

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE  
BILTHOVEN

Rapport nr. 289202 007

**Evaluatie van de membraanfiltratiemethode  
op mCP-agar voor bepaling van sporen van  
*Clostridium perfringens* in water**

F.M. Schets en G.J. Medema

april 1995

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van het Directoraat-Generaal  
Milieubeheer: Directie Drinkwater, Water en Landbouw onder projectnummer 289202.

**VERZENDLIJST**

- 1 DGM, Directeur Drinkwater, Water, Landbouw
- 2 Plaatsvervangend Directeur Generaal Milieubeheer Dr.ir. B.C.J. Zoeteman
- 3 Hoofdinspectie Milieuhygiëne
- 4 Ir. W. Cramer, DGM/DWL
- 5 Drs. I. Luitwieler, secr. NNI commissie bacteriologisch onderzoek van water
- 6 H.R. Veenendaal, secr. KIWA KBO werkgroep
- 7 Depot Nederlandse Publicaties en Nederlandse Bibliografie
- 8 Directie RIVM
- 9 Prof.Dr.Ir. D. Kromhout, Directeur Sector 2
- 10 Dr.Ir. A.H. Havelaar, Hoofd LWL
- 11-12 Auteurs
- 13 Hoofd Bureau Voorlichting en Public Relations
- 14 Bureau Projecten- en Rapportenregistratie
- 15-16 Bibliotheek RIVM
- 17-30 Reserve exemplaren

<b>INHOUDSOPGAVE</b>	<b>Blz.</b>
VERZENDLIJST	2
INHOUDSOPGAVE	3
SUMMARY	4
SAMENVATTING	5
1. INLEIDING	6
2. MATERIAAL EN METHODEN	8
2.1. Materiaal	8
2.1.1. Monsters	8
2.2. Methoden	8
2.2.1. SCA-methode	8
2.2.2. mCP-methode	9
2.2.3. Isolatie en typering van kolonies	9
2.2.4. Statistische analyse	10
3. RESULTATEN	11
4. DISCUSSIE	12
5. CONCLUSIES	14
LITERATUUR	15
TABELLEN	17
FIGUUR	22
BIJLAGE	23

## SUMMARY

Current Dutch and European drinking water standards include criteria for spores of sulphite reducing clostridia. This has some inherent disadvantages. The reproducibility of the enumeration method for spores of sulphite reducing clostridia (SSRC) in Sulphite Cycloserine Agar (SCA) is poor. Some sulphite reducing clostridia are able to grow in sediments in drinking water mains and not all members of this group are of fecal origin. Enumeration of SSRC gives information about the effectiveness of water purification processes rather than about fecal pollution. *Clostridium perfringens*, however, is exclusively of fecal origin and does not grow in water or sediments. Besides from being a process indicator, *C.perfringens* spores could be an index parameter for the occurrence of persistent intestinal pathogens like viruses and (oo)cysts of protozoa.

This report describes the evaluation of a membrane filtration method for the detection of *C.perfringens* spores on mCP-agar. The recovery of *C.perfringens* WR62 spores on mCP-agar was  $63,6 \pm 10,2\%$  compared to sheep blood agar; on SCA it was  $73,5 \pm 4,8\%$ . The selectivity of mCP-agar is high; 97,5% of the characteristic colonies isolated from sewage samples were confirmed as *C.perfringens*. The sensitivity, however, is low; 8/24 (33,3%) of the non-characteristic colonies were also confirmed as *C.perfringens*. This implies the confirmation of both characteristic and non-characteristic colonies on mCP-agar. Numbers of SSRC and *C.perfringens* spores were determined in ten sewage water samples of domestic, industrial and slaughter-house origin on resp. SCA and mCP-agar. In sewage water samples most of the SSRC are *C.perfringens* spores. In 8/10 samples no significant differences between SCA and mCP-agar occurred. In these samples the average recovery on mCP-agar compared to SCA was  $103,8 \pm 24,5\%$ . In 2/2 slaughter-house samples significantly higher numbers SSRC on SCA were found. The assumption that most SSRC in sewage water are *C.perfringens* spores may not apply to this type of sample. As the isolated SSRC were not determined to the species level, we are unable to pronounce upon this with certainty. The mCP-method, however, can be used to determine the number of *C.perfringens* spores in sewage water of human origin.

## SAMENVATTING

De methode voor bepaling van sporen van sulfiet reducerende clostridia (SSRC) op Sulfiet Cycloserine Agar (SCA) is slecht reproduceerbaar. Een aantal sulfiet reducerende clostridia groeit na in water of in sediment en niet alle sulfiet reducerende clostridia zijn van faecale oorsprong. Bepaling van het aantal SSRC geeft meer informatie over het functioneren van zuiveringsprocessen dan over faecale verontreiniging. *Clostridium perfringens* is exclusief van faecale oorsprong en vertoont geen nagroei in water en sediment. Sporen van *C.perfringens* zouden een index functie kunnen vervullen voor het voorkomen van persistente darmpathogenen zoals virussen en (oo)cysten van protozoa.

Dit rapport beschrijft de evaluatie van een membraanfiltratie methode voor de detectie van sporen van *C.perfringens* op mCP-agar. De gemiddelde recovery van sporen van *C.perfringens* WR62 op het mCP-medium bedroeg  $63,6 \pm 10,2\%$  ten opzichte van schapebloed agar. Op SCA was deze recovery  $73,5 \pm 4,8\%$ .

De selectiviteit van het mCP-medium is hoog; 97,5% van de karakteristieke kolonies is met behulp van de MNLG-tests als *C.perfringens* bevestigd. De specificiteit is echter minder goed; 8/24 (33,3%) niet-karakteristieke kolonies werden toch als *C.perfringens* bevestigd. Dit heeft tot gevolg dat zowel karakteristieke als niet-karakteristieke kolonies op mCP-agar bevestigd moeten worden.

De aantallen SSRC en sporen van *C.perfringens* werden in 10 monsters (huishoudelijk/industrieel/slachthuis) afvalwater met behulp van resp. de SCA- en de mCP-methode bepaald. In afvalwater bestaan SSRC grotendeels uit sporen van *C.perfringens*. In 8/10 onderzochte monsters bestond geen significant verschil tussen de SCA- en de mCP-methode. De gemiddelde recovery op het mCP-medium ten opzichte van SCA bedroeg voor deze monsters  $103,8 \pm 24,5\%$ . In 2/2 onderzochte monsters slachthuisafvalwater werd met de SCA-methode een significant hoger aantal SSRC dan sporen van *C.perfringens* met de mCP-methode gevonden. Mogelijk gaat de aanname dat SSRC in afvalwater grotendeels uit sporen van *C.perfringens* bestaan voor dit type afvalwater niet op.

De geïsoleerde SSRC zijn echter niet gedetermineerd waardoor hier niet met zekerheid een uitspraak over gedaan kan worden. De mCP-methode kan echter goed gebruikt worden voor het bepalen van het aantal *C.perfringens* sporen in afvalwater van humane herkomst.

## 1. INLEIDING

Sporen van sulfiet reducerende clostridia (SSRC) worden in water bepaald omdat zij resistenter zijn tegen desinfectie en in water langer overleven dan de vegetatieve bacteriële index organismen voor faecale verontreiniging. Zij kunnen hierdoor dienen als biologische procesindicator bij de drinkwaterbereiding, met name voor het functioneren van zuiveringsstappen als sedimentatie en filtratie (2). SSRC worden bepaald met behulp van een membraanfiltratiemethode, waarbij na een pasteurisatieprocedure het membraanfilter op of in Sulfiet Cycloserine Agar (SCA) wordt gebracht, waarna anaeroob wordt geïncubeerd. Vervolgens worden typische zwarte kolonies, ontstaan door de vorming van ijzersulfide-complexen, geteld (1). De reproduceerbaarheid van deze methode is echter laag (2). Sulfiet reducerende clostridia (SRC) zijn bovendien taxonomisch een onduidelijk gedefinieerde groep bacteriën. Een aantal leden vertoont nagroei in water en sediment en niet alle leden zijn van faecale oorsprong. SSRC worden daarom ook beschouwd als indicator organismen voor het goed functioneren van zuiveringsprocessen en veel minder als index parameter voor faecale verontreiniging. Analyse van SSRC gebeurt momenteel op uitgebreide schaal door de waterleidinglaboratoria.

Eén van de sulfiet reducerende clostridia, *Clostridium perfringens*, is exclusief van faecale oorsprong en vertoont geen nagroei in water of sediment. De meerwaarde van de analyse van sporen van *C.perfringens* is dat deze naast de indicator functie, een index functie kunnen vervullen voor het voorkomen van persistente darmpathogenen zoals virussen en (oo)cysten van protozoa. De waarde van *C.perfringens* als index parameter voor faecale verontreiniging is echter afhankelijk van het voorkomen van deze sporen in oppervlaktewater.

Bisson en Cabelli (4) hebben een membraanfiltratiemethode voor het aantonen en kwantificeren van *C.perfringens* beschreven, waarbij een aantal onderscheidende testen in het selectieve mCP-medium zijn samengevoegd. Door afwezigheid van het enzym  $\beta$ -glucosidase bij *C.perfringens* wordt het substraat indoxyl- $\beta$ -D-glucoside (IBDG) niet omgezet en ontstaan door saccharose-fermentatie onder anaerobe omstandigheden gele kolonies. Gele kolonies die met behulp van zure fosfatase fenolftaleïnedifosfaat hebben afgebroken kleuren in ammoniumhydroxide-damp donkerrose tot rood. Deze kolonies worden beschouwd als 'waarschijnlijk *C.perfringens*'.  $\beta$ -glucosidase-positieve kolonies worden blauw en kleuren in ammoniumhydroxide-damp paars. Cycloserine en polymyxine-

B-sulfaat zijn aan het medium toegevoegd om respectievelijk groei van bacilli en Gram-negatieve bacteriën te onderdrukken.

Bisson en Cabelli behaalden een hoge recovery met het mCP-medium: met sporensuspensies van vijf reïncultures van *C.perfringens* vonden zij een relatieve recovery ten opzichte van een niet selectief controle medium van 79%. De selectiviteit van het mCP-medium was hoog: 93% van de isolaten uit water die als 'waarschijnlijk *C.perfringens*' werden geïdentificeerd, werden met behulp van biochemische reacties bevestigd als *C.perfringens*, terwijl slechts 2% van de 'waarschijnlijk geen *C.perfringens*' kolonies als *C.perfringens* werd bevestigd. Burger *et al.* (5) vonden dat 94% van de met het mCP-medium geïsoleerde kolonies *C.perfringens* waren. In een vergelijking van vier media voor bepaling van *C.perfringens* vonden zij dat het mCP-medium het meest selectieve medium was, maar dat het hierdoor minder geschikt was voor het bepalen van het aantal vegetatieve cellen van *C.perfringens*.

Het doel van dit onderzoek was ten eerste het binnen het laboratorium operationeel maken van de mCP-methode voor enumeratie van sporen van *C.perfringens* in monsters water. Ten tweede werd deze methode met behulp van sporensuspensies en suspensies vegetatieve cellen van een laboratoriumisolaat van *C.perfringens* en met behulp van monsters van diverse typen afvalwater gevalideerd. In monsters afvalwater zal het grootste deel van de SSRC uit sporen van *C.perfringens* bestaan (6). Indien de SCA- en de mCP-methode gelijk presteren, zal naar verwachting het aantal gevonden SSRC in gepasteuriseerde monsters afvalwater in dezelfde grootte orde liggen als het aantal gevonden sporen van *C.perfringens*.

## 2. MATERIAAL EN METHODEN

### 2.1. Materiaal

#### 2.1.1 Monsters

Monsters secundair effluent zijn in de periode juli-september 1992 genomen bij Rioolwater Zuiverings Installaties (RWZI) in Nederland die verschillende typen afvalwater behandelen (Tabel 1). De monsters werden genomen volgens NEN 6559 (3), direct gekoeld en binnen 24 uur ingezet en onderzocht op de aanwezigheid van SSRC en sporen van *C.perfringens* volgens de hieronder beschreven SCA- en mCP-methode. Alle monsters werden zowel ongepasteuriseerd als na een milde monsterpasteurisatie (15 min  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ ) onderzocht. Deze pasteurisatie procedure is optimaal voor de recovery van *C.perfringens* sporen (4).

In alle experimenten is gebruik gemaakt van een membraanfiltratiemethode op SCA die enigszins afwijkt van de in NEN 6567 (1) beschreven methode en van de mCP-methode zoals die door Bisson en Cabelli (4) beschreven is; beide methoden zijn hier in het kort beschreven.

### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. SCA-methode

Aan tot ca.  $50^\circ\text{C}$  afgekoelde SCA-basis (Bijlage 1) werd een 1% D-cycloserine-oplossing toegevoegd (eindconcentratie 0,4 g/l). Vervolgens werden dunne platen gegoten; ca. 10 ml in een petrischaal met diameter 9 cm; de platen werden gedurende 30 minuten bij  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  gedroogd. Na filtratie van de monsters werden membraanfilters op de agar gelegd en voorzichtig overgoten met een dunne laag (ca. 10 ml) tot ca.  $50^\circ\text{C}$  afgekoelde SCA-basis. De platen werden gedurende  $24 \pm 2$  uur in een jar, waarin met behulp van Gaspaks (BBL) een anaeroob milieu werd gecreëerd, bij  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  geïncubeerd. Na afloop van de incubatieperiode werden de karakteristieke zwarte kolonies geteld.



### 2.2.2. mCP-methode

Aan tot ca. 50 °C afgekoelde mCP-basis (Bijlage 1) werden de volgende componenten toegevoegd: 1% D-cycloserine-oplossing (eindconcentratie 0,4 g/l), 0,1% polymyxine-B-sulfaat-oplossing (eindconcentratie 0,025 g/l), 0,4% indoxyl- $\beta$ -D-glucoside-oplossing (eindconcentratie 0,06 g/l; (7)), 0,5% fenolftaleïnedifosfaat-oplossing (eindconcentratie 0,1 g/l) en 7% ijzer(III)chloride-oplossing (eindconcentratie 0,0875 g/l). Vervolgens werden platen gegoten; ca. 20 ml in petrischalen met diameter 9 cm; de platen werden gedurende 30 minuten bij  $37 \pm 1$  °C gedroogd en direct gebruikt. Na filtratie van de monsters werden membraanfilters op de agar gelegd en werden de platen gedurende  $24 \pm 2$  uur bij  $37 \pm 1$  °C in een, met behulp van Gaspaks verkregen, anaeroob milieu geïncubeerd. Na afloop van de incubatieperiode werden de karakteristieke gele kolonies gemerkt. Vervolgens werden de membraanfilters gedurende 30-60 seconden in ammoniumhydroxide-damp gehangen. De gemerkte kolonies die donkerrose of rood kleurden werden geteld.

### 2.2.3. Isolatie en typering van kolonies

Uit de monsters secundair effluent werden vanaf op het mCP-medium geïncubeerde membraanfilters 10 kolonies (per monster indien mogelijk 8 gele in 2 anders gekleurde) in vooraf opgekookt en tot kamertemperatuur afgekoeld thioglycolaat medium (Bijlage 1) geënt en gedurende  $24 \pm 2$  uur bij  $37 \pm 1$  °C in een anaeroob milieu, verkregen met behulp van Gaspaks, geïncubeerd. Vanuit dit medium werd materiaal gebruikt voor het inzetten van de MNLG-reacties. Hiertoe werd per isolaat een buis nitraatreductie medium (Bijlage 1) en een buis lactose-gelatine medium (Bijlage 1) beënt. Na incubatie bij  $37 \pm 1$  °C in een anaeroob milieu (Gaspak) gedurende  $24 \pm 2$  uur werden in de nitraatreductie buis de beweeglijkheid (M) en het vermogen om nitraat te reduceren (N) afgelezen. In het lactose-gelatine medium werden lactose vergisting (L) en gelatinase activiteit (G) afgelezen (Tabel 2). De zure fosfatase reactie van de individuele isolaten werd bepaald na reinstrijken op een mCP-plaat. Vanuit het thioglycolaat medium werd eveneens materiaal op 2 schapebloedagar platen geënt, waarvan er één anaeroob (Gaspak) en één aeroob gedurende  $24 \pm 2$  uur bij  $37 \pm 1$  °C geïncubeerd werd. Vanaf de anaeroob geïncubeerde plaat werd een kolonie in Duncan en Strong medium (Bijlage 1) geënt en na incubatie, gedurende  $24 \pm 2$  uur in een anaeroob milieu (Gaspak) bij  $37 \pm 1$  °C, werd het materiaal bij -70 °C opgeslagen. De aeroob geïncubeerde bloedplaat diende als controle op het optreden van groei van *Bacillus spp.* die met de mCP-methode geïsoleerd kunnen worden

en die in tegenstelling tot *C.perfringens* zeer goed in een aeroob milieu groeien.

#### 2.2.4. Statistische analyse

Om verschillen tussen tellingen op SCA en mCP en in gepasteuriseerde en ongepasteuriseerde monsters te evalueren werden met behulp van Genstat 5 (8) variantie analyses uitgevoerd.

### 3. RESULTATEN

In een voorbereidend experiment werd met behulp van een sporensuspensie (ca.  $10^5$  sporen/ml) van *C.perfringens* WR 62 de recovery van de mCP- en de SCA-methode ten opzichte van het niet-selectieve medium schapebloedagar (Bijlage 1) bepaald. Hiertoe werden verdunningen van de sporensuspensie in 0,1% pepton fysiologisch zout in duplo op de drie media gespateld en werden eveneens in duplo membraanfiltraties met verdunningen van de sporensuspensie uitgevoerd. Uit Tabel 3 blijkt dat de recovery van de sporen van *C.perfringens* WR62 op SCA hoger is dan op het mCP-medium; voor de membraanfiltratiemethode is het verschil niet significant ( $P>0.05$ ), voor de spatelplaten wel ( $P<0.05$ ).

In Tabel 4 staan de gevonden aantallen (S)SRC en (sporen van) *C.perfringens* in gepasteuriseerde en ongepasteuriseerde monsters per monsterpunt samengevat. Bij vergelijking van de aantallen SSRC en sporen van *C.perfringens* in gepasteuriseerde monsters (Figuur 1) blijkt dat in 2/10 monsters (Roosendaal en Boxtel) het aantal SSRC significant ( $P<0.001$ ) hoger is dan het aantal sporen van *C.perfringens*. In 3/10 monsters (Soest-Baarn, Roosendaal en Boxtel) treedt na pasteurisatie een significante ( $P<0.001$ ) daling van het aantal SRC op. Het aantal *C.perfringens* daalt na pasteurisatie slechts in 1 monster (Boxtel) significant ( $P<0.001$ ).

Er zijn in totaal 120 karakteristieke en niet-karakteristieke kolonies vanaf het mCP-medium geïsoleerd. Negen isolaten bleken aeroob te groeien en zes isolaten zijn dood gegaan. De overige 105 isolaten zijn met behulp van de MNLG-reacties bevestigd (Tabel 5). Van het aantal geïsoleerde karakteristieke kolonies (d.w.z. geel én fosfatase positief) blijkt 97,5% *C.perfringens* te zijn. Van de niet-karakteristieke kolonies is 33,3% echter ook *C.perfringens*.

#### 4. DISCUSSIE

Met een sporensuspensie van de stam *C.perfringens* WR62 werd met de membraanfiltratiemethode op het mCP-medium een recovery van  $63,6 \pm 10,2\%$  ten opzichte van het niet selectieve controle medium schapebloedagar behaald. Deze recovery is lager dan die op SCA ( $73,5 \pm 4,8\%$ ) en dan de door Bisson en Cabelli (4) gevonden waarde (79%). Bisson en Cabelli vergeleken de membraanfiltratiemethode op het mCP-medium echter met gietplaten en gebruikten een ander niet-selectief controle medium. De recovery van sporen van *C.perfringens* op mCP spatelplaten is slechts  $27,4 \pm 6,9\%$ , terwijl deze op SCA  $68,8 \pm 18,6\%$  is. Hieruit blijkt dat niet alleen vegetatieve cellen van *C.perfringens* slecht met het selectieve mCP-medium te bepalen zijn, zoals Burger *et al.* (5) vonden, maar dat bovendien sommige sporen van *C.perfringens* niet in staat blijken te zijn om op dit medium uit te groeien. Het groeiremmend effect is groter als de sporen direct op het medium gebracht worden. *C.perfringens* WR62 is echter een laboratorium stam, die mogelijk gevoeliger is (geworden) dan natuurlijk voorkomende stammen.

In 8/10 monsters afvalwater liggen de aantallen gevonden SSRC in dezelfde grootte orde als het aantal gevonden sporen van *C.perfringens*. Omdat het grootste deel van de SSRC in afvalwater uit sporen van *C.perfringens* bestaat (6) blijkt uit deze resultaten dat de recovery van sporen van *C.perfringens* met behulp van de mCP-methode overeenkomt met de recovery verkregen met de SCA-methode. In de twee monsters slachthuisafvalwater is de verhouding tussen SSRC en sporen van *C.perfringens* daarentegen hoog (2,9-5,0); deze monsters bevatten een significant hoger aantal SSRC. Mogelijk gaat de aanname dat de meeste SSRC in afvalwater sporen van *C.perfringens* zijn voor dit type afvalwater niet op. De geïsoleerde SRC zijn echter niet gedetermineerd waardoor hier niet met zekerheid een uitspraak over gedaan kan worden. Om met behulp van sporen van *C.perfringens* gegevens te verkrijgen over voorkomen en verwijdering van persistente pathogenen van faecale oorsprong, dient hun aantal in oppervlaktewater in de zelfde orde van grootte te liggen als het aantal SSRC.

Tijdens het pasteurisatieproces worden hoofdzakelijk vegetatieve cellen gedood. Pasteurisatie blijkt niet in alle monsters een daling van het aantal tot gevolg te hebben; het aantal vegetatieve cellen blijkt per monstertype te variëren. Monsters slachthuisafvalwater blijken veel vegetatieve cellen te bevatten, daar na milde pasteurisatie significant lagere aantallen gevonden worden.

97,5% van de met het mCP-medium geïsoleerde aantal karakteristieke kolonies is als *C.perfringens* bevestigd. Dit komt overeen met de door Bisson en Cabelli (4) en Burger *et al.* (5) gevonden bevestigings percentages (resp. 93% en 94%). Het hoge percentage vals-negatieve reacties (33,3%) ontstaat voornamelijk doordat de gele kleur van de ontstane kolonies niet duidelijk is. De kleur van de kolonies is vaak vuilgeel en kan in sommige gevallen gemakkelijk ten onrechte aangezien worden voor een andere kleur. Alle anders dan geel gekleurde fosfatase positieve kolonies die met behulp van de MNLG-reacties als *C.perfringens* bevestigd zijn (5/8 vals-negatieven), blijken in reïncultuur wel herkenbare gele kolonies op het mCP-medium te geven.

Incubatie bij 37 °C in plaats van bij de door Bisson en Cabelli (4) gebruikte incubatietemperatuur van 45 °C, heeft geen hoog percentage vals-positieve reacties tot gevolg gehad, slechts 2,5%. Een hogere incubatietemperatuur zal dit percentage mogelijk verder doen dalen. In vervolg experimenten zal de mCP-methode bij 45 °C gevalideerd moeten worden.

In de praktijk heeft het werken met de mCP-methode naast de genoemde onduidelijkheid van de gele kleur van de kolonies ook als nadeel dat het tellen van de gele kolonies die boven de ammoniunhydroxidedamp rood worden lastig is. De rode kleur verdwijnt snel wanneer het membraanfilter niet meer in de damp wordt gehouden, zodat de kolonies in een zuurkast geteld moeten worden terwijl het membraanfilter met een pincet in de damp wordt gehouden.

## 5. CONCLUSIES

De mCP-methode blijkt, bij 37 °C, in monsters afvalwater van huishoudelijke of gemengd huishoudelijk/industriële oorsprong, waarin de SSRC grotendeels uit sporen van *C.perfringens* bestaan, gelijkwaardig te zijn aan de SCA-methode. De selectiviteit van de methode is hoog; enkele praktische nadelen die resulteren in een lagere specificiteit kunnen mogelijk door optimaliseren van de methode verholpen worden. De gele kleur van de kolonies moet duidelijker onderscheiden kunnen worden, mogelijk door gebruik van groene membraanfilters in plaats van witte. De bevestiging met ammoniumhydroxide is beter afleesbaar wanneer het membraanfilter op een in ammoniumhydroxide gedrenkt filtreerpapiertje gelegd wordt, dan wanneer het in ammoniumhydroxidedamp wordt gehouden.

Monsters slachthuisafvalwater blijken relatief veel vegetatieve cellen en sporen van andere clostridia dan *C.perfringens* te bevatten.

Om de waarde van sporen van *C.perfringens* als index parameter voor faecale verontreiniging te toetsen zullen in de toekomst monsters oppervlaktewater van verschillende herkomst op de aanwezigheid en het aantal sporen van *C.perfringens* onderzocht moeten worden. Er kan gebruik worden gemaakt van een eventueel geoptimaliseerde mCP-methode, waarvan bovendien met behulp van reïncultures en natuurlijke monsters moet worden vastgesteld hoe de resultaten bij 45 °C zich verhouden tot die bij 37 °C.

## LITERATUUR

1. Anonymus  
Bacteriologisch onderzoek van water. Onderzoek met behulp van membraanfiltratie naar de aanwezigheid van sporen van sulfietreducerende clostridia, Delft: Nederlands Normalisatie Instituut, 1985. 5 pp. (NEN 6567).
2. Anonymus  
Bacteriologisch onderzoek van water. Toelichting bij onderzoek met behulp van membraanfiltratie naar de aanwezigheid van sporen van sulfietreducerende clostridia volgens NEN 6567, Delft: Nederlands Normalisatie Instituut, 1985. 3 pp. (NPR 6568).
3. Anonymus  
Bacteriologisch onderzoek van water. Monsterneming, Delft: Nederlands Normalisatie Instituut, 1981. 3 pp. (NEN 6559).
4. Bisson JW, Cabelli VJ.  
Membrane filter enumeration method for *Clostridium perfringens*, Appl Environ Microbiol 1979; 37: 55-66.
5. Burger JS, Nupen EM, Grabow WOK.  
Evaluation of four growth media for membrane filtration counting of *Clostridium perfringens* in water, Water SA 1984; 10: 185-188.
6. Cabelli VJ.  
*Clostridium perfringens* as a water quality indicator. In: Bacterial Indicators/ Health Hazards Associated With Water, ASTM STP 635, Hoadly AW and Dutka BJ Eds. American Society for Testing and Materials 1977; 65-79.
7. Armon R, Payment P.  
A modified m-CP medium for enumerating *Clostridium perfringens* from water samples, Can J Microbiol 1988; 34: 78-79.

8. Genstat 5 committee.

Genstat reference manual.

New York: Oxford University Press 1988.



Tabel 1: Lokatie, monsterdatum en type afvalwater van de bemonsterde Rioolwater Zuiverings Installaties (RWZI).

monsterpunt	monsterdatum	type afvalwater
RWZI De Bilt	090792	huishoudelijk/industrieel
RWZI De Meern	200892	huishoudelijk
RWZI Zeist	200892	huishoudelijk/industrieel
RWZI Soest-Baarn	200892	huishoudelijk/industrieel
RWZI Amersfoort	260892	huishoudelijk/industrieel
Openbaar slachthuis Roosendaal	030992	slachthuis
Encebe slachterij Boxtel	030992	slachthuis
RWZI Hazerswoude-Dorp*	160992	huishoudelijk
RWZI Schalkwijk	160992	huishoudelijk/industrieel
RWZI Bodegraven	160992	huishoudelijk/industrieel

\* Deze RWZI zuivert in ontwerp alleen huishoudelijk afvalwater, maar blijkt in de praktijk ca. 7% industrieel afvalwater te verwerken.

Tabel 2: Reactie van *Clostridium perfringens* in een aantal biochemische tests.

methode	biochemische test	reactie <i>C.perfringens</i>	bijzonderheid
MNLG	beweglijkheid	negatief	
	nitraatreductie	positief	
	lactose fermentatie	positief	zuur en gas
	gelatinase activiteit	positief	

v

Tabel 3: Recovery van sporen van *Clostridium perfringens* WR62 op SCA en het mCP-medium ten opzichte van schapebloedagar.

	recovery (%) WR62 t.o.v. schapebloedagar op	
	SCA*	mCP*
membraanfilter	73,5 ± 4,8	63,6 ± 10,2
spatelplaat	68,6 ± 18,6	27,4 ± 6,9

\*gemiddelde van 2 experimenten

Tabel 4: Aantallen sulfiet reducerende clostridia (SRC) en *Clostridium perfringens* in opgepasteuriseerde (SCA, mCP) en gepasteuriseerde (SCA60, mCP60) monsters afvalwater van verschillende herkomst.

RWZI	aantal (cfu/ml)		aantal (cfu/ml)	
	SRC		<i>C.perfringens</i>	
	SCA	SCA60	mCP	mCP60
De Bilt	27	29	25	27
Soest-Baarn	320	170	112	112
Zeist	15	13	19	14
De Meern	29	21	16	15
Amersfoort	202	173	272	224
Roosendaal	192	98	77	34
Boxtel	54	5	5	1
Schalkwijk	41	33	66	39
Bodegraven	8	8	8	10
Hazerswoude	4	5	5	6

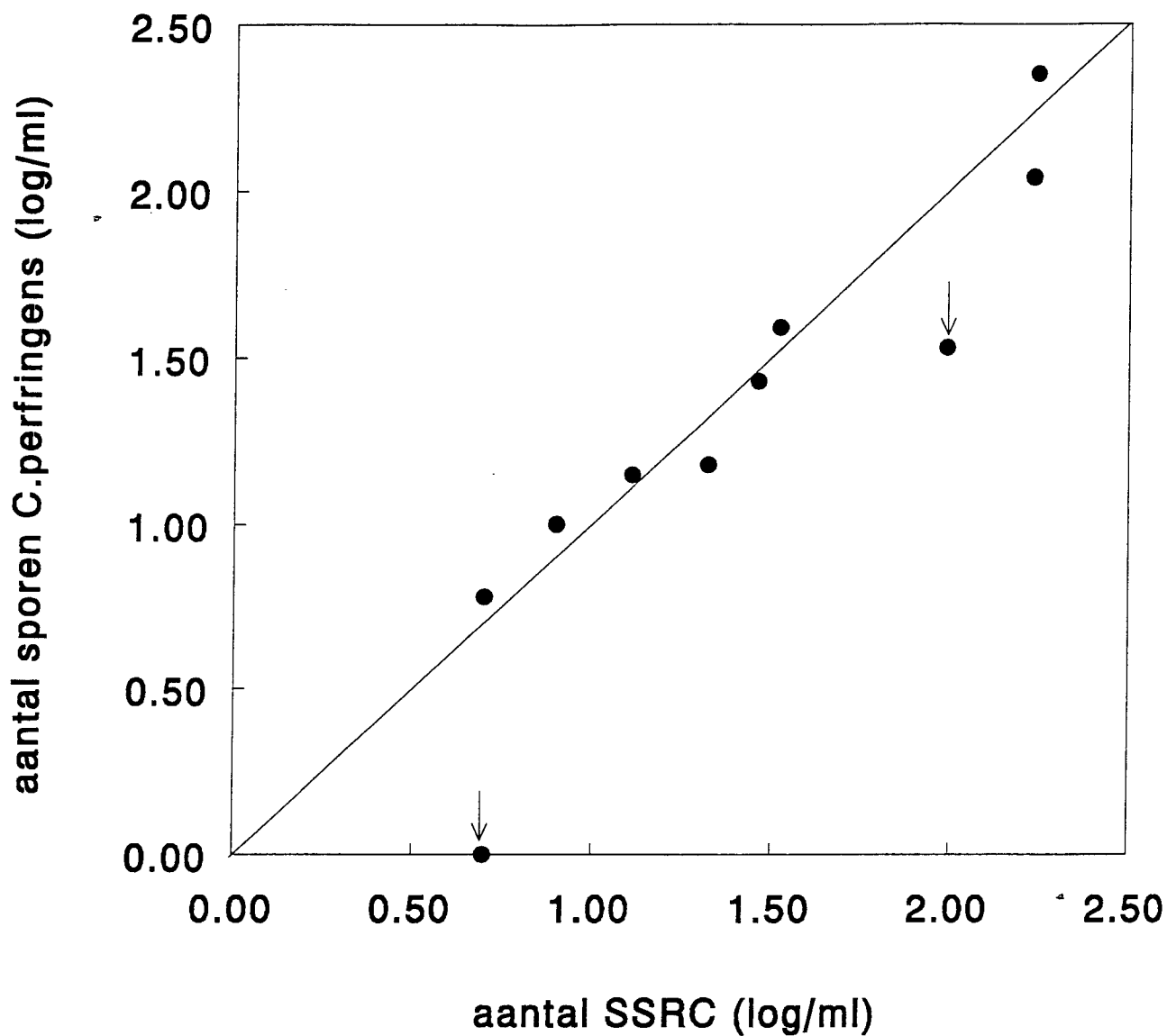
Tabel 5: Aantallen onbevestigde en als *Clostridium perfringens* bevestigde karakteristieke\* en niet-karakteristieke\*\* kolonies geïsoleerd vanaf het mCP-medium.

RWZI	totaal aantal	aantal karakteristiek	aantal bevestigd	aantal niet- karakteristiek	aantal bevestigd
De Bilt	28	15	15	13	2
Soest-Baarn	9	7	7	2	2
Zeist	9	8	8	1	0
De Meern	10	9	8	1	0
Amersfoort	10	9	9	1	1
Roosendaal	5	4	4	1	0
Boxtel	9	7	7	2	1
Schalkwijk	7	7	7	0	0
Bodegraven	10	9	8	1	1
Hazerswoude	8	6	6	1	1
totaal	105	81	79	24	8

\* gele kolonies die roserood tot rood kleuren in ammoniumhydroxidedamp

\*\* gele kolonies die niet roserood tot rood kleuren in ammoniumhydroxidedamp of anders dan geel gekleurde kolonies

Figuur 1: Vergelijking van de aantallen SSRC en sporen van *C.perfringens* in gepasteuriseerde monsters afvalwater. (-->: significant hoger aantal SSRC, P<0.001)



Bijlage 1: Samenstelling en bereidingswijze van media voor isolatie en typering van  
*C.perfringens*

### SCA-basis

#### samenstelling

1.trypton	Difco	15 g
2.soyton	Difco	5 g
3.gistextract	Oxoid	5 g
4.ammoniumijzercitraat	BDH	1 g
5.natriumdisulfiet	Merck	1 g
6.agar	So-bi-gel	20 g
7.gedestilleerd water		1000 ml

#### bereiden

los 1 t/m 5 op in 7, stel de pH in op 7,6, voeg 6 toe en los op onder roeren en verwarmen, laat 1-2 minuten doorkoken

#### steriliseren

15 minuten 121 °C

### mCP-basis

#### samenstelling

1.tryptose	Difco	30 g
2.gistextract	Difco	20 g
3.saccharose	Merck	5 g
4.L-cysteïne HCl	BDH	1 g
5.MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Merck	0,1 g
6.broomcresolpurper-oplossing 1%		4 ml
7.agar	So-bi-gel	15 g
8.gedestilleerd water		900 ml

#### bereiden

los 1 t/m 5 en 7 op in 8 onder roeren en verwarmen, laat 1-2 minuten doorkoken, voeg 6 toe, stel de pH in op 7,6

steriliseren

15 minuten 121 °C

**Schapebloedagar**samenstelling

1.vleespoeder	Oxoid	12 g
2.gistextract	Oxoid	3 g
3.natriumchloride	Merck	5 g
4.pepton	Oxoid	10 g
5.agar	So-bi-gel	20 g
6.gedestilleerd water		1000 ml
7.gedefibrineerd schapebloed		75 ml

bereiden

los 1 t/m 5 onder roeren en verwarmen op in 6, stel de pH in op 7,4

steriliseren

15 minuten 121 °C, voeg na afkoelen tot ca. 50 °C aseptisch 7 toe

**Thioglycolaat medium**samenstelling

1.fluid thioglycollate medium U.S.P.	BBL	29,5 g
2.gedestilleerd water		1000 ml

bereiden

suspender 1 in 2, laat 10 minuten staan, meng tot een homogene suspensie ontstaat, verwarm onder roeren en laat 2 minuten doorkoken

steriliseren

15 minuten 121 °C, daarna opslag bij kamertemperatuur in het donker



**Nitraatreductie medium**samenstelling

1.pepton	Difco	5	g
2.vleespoeder	Oxoid	3	g
3.galactose	OPG	5	g
4.glycerol	Merck	3	g
5.KNO <sub>3</sub>	Merck	5	g
6.Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Merck	3,1	g
7.agar	So-bi-gel	0,75	g
8.gedestilleerd water		1000	ml

bereiden

los 1 t/m 7 onder roeren en verwarmen op in 8, laat 1-2 minuten doorkoken, stel de pH in op 7,3

**Lactose-gelatine medium**samenstelling

1.tryptose	Difco	15	g
2.gistextract	Difco	10	g
3.lactose	BDH	10	g
4.Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Merck	6,3	g
5.gelatine	Delft	120	g
6.fenolrood-oplossing 0,2%		25	ml
7.gedestilleerd water		975	ml

bereiden

los 1 t/m 5 op in 7, voeg 6 toe, verwarm onder roeren tot alle componenten opgelost zijn, stel de pH in op 7,5

**Duncan en Strong medium**samenstelling

1.gistextract	Difco	4 g
2.proteose pepton	Difco	15 g
3.oplosbaar zetmeel	BDH	4 g
4.natriumthioglycolaat	BDH	1 g
5.Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Merck	6,7 g
6.gedestilleerd water		1000 ml

bereiden

los 1 t/m 5 onder roeren en verwarmen op in 6

steriliseren

15 minuten 121 °C