

Forekomst av KLEBSIELLA-bakterier i norske vassdrag med og uten utslipp av avløpsvann fra treforedlingsindustri

Av Kari S. Ormerod

Kari S. Ormerod var ansatt som forsker ved Norsk institutt for vannforskning da dette arbeidet ble utført, men er nå ansatt som forsker ved Avdeling for vannhygiene ved Statens institutt for folkehelse.

1. INNLEDNING

Klebsiella-bakterier finnes i små mengder i avføringen til varmbloedige dyr. Den finnes også i avføringen til 30—40% av alle mennesker, og kan hos enkelte komme opp i mengder på 10^4 — 10^6 bakterier per gram avføring (1). Den regnes derfor som en coliform bakterie, og den medbestemmes i de fleste analysemetoder for coliforme bakterier. Den finnes imidlertid også i naturen, og kan vokse i relativt store mengder på plantemateriale, på flater av ferskt trevirke, på bark som ligger i kontakt med vann, og kan finnes i store mengder i avløpsvann fra sukkerroe- tekstil- og treforedlingsindustri (2). Vekstundersøkelser i prosessvann fra treforedlingsindustri viste at meget rask formering fant sted ved 37°C, mens formering av *Klebsiella* ikke fant sted ved 10°C, (3). Formeringshastigheten øker derfor fra langsom til høy i temperaturområdet 10 til 37°C. Det er derfor mulig at *Klebsiella*-bakterier kan formere seg vesentlig i norske vassdrag hvis temperaturen

om sommeren stiger opp i 15—20°C, dersom egnet næringsstoff er tilstede.

I Norge er avløpsvann fra treforedlingsbedrifter den mest aktuelle kilden til forurensning med *Klebsiella*-bakterier, og med egnet næringsstoff for slike bakterier. Det er kjent at slike bakterier kan formere seg i prosessvann fra barking og papirproduksjon, og i avløpsvann fra tresliperier. Avløpsvann fra treforedlingsbedrifter med løvtrær som råstoff kan også inneholde egnet næringsstoff for formering av *E.coli* (4).

Prosessvann fra papirproduksjonen kan frembringe meget store mengder av termotolerante *Klebsiella*-bakterier, det vil si at de blir istand til å formere seg ved temperaturer opp til 44—45°C (1, 2, 5). Publikasjonene angående dette er noen år gamle, og siden den tid er det i Norge blitt vanlig å kjøre dette prosessvannet i såkalt lukket system, i den hensikt å redusere resipientens belastning med organisk stoff. Dette lukkede systemet har

ført til at prosessvannets temperatur lett kommer opp i ca. 60°C, og dette er for høyt til at *Klebsiella* klarer å vokse der og bli termotolerant. Næringsstoffene som fører til formering av *Klebsiella* vil imidlertid fortsatt være tilstede i prosessvannet. Dersom prosessvannet ikke gjennomgår tilstrekkelig rensing før det slippes til resipient, vil de normale *Klebsiella*-bakteriene, som vokser raskt ved 37°C, kunne formere seg i vesentlig grad i resipienten ved temperaturer over 10°C.

Når man vil undersøke resipientvann for grad av påvirkning med fekale utslipp, benyttes tarmbakterien *E.coli* som indikator. Som analysemetode for påvisning av denne bakterien benyttes parameteren Termotolerante coliforme bakterier. Resultatene fra disse analysene kan imidlertid mistolkes dersom termotolerante *Klebsiella* befinner seg i resipientvannet. Vannet vil bli bedømt som sterkere fekalt belastet enn det i virkeligheten er, da en del av belastningen kommer fra treforedlingsutslipp og ikke fra kloakkvann.

De fleste *Klebsiella*-artene er istand til å vokse som vanlige coliforme bakterier i analysemetoder for sistnevnte bakterier. Interferensen synes å være størst i kolonitellingsmetoder, men de kan også interferere i MPN-rør-metoder. Det er derfor ikke lett å oppdage at man har interferens av *Klebsiella*-bakterier i analysen.

Da termotolerante coliforme bakterier er foreslått som parameter for bedømmelse av generell hygienisk vannkvalitet, var det av interesse å

undersøke i hvilken grad *Klebsiella*-bakterier fra treforedlingsutslipp interfererte i analysemetoden for denne indikatoren med membranfiltermetode på M-FC medium. Interferens i membranfiltermetoden for coliforme bakterier med m-Endo Broth MF ble også undersøkt. Innholdet av normale og termotolerante *Klebsiella*-bakterier ble analysert med direkte membranfiltermetode på m-Kleb agar (1). Forskjellige kolonityper fra alle fire metodevarianter ble undersøkt videre i API-system og identifisert (6). Vassdrag med og uten forurensning fra treforedlingsindustri ble inkludert i undersøkelsen.

Resultatene foreligger i en NIVA-rapport (7), der alle detaljer er inkludert. Analysemetodene er beskrevet, også vekstmediene for *Klebsiella*. Utseendet av coliforme og *Klebsiella* kolonier på membranfiltrene, og identifikasjon av kolonier med forskjellig utseende, både positive og negative kolonier, er beskrevet. For nøyaktig beskrivelse av prøvestedene henvises det også til nevnte rapport. I denne artikkelen gjengis hovedresultatene angående vassdragenes belastning med de fire nevnte grupper av coliforme bakterier, og egnetheten av analysemetodene for totalantall og termotolerante coliforme bakterier som fekalindikator i vassdrag med utslipp fra treforedlingsindustri.

2. UNDERSØKTE VASSDRAG

Som et ledd i utprøvingen av direkte analysemetoder for *Klebsiella* i vann, ble vann fra Sognavannsbekken i Oslo analysert. Bek-

ken var belastet med tarmbakterier fra villabebyggelsen og friluftområdet i nedbørfeltet, men mottok ikke industrielt avløpsvann. Resultatene fra denne bekken danner basis for innholdet av de undersøkte parametre i et rent kloakkvannbelastet vassdrag.

Akerselva i Oslo ble valgt som representant for en elv uten treforedlingsutslipp. Elva blir fra sitt utløp fra Maridalsvannet til sitt innløp i Oslofjorden belastet med både kommunalt og industrielt avløpsvann. Prøvene ble tatt i midten av oktober 1985, og vanntemperaturen var mindre eller lik 10°C på alle prøvestedene.

Vassdrag og fjorder belastet med utslipp fra treforedlingsindustri var innen rekkevidde på begge sider av Oslofjorden. I Drammenselv-vassdraget lå f.eks. Follum Fabrikker i øvre del av vassdraget og Mjøndalen Cellulose i nedre del, og Sande Paper Mill i Sandebukta. Vassdraget mottar også andre industriutslipp og kommunalt avløpsvann. Prøvene ble tatt den 29. juni 1986. Vanntemperaturen var 18—20°C de fleste prøvestedene. På østsiden av fjorden ble prøver tatt fra nedre Glåma, Tista og Iddefjorden, som alle mottok både kommunalt avløpsvann og avløpsvann fra treforedlingsbedriftene Borregaard og Greaker Industrier (Glåma), og Saugbrugsforeningen (Tista og Iddefjorden). Prøvene ble tatt 1. juli 1986, og vanntemperaturen var 18—20°C på alle prøvestedene.

Da det var av interesse å undersøke om *Klebsiella* kunne formere

seg i varmt resipientvann ble vassdrag som var belastet med utslipp fra treforedlingsindustri undersøkt så sent som mulig sommeren 1986, men før treforedlingsindustrien skulle ha felleferie.

3. ANALSEMETODER

Totalantall coliforme bakterier ble analysert med membranfilterteknikk på m-Endo Broth MF ifølge NS 4751 (8), men kolonitypene ble spesifisert ifølge den originale forskriften i U.S. Stand. Meth. (9).

Termotolerante coliforme bakterier, TCB, ble analysert med membranfilterteknikk på M-FC Agar ifølge U.S. Stand. Meth. (9).

Totalantall og antall termotolerante *Klebsiella* ble analysert med membranfilterteknikk på m-Kleb agar med inositol som forgjærbart substrat (1, 7). Totalantall *Klebsiella* fremkom etter inkubering ved 37°C i 24—48 timer, og termotolerante *Klebsiella*, TKB, etter inkubering ved 44,5°C i 48 timer.

Prøven fra Sognsvannsbekken ble analysert for *Klebsiella* ved bruk av M-FC-IC agar, også med inositol som forgjærbart substrat (5).

4. RESULTATER

Etter utslipp til resipient vil coliforme bakterier fra kloakkvann vanligvis ikke kunne formere seg. De finner ikke tilstrekkelige mengder av egnede næringsstoffer i resipientvannet, og inaktiveres derfor ved at de bruker opp sine energireserver. Vannet er også vanligvis for kaldt for rask formering av slike tarmbakterier. De inaktiveres

også under påvirkning av sollys, og de kan sedimentere eller bli spist av protozoer i resipientvannet. Inaktivering går saktere under isen om vinteren beskyttet mot lys enn ved lange, lyse dager om sommeren. De forskjellige typer coliforme bakterier, *Klebsiella* inkludert, kan ha forskjellig evne til å overleve i resipienten. Etter en tids opphold i resipientvannet vil bare de mest resistente være tilbake, og forholdet mellom de ulike typer tarmbakterier kan være et helt annet enn da utslippet fant sted. Hvis noen coliforme bakterier er istand til å formere seg i resipientvannet, vil antallet av disse kunne øke i forhold til de som bare blir inaktivert, og dette vil også bidra til at de nevnte forholdstall forskyves enda mer. Egne tabeller for de funne forholdstallene er presentert i hovedrapporten (7).

4.1 Resultater fra vassdrag uten treforedlingsutslipp

I prøven fra Sognsvannsbekken, som mottar bare fekal forurensning, var innholdet av termotolerante coliforme bakterier, TCB, ca. 50% av totalantall coliforme bakterier, som lå på nivå ca. 1000 coliforme per 100 mL, se tabell 1. Innholdet av *Klebsiella*-bakterier var ca. 12% av de coliforme, derav 2% termotolerante. Dette ansees som normalt for kloakkbeltede vassdrag, og er i overensstemmelse med utenlandske undersøkelser (1).

Det var et uventet høyt innhold av coliforme bakterier i Akerselva ved utløpet fra Maridalsvannet, se tabell 1. Forholdet mellom TCB og totalantall coliforme bakterier var som for Sognsvannsbekken, men innholdet av *Klebsiella* var mye lavere. Ved dette prøvestedet kunne ikke Akerselva ha mottatt vesent-

Tabell 1. Coliforme bakterier og *Klebsiella* i Akerselva og Sognsvannsbekken, Oslo.

PRØVESTED	Coliforme bakt./100 mL		<i>Klebsiella</i> / 100 mL	
	Totalantall	Termotolerante	Totalantall	Termotolerante
Sognsvannsbekken	980	450	120	19
1. Utløp Maridalsvann	34	18	1	< 0,5
2. Nydalen	> 300	> 470	48	< 1,5
3. Treschowbrua	3 500	1 400	ca. 200	ikke anal.
4. Bentsebrua	9 600	3 900	3 100	< 3
5. Oslo Lysverker	14 000	8 900	1 700	< 10
6. Legevakta	26 000	12 000	4 800	< 10

lige mengder forurensning fra mennesker. De coliforme bakteriene antas å komme fra de store måkeflokkene som hver ettermiddag hviler på Mariadalsvannet (10, 11).

Ved demningen i Nydalen var den fekale belastningen allerede så mye høyere enn antatt at eksakt konsentrasjon av coliforme bakterier og TCB ikke kunne beregnes. Den fekale belastningen økte nedover i vassdraget. Ved alle prøvestedene ble *Klebsiella* påvist, men vannet inneholdt ikke termotolerante *Klebsiella*. Ved Bentebruva var det nær like mange *Klebsiella* som TCB i vannet. De fleste av disse har antakelig kommet inn i elva med avløpsvann fra næringsmiddelindustri, da elvevannet var for kaldt til rask formering av *Klebsiella*-bakterier.

4.2 Resultater fra vassdrag med treforedlingsutslipp

Tabell 2 viser resultatene fra undersøkelser i Drammenselv-vassdraget og Sandebukta, og tabell 3 resultatene fra undersøkelser i nedre del av Glåma, i Tista og Iddefjorden.

Ved å studere tabellene kan man se at elver som mottar utslipp fra treforedlingsindustri inneholder svært høye konsentrasjoner av både coliforme bakterier og *Klebsiella*. Ved mange prøvesteder nedstrøms utslipp fra treforedlingsindustri er innholdet av *Klebsiella* like høyt som innholdet av coliforme bakterier. Termotolerante *Klebsiella* ble sjelden påvist, og der de ble påvist forekom de i mengder på under 2% av antall coliforme bakterier, den

prosentandel som ble funnet for Sognsvannsbekken. Like nedenfor Follum fabrikker i Drammenselv-vassdraget var det få *Klebsiella*-bakterier i vannet, men innholdet av TCB var høyt. Et stykke nedstrøms, ved Norderhov, var forholdet omvendt. Dette tyder på at industriutslippet ikke inneholdt store mengder *Klebsiella*-bakterier, men derimot næringsstoff for disse bakteriene, som da formerer seg i det varme resipientvannet. Det samme syntes å være tilfelle for avløpsvannet fra Greåker Industrier ved Glåma, som den dagen prøven ble tatt syntes å være fri for levende mikroorganismer. Prøvestedet oppstrøms Greaker samt Visterflo var påvirket av dette utslippet.

Rett nedstrøms utslippet fra Saugbruksforeningen til elva Tista var det imidlertid et meget høyt innhold av *Klebsiella*-bakterier. Dette tyder på at avløpsvannet kan ha inneholdt store mengder *Klebsiella* i tillegg til egnet organisk stoff for formering av disse bakteriene i resipienten. Det var fortsatt en høyere andel av *Klebsiella* enn av TCB ved prøvestedet i Iddefjorden. At en høy andel av de coliforme bakteriene i Iddefjorden er *Klebsiella* er også påvist i en tidligere undersøkelse (12). I Sandebukta, selv nedenfor Sande Paper Mill, var forholdene helt annerledes. Vannet i bukta viste lav belastning med coliforme bakterier, og prosentandelen av TCB og *Klebsiella* var lav. Rett nedenfor fabrikken ble de to sistnevnte parametre ikke påvist. Vannet i Sandebukta inneholdt imidlertid store mengder av en termotolerant sopp som vokste

Tabell 2. Innhold av coliforme bakterier og *Klebsiella* i vann fra Drammenselv-vassdraget og Sandebukta.

Prøvested	Coliforme bakterier/100 mL		<i>Klebsiella</i> / 100 mL	
	Totalantall	Termotolerante	Totalantall	Termotolerante
1. Begna, ovenfor Follum	47	1	6	< 5
2. Nedstrøms Follum	> 2 000	1 400	190	< 100
3. Norderhov, ved brua	>> 900	110	680	< 5
4. Skjærdalen, Tyristrand	44	8	12	< 0,5
5. Vikersund	110	50	44	5
6. Hokksund, ovenfor brua	50 + > 20 000	64	110	3
7. Drammen, ved konvoluttfabr.	1 000 + 19 000	360	22 000	5
8. Drammen, nedstrøms bru	7 700	8 000	4 000	< 1
Sandebukta:				
9. Badeplass	18	4	0,5	< 0,5
10. Ved S.P.Mill	16	< 1	< 0,5	< 0,5

på *Klebsiella*-filtrene. Det vites ikke hvilken effekt denne soppen kan ha på de badende.

Resultatene for coliforme bakterier, spesielt fra Drammenselv-vassdraget, er meget usikre på grunn av store vanskeligheter under analysen. Antallet bakterier økte nesten ubegrenset med økende fortykning, men

med flere og flere interfererende bakteriekolonier på filtrene. Det samme var tilfellet for prøvestedet rett nedstrøms Saugbruksforeningen. I tabell 2 er resultatene angitt som antall typiske coliforme kolonier + antall atypiske (mørke røde uten metallglans) kolonier. Noen av de atypiske viste seg å være *Kleb-*

Tabell 3. *Innhold av coliforme bakterier og Klebsiella i vann fra prøvesteder langs nedre del av Glåma, Tista og i Iddefjorden.*

Prøvested	Coliforme bakterier/100 mL		<u>Klebsiella</u> / 100 mL	
	Totalantall	Termotolerante	Totalantall	Termotolerante
Glåma:				
1. Under E 6 bru	2.100	57	500	< 20
2. Oppstrøms Greak. Ind.	16.000	1.300	1.200	40
3. Avløpsvann, Greak. Ind.	< 10	< 5	< 10	< 5
4. Visterflo	380.000	150.000	43.000	< 200
Tista:				
5. Tangen brygge	33	6	3	< 1
6. Tømmeropplag, oppstrøms Saug.	3.200	640	1.600	< 10
7. Nedstrøms Saugbruksforen.	110.000	14.000	38.000	900
8. Iddefjorden	110	32	58	< 1,5

siella, mens andre tilhørte slektene *Pseudomonas* og *Aeromonas*.

5. KONKLUSJON

Resultatene fra disse undersøkel-sene viser at analyse for coliforme bakterier på m-Endo MF medium er lite egnet som metode for fekal-indikatoren *E.coli*. Andre coliforme bakterier fra industriutslipp, eller slike som kan formere seg i resipi-entvannet på næringsstoffer fra in-dustrielle avløpsvann, samt ikke-coliforme bakterier interfererer i metoden når vannet er svært for-

ureset. Metoden egner seg best for analyse for coliforme bakterier i relativt rent vann, f.eks. til kontroll av drikkevann.

Om sommeren, ved vanntempera-tur på 18—20°C, utgjør potensielt patogene bakterier av genus *Kleb-siella* en stor andel av de påviste coliforme bakterier i norske elver som mottar avløpsvann fra trefored-lingsindustri. Antallet av slike bak-terier lar seg bestemme med mem-branfilter-metode på m-Kleb agar og inkubering ved 37°C. Kun få termotolerante *Klebsiella*-bakterier

lot seg påvise ved inkubering på dette medium ved 44,5°C. Det kunne tenkes at denne metoden var lite egnet til analyse for termotolerante *Klebsiella*, men at metoden for termotolerante coliforme bakterier ville medbestemme flere av dem. *Klebsiella*-koloniene ville være falske positive resultater i analysen dersom de stammet fra treforedlingsutslipp, da man med denne metoden egentlig søker etter ferske *E.coli* fra fekal forurensning. Derfor ble alle typer typiske og atypiske kolonier på M-FC-filtrene testet videre for slektstilhørighet. Det ble ikke påvist høyere andel av termotolerante *Klebsiella* på denne måten enn med den direkte metoden. Dette tyder på at termotolerante *Klebsiella* ikke produseres i vesentlig grad ved norske treforedlingsbedrifter.

Resipienter for fersk fekal forurensning synes å inneholde en større andel termotolerante *Klebsiella* enn elver med treforedlingsutslipp.

Den benyttede metode for termotolerante coliforme bakterier, membranfiltermetode på M-FC medium, synes å være velegnet som parameter for fekal-indikatoren *E.coli*. Den lot seg benytte uten for stor interferens fra andre mikroorganismer i sterkt belastet vann. Termotolerante *Klebsiella* og *Enterobacter* vil bli medbestemt, men disse kan like gjerne stamme fra fekal forurensning som fra andre kilder. Det er derfor ikke noe i veien for at metoden kan velges som parameter for påvisning av fekal forurensning ved generell bedømmelse av hygienisk vannkvalitet.

LITTERATUR

1. Geldreich, E. E., and Rice, E. W.: *Klebsiella* occurrence, significance and detection in water systems — A progress report (EPA, USA). Presented at the AWWA Water Quality Technology Conference, December 3 1984, in Denever, Colorado, USA. Proceedings available by April, 1985.
2. Caplenas, N. R., Karanek, M. S., and Dufour, A. P., 1981: Source and Extent of *Klebsiella pneumoniae* in the Paper Industry. *Appl. and Environm. Microbiol.* 42, 779—785, 1981.
3. Ormerod, Kari S., 1985: *Klebsiella*-bakterier. Analysemetoder og forekomst i industriavløpsvann og resipientvann. NIVA prosjekt F-80419-02 Bakteriologiske analysemetoder, Rapport 1/85. Norsk institutt for vannforskning. ISBN 82-577-0902-6.
4. Niemi, R. M., Niemelä, S., Mentu, J., and Siitonen, A., 1987: Growth of *Escherichia coli* in a pulp and cardboard mill. *Can. J. Microbiol.* 33: 541—545.
5. Niemelä, S. I., and Väättänen, P., 1982: Survival in Lake Water of *Klebsiella pneumoniae* Discharged by a Paper Mill. *Appl. and Environm. Microbiol.* Aug. 1982, p. 264—269.
6. API 20 EC: System for the identification of coliform *Enterobacteriaceae*. API SYSTEM S. A. La Balme les Grottes, 38390 MONTALIEU VERCIEU. ISBN 2-904243-10-0 January 1985.

7. Ormerod, K., 1987: *Hygienisk vannkvalitet*. Belastning med *Klebsiella*-bakterier fra treforedlingsindustri. NIVA prosjekt F-86634. Norsk institutt for vannforskning. ISBN 82-577-1211-6.
8. NS 4751 Vannundersøkelse — Metoder for bakteriologisk undersøkelse av drikkevann. 1. utg. aug. 1976. UDK 543. 39. Norges Standardiseringsforbund.
9. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 15th Ed. 1980. APHA-AWWA-WpøF.
10. Ormerod, K., 1983: *Limnologisk forskning i Maridalsvatnet*. Delrapport 2/84: Vurdering av den hygieniske vannkvalitet i årene 1963—1983. Prosjekt 81424, Norsk institutt for vannforskning, 1984 ISBN 82-577-0832-1.
11. Lien, L., 1984: *Limnologisk forskning i Maridalsvannet*. Delrapport 1/84: Transport av næringssalter og tarmbakterier med måker til Maridalsvannet. Prosjekt 81424, Norsk institutt for vannforskning, 1984. ISBN 82-577-0799-6.
12. Ormerod, K., 1984: Testing av Iddefjordens termotolerante coliforme bakterieflora for innhold av *Klebsiella*. Statlig program for forurensningsovervåking, Rapport nr. 140/84, Overvåking av Iddefjorden 1983. Norsk institutt for vannforskning, 1984. ISBN 82-577-0840-2.