parallelt både med og uten varmebehandling ved 80°C i 5 minut for å registrere forholdet mellom vegetative celler og sporer av *C. perfringens*.

### Resultater

Påviste mengder av SK og TKB i vannprøvene er ført opp i Tabell 1. Geometrisk middeltall samt høyeste og laveste verdi er angitt. De samme resultatene finnes på Figur 1.

Effekt av lagring ved + 4°C på de undersøkte bakteriegruppene framgår av Figur 2. Lagringstid var fra 23 til 28 døgn. Resultatene fra verifiseringsforsøket av SK er ført opp i Tabell 2.



Figur 2.

Tabell 2

Verifisering av sulfittreducerende klostridier som *C. perfringens* fra upasteuriserte og pasteuriserte prøver.

Kolonitype	Upasteuriserte prøver	Pasteuriserte prøver	Totalt
Svarte, nøsteforma kolonier >1 mm	112/142 <sup>x</sup> (79%)*	28/34 ( 82%)	140/176 (80%)
Svarte, nøsteforma kolonier <1 mm	10/18 (56%)	3/3 (100%)	13/21 (62%)
Svarte, uregelmessige kolonier	5/8 (63%)	0/1 ( 0%)	5/9 (56%)
<b>Totalt</b>	<b>127/168 (76%)</b>	<b>31/38 ( 82%)</b>	<b>158/206 (77%)</b>

x Angir antall verifiserte *C. perfringens* av antall undersøkte kolonier.

\* Tallene i parentes angir antall verifiserte *C. perfringens* i % av antall undersøkte kolonier.

Tabell 3

Verifisering av sulfittreducerende klostridier som C. perfringens fra forurensa elv og fullrensa kloakkvann.

Kolonitype	Fullrensa kloakkvann	Forurensa elv	Totalt
Svarte, nøsteforma kolonier >1 mm	77/93 <sup>x</sup> (83%)*	39/51 (76%)	116/144 (81%)
Svarte, nøsteforma kolonier <1 mm	4/6 (67%)	4/9 (44%)	8/15 (53%)
Svarte, uregel- messige kolonier	7/9 (78%)	0/3 (0%)	7/12 (58%)
Totalt	88/108 (81%)	43/63 (68%)	131/171 (77%)

x: Angir antall verifiserte C. perfringens av antall undersøkte kolonier.

\* Tallene i parentes angir antall verifiserte C. perfringens i % av antall undersøkte kolonier.

Tabell 3 angir verifisering fordelt på vanntypene forurensa elv og fullrensa kloakkvann.

### Diskusjon

Resultatene for SK og TKB for de ulike vanntypene stemmer godt overens med de funn *Bonde* (3), og *Langeland* (10) oppgir.

Det er godt samsvar mellom mengdene av SK og TBK i de ulike vanntypene. I de fleste prøvene er det litt flere TKB enn SK. I avføring regner en med  $10^6$ — $10^7$  TKB pr. gram og  $10^4$ — $10^5$  SK pr. gram. Dette tilsvarer en forskjell mellom TKB og SK i avføring på fra 1 til 3 log-enheter. Etter fortynning i vann skulle en forvente den samme forskjellen. Dette

er ikke påvist i vår undersøkelse, idet forskjellene her, basert på de geometriske middeltallene, var på fra 0,15 til 1,0 log-enheter. Dette kan tyde på at SK er mer resistent enn TKB overfor desimeringsfaktorene i de vanntypene som er undersøkt, og bekrefter de funn som *Bisson og Cabelli* (2) har gjort i Narragansett Bay, USA.

Ofte er det uråd å få undersøkt vannprøver like etter uttak. Da er det gunstig å kunne undersøke for en parameter som bare i liten grad påvirkes av transport og lagring. Våre undersøkelser av lagringens betydning for TKB og SK indikerer at SK er en nyttig parameter i så måte. Figur 2 viser at mengden SK holder seg nærmest konstant i 3—4 uker ved kjøle-romslagring, mens mengden TKB reduse-

res med flere tier-potenser. *Bisson og Cabelli* (2) har gjort liknende iakttagelser og har påvist at mens vegetative celler av *C. perfringens* desimeres i en grad som kan sidestilles med TKB, holder sporeantallet seg nærmest konstant i resipientvann i 14 døgn.

I en del prøver er det påvist litt høyere verdier for SK etter lagring enn før. Dette er særlig tilfelle for prøver med høyt innhold av organisk stoff (råkloakkvann og fullrensa kloakkvann). Vi antar dette ikke er en reell økning av mengden SK, men at det skyldes at enkeltbakterier frigjøres fra større bakteriehopet i og med at det organiske stoffet som bakteriene er adherert til, brytes ned.

Bruk av SK som mål for *C. perfringens* og dermed fekal forurensing av vann har møtt en del motstand, hovedsakelig p.g.a. angivelig for høy prosent falske positive kolonier i mediet. Våre verifiseringsforsøk gjengitt i Tabell 2 viser imidlertid at ca. 80% av alle undersøkte typiske kolonier lot seg verifisere som *C. perfringens*. *Bonde* (3) oppgir verifisering av ca. 95%. Metodisk er det en del problemer forbundet med en slik verifisering, og det reelle tallet ligger antagelig høyere enn det våre resultater antyder. Blant dem som ikke lar seg verifisere som *C. perfringens*, vil en dessuten ha andre SK som også har tarmen som sitt naturlige miljø og derfor er reelle indikatorer på fekal forurensing.

*Bonde* (3) angir at prøver for undersøkning med hensyn på SK med fordel kan pasteuriseres ved 80°C i 5 minutter før utsæd for dermed bare å påvise bakteriesporer. Dette er imidlertid noe omstridt, idet det er sporer av en del stammer av *C. perfringens* som ikke vil overleve en slik oppvarming (4), samtidig som en del sporer vil germinere ved den samme oppvarminga. Resultater fra pasteuriserte og upasteuriserte prøver kan dermed ikke umiddelbart sammenliknes. Våre verifiseringsforsøk viser at andelen SK som er *C. perfringens*, er om lag lik pasteuriserte og upasteuriserte prøver (Tabell 2).

Undersøkning med hensyn på SK foretas rutinemessig på næringsmidler, bl.a. i forbindelse med oppklaring av matforgiftninger. Tidligere anbefalte Nordisk meto-dikk-komité for næringsmidler bruk av jernsulfittagar ved slike undersøkelser (NMK nr. 56, 1965). Ifølge en ny metode fra 1980 (NMK nr. 95, 1980) anbefales nå TSC-agar (tryptose-sulfitt-cycloserin-agar) ved bestemming av *C. perfringens* i næringsmidler.

TSC-agar ble opprinnelig foreslått av *Hauschild og Hilsbeimer* (5), og har vært anvendt på reint og ureint vann med gode resultat (8 og 13). Antakelig bør TSC-agar for testing med hensyn på *C. perfringens* erstatte jernsulfittagar ved undersøkning av vann for innhold av anaerobe sporebærere med opphav i avføring.

## REFERANSER

1. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Red.: R. E. Buchanan og N. E. Gibbons, 8. utg., 1974.
2. *Bisson, J. W. og V. C. Cabelli: Clostridium perfringens as a water pollution indicator*. J. W. P. C. F. 1980, 52, 241—248.
3. *Bonde, G. J.: Bacterial indicators of water pollution*. Avhandling, 4228, Teknisk forlag, København 1963.

4. Cabelli, V. C.: *Clostridium perfringens* as a water quality indicator. I: Special tech. publ. 635, Am. soc. for testing and materials, Philadelphia, USA, 1977.
5. Hauschild, A. H. W. og R. Hilsbeimer: Evaluation and modifications of media for enumeration of *Clostridium perfringens*. Appl. microbiol. 1974, 27, 78—82.
6. Hellesnes, I.: Indikatorbakterier i vann. I: Hydrobiologi. Kompendium, red.: I. Hellesnes, s. 167—187, NVH, 1977.
7. Hellesnes, I.: Indikatorer med hygienisk betydning i vann. Vann nr. 1 B, 57—75, 1979.
8. Hirn, J. og M. Raevuori: Tryptose-sulfite-cycloserine-egg yolk agar membrane filter method for the detection of *Clostridium perfringens* in water. Water Research 1978, 12, 451—453.
9. Kjos-Hansen, B.: Resipientbakteriologi. Vann nr. 1, 64—70, 1977.
10. Langeland, G.: Biologisk-hygeniske forhold ved rensing av avløpsvann. Vann nr. 1 B, 135—149, 1979.
11. Sandvik, O.: Medier, reagenser og metoder. Kompendium, NVH, 1972.
12. Østensvik, Ø.: Samtidig bruk av fysikalske, kjemiske og bakteriologiske undersøkelser ved registrering av forurensinger i vassdrag. Vann nr. 1 B, 150—157, 1979.
13. Langeland, G.: Personlig opplysning, 1981.