

Voorkomen en betekenis van *Clostridium botulinum* in zuiveringsslib

Inleiding

In de afgelopen jaren zijn in Nederland regelmatig botulisme-uitbraken voorgekomen onder watervogels [Haagsma, 1973]. Ook treedt in toenemende mate botulisme op bij landbouwhuisdieren [Haagsma en Ter Laak, 1978]. Tengevolge van deze uitbraken raakt het milieu steeds meer besmet met de sporen van *Clostridium botulinum*. Een dergelijke toename van de besmetting kon onder andere worden aangetoond in waterwingebieden in het westen van het land [Notermans et al., 1980].



A. H. HAVELAAR

Laboratorium voor Zoonosen en Levensmiddelenmicrobiologie
Rijksinstituut voor de Volksgezondheid, Bilthoven



S. VEENSTRA

Student Landbouwhogeschool
Wageningen, Vakgroep
Microbiologie



S. NOTERMANS

Laboratorium voor Zoonosen en Levensmiddelenmicrobiologie
Rijksinstituut voor de Volksgezondheid, Bilthoven

Op boerderijen waar in 1977 uitbraken van botulisme optraden tengevolge van bijvoeding met besmette bierbostel, is het ontstaan van kringlopen van *Clostridium botulinum* aangetoond [Notermans et al., 1981]. Als gevolg van deze bijvoeding was de kiem in grote aantallen aanwezig in de faeces van runderen [Notermans et al., 1978] en werd later met de mest over bij de boerderij behorende weilanden verspreid. Graskuilen, bereid met gras afkomstig van deze weilanden waren dientengevolge besmet met *C. botulinum*. Nader onderzoek heeft aangetoond dat *C. botulinum* onder gunstige omstandigheden van pH en wateractiviteit (a_w) in staat is zich te vermeerderen in graskuilen [Notermans et al., 1979]. Door voeding van runderen met het ingekuilde gras wordt de kringloop gesloten.

Omdat ook zuiveringsslib in grote hoeveelheden als meststof in de landbouw wordt gebruikt [Van Engers, 1980], rees de vraag in hoeverre op deze wijze aan het totstandkomen van verdere kringlopen van *C. botulinum* wordt bijgedragen. Daarom werd een onderzoek uitgevoerd naar het voorkomen van *C. botulinum* in zuiveringsslib

en naar de mogelijkheden tot vermeerdering van de kiem tijdens de anaerobe vergisting van zuiveringsslib. Bovendien werd het aantal *C. botulinum* kiemen op met zuiveringsslib besmette weilanden vergeleken met weilanden, waarop geen zuiveringsslib wordt gebruikt.

Materiaal en methoden

Rioolwaterzuiveringsinstallaties

Een globale karakterisering van de onderzochte installaties, gebaseerd op door de beheerder verstrekte gegevens, is aangegeven in tabel I. De selectie van deze installaties was enerzijds gebaseerd op verschillen in belasting met rioolwater afkomstig van de bio-industrie en anderzijds op resultaten van vooronderzoek naar *C. botulinum* in voorgaande jaren. Ook de wijze van zuivering van het rioolwater was een punt van overweging.

Onderzoek naar het voorkomen van *Clostridium botulinum*

Het onderzoek naar *C. botulinum* werd uitgevoerd in hoeveelheden van 1,0 en 0,1 gram nat slib, terwijl van monsters influent 4,0 en 0,4 ml van het in een monsterfles bezonken materiaal werd onderzocht. Weilanden werden bemonsterd door per hectare op 20 plaatsen ca. 25 g grond van de bovenste laag te verzamelen. Van een mengmonster hiervan werden onderzocht 10 x 1; 0,1 en 0,01 gram.

De te onderzoeken hoeveelheden werden in tweevoud overgebracht in buizen met

20 ml tevoren opgekookt en weer afgekoeld fortified egg-meat medium (FEM), [Notermans et al., 1981]. Een beënte buis werd vervolgens gepasteuriseerd (10 min bij 70 °C) en afgekoeld in smeltend ijs. Beide buizen werden bebroed bij 30 °C onder anaerobe omstandigheden (80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂). Na vijf dagen werd door middel van de muisneutralisatie [Notermans et al., 1981] onderzocht of en zo ja welke botulinum toxinen aanwezig waren. Indien in één van de onderzochte hoeveelheden botulinum toxine kon worden aangetoond, werd het desbetreffende monster als positief beschouwd.

Detectielimiet van *C. botulinum*

Aan verschillende porties uitgegist slib van de installatie te Bilthoven (waarvan eerder uitgevoerd onderzoek op *C. botulinum* negatief was), werden bekende hoeveelheden sporen van laboratoriumstammen van *C. botulinum* toegevoegd. Na mengen werd driemaal 1 gram overgebracht in buizen FEM. Na anaerobe incubatie bij 30 °C gedurende vijf dagen werd de cultuurvloei stof onderzocht op de aanwezigheid van toxinen.

Groei van *C. botulinum* in slib onder laboratoriumomstandigheden

a. Van te voren negatief bevonden monsters vers en uitgegist slib werden gepasteuriseerd (10 min bij 70 °C), gesteriliseerd (15 min bij 121 °C) of niet behandeld en vervolgens beënt met een bekend aantal sporen van *C. botulinum*. De monsters

TABEL I - Kenmerken van de onderzochte installaties.

Installatie	De Bilt	Alphen-Noord	Utrecht	Raalte	Schijndel
Belasting (i.e. x 10 ³)					
- ontwerp	50	40	390	51	32
- actueel	70	32	275	30	20
- % industrieel	30	0	25	40	20
Zuivering	voorbezinking beluchting (punt, borstel) nabezinking	voorbezinking oxydatiebed nabezinking	voorbezinking oxydatiebed beluchting (punt) nabezinking	voorbezinking (AVR- dosering) beluchting (bellen) nabezinking	voorbezinking beluchting (punt) nabezinking
Verhouding primair/ secundair slib (op droge stofbasis)	1 : 0,5	1 : 0	1 : 0,3	1 : 1,5	1 : 0,5
Slibgisting					
- temperatuur (°C)	32	32-35	32-35	33	33
- tijd (dagen)	30	120	15	22	31
Droge stofgehalte (g/l)					
- vers slib	2,5	3,1	4,4	3,3	2,8
- uitgegist slib	2,6	2,8	5,1	3,7	4,3
Slibontwatering	droogbed storten	droogbed	droogbed zeefbandpers	nee	nee
Slibafzet	compos- tering	composter- storten	composter- storten	landbouw	landbouw
Specifieke lozingen	katalysator vetharding	—	slachthuis (varken, rund)	slachthuizen (rund)	pluimvee- mesterijen

TABEL II - Het voorkomen van *C. botulinum* in monsters influent, vers en uitgegist slib en slib van droogbedden.

Installatie	Monster	Aantal monsters		B	Toxine type		
		onderzocht	positief		C/D	E	no/ntt ¹
De Bilt	influent	6	1	1	0	0	0
	vers slib	10	2	2	0	0	0
	uitgegist slib	10	1	1	0	0	0
Alphen a/d Rijn	influent	6	2	0	1	0	1
	vers slib	6	4	0	0	2	2
	uitgegist slib	5	2	0	0	2	0
	droogbedden	4	4	1	1	2	1
Utrecht	influent	5	1	0	0	0	1
	vers slib	5	1	0	0	0	1
	uitgegist slib	6	2	1	0	0	1
Schijndel	influent	7	5	2	2	0	2
	vers slib	9	6	1	3	0	2
	uitgegist slib	7	6	1	2	0	3
	droogbedden	2	2	2	1	0	1
Raalte	influent	7	2	2	0	0	0
	vers slib	10	8	5	0	0	3
	uitgegist slib	10	9	6	0	0	3

1 niet onderzocht of niet te typeren (door te lage hoeveelheid toxine).

werden vervolgens anaeroob geïncubeerd bij 30 °C. Na vijf dagen werd onderzocht op de aanwezigheid van toxine in supernatant van het bij 8000 g gedurende 15 min gecentrifugeerde slib.

b. Monsters vers en uitgegist slib werden gedurende 20 min bij 10.000 g gecentrifugeerd. Het supernatant werd vervolgens gefiltreerd door resp. een papierfilter (Whatman no. 1), of door membraanfilters (Millipore type HA, poriëngrootte resp. 0,45 en 0,22 µm). Na filtratie werd een bekend aantal sporen van stam B-Okra toegevoegd en werden de buizen anaeroob bij 30 °C geïncubeerd. Na 5 dagen werd de cultuurvloeistof onderzocht op de aanwezigheid van toxine door middel van de muisneutralisatietest.

Resultaten

Het onderzoek naar het voorkomen van *C. botulinum* in rioolwater en slib is samengevat in tabel II. De kiem kon één of meerdere malen worden aangetoond in het influent van alle installaties, met name monsters uit Schijndel waren frequent besmet. In vers en uitgegist slib werd de kiem vaker aangetroffen dan in het influent. Tussen de beide soorten slib onderling was geen duidelijk verschil in de mate van besmetting. Wel was het percentage positieve monsters per installatie sterk verschillend. Vooral in Raalte en in Schijndel werd de kiem in een hoog percentage van de monsters slib aangetroffen. In een zestal monsters, genomen van de slibdroogbedden te Alphen aan de Rijn en te Schijndel, was *C. botulinum* steeds aantoonbaar. Niet alleen in het percentage met *C. botulinum* besmette monsters, maar ook in het dominante serotype, bleken de installaties onderling te verschillen. *C. botulinum* type

B werd in alle installaties aangetoond en was in drie installaties zelfs het enige voorkomende type. In De Bilt en in Utrecht waren slechts enkele monsters besmet met type B, in Raalte daarentegen werd type B zeer frequent als enige type aangetroffen. In Schijndel werd naast type B ook regelmatig een type aangetroffen waarvan het toxine werd geneutraliseerd door een mengsel van antisera tegen de typen C en D. Waarschijnlijk betrof het type C, doch dit werd niet nader onderzocht. In Alphen aan de Rijn domineerde type E. De gevoeligheid van de gebruikte detectiemethode werd getest door toevoegen van bekende aantallen sporen van verschillende typen van *C. botulinum* aan slib. Uit de resultaten, die zijn weergegeven in tabel III, bleek dat de detectiegrens van type B kleiner was dan 10 sporen per gram slib (natgewicht). De typen A en E konden worden aangetoond wanneer een hoeveelheid sporen van 50-100 per gram slib aanwezig was. De detectielimiet van type C kon niet worden bepaald omdat daarvan geen sporensuspensie voorhanden was. De mogelijkheid tot vermeerdering van *C. botulinum* in slib werd nagegaan in een aantal laboratoriumexperimenten. Uit tabel IV blijkt dat geen van de aan vers of uitgegist slib toegevoegde stammen in staat

TABEL III - Detectielimiet van *C. botulinum*-sporen in slib.

Aantal sporen toegevoegd per gram slib	Productie van toxine (drievoud) door <i>C. botulinum</i> type			
	A-62	B-Okra	B-JBD	E-RIV 1
1000	+++	+++	+++	+++
500	+++	+++	+++	+++
100	++	+++	++	++
50	++	++	++	++
10	---	+++	++	---

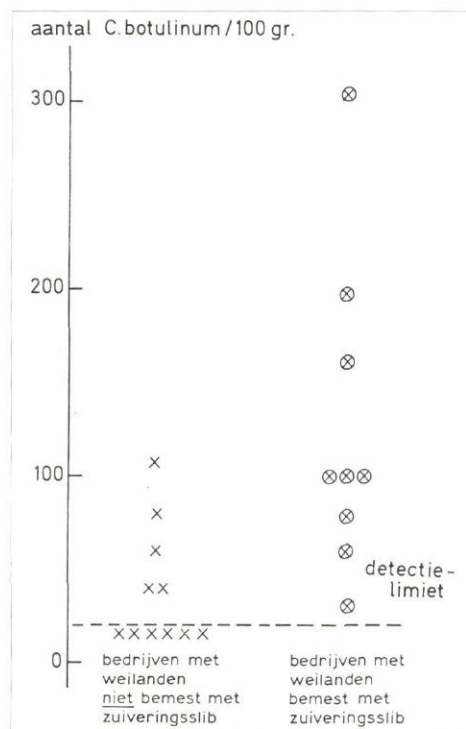
TABEL IV - Invloed van hittebehandeling op de groei van *C. botulinum* in slib.

Aantal sporen (en type) toegevoegd per gram	Soort slib	Toxineproductie na behandeling:		
		geen	pasteurisatie	sterilisatie
100 (A-62)	vers	—	—	+
	uitgegist	—	—	+
1000 (B-Okra)	vers	—	—	+
	uitgegist	—	—	+
20 (B-JBD)	vers	—	—	+
	uitgegist	—	—	+
250 (E-RIV 1)	vers	—	—	—
	uitgegist	—	—	—

was toxine te produceren gedurende een anaerobe incubatie van 12 dagen bij 30 °C. Pasteurisatie van het slib, voorafgaand aan de beënting, had geen invloed op de uitgroei van *C. botulinum*. Echter, wanneer het slib eerst werd gesteriliseerd, bleken de typen A en B (2 stammen) wel tot toxineproductie in staat, zowel in vers slib als in uitgegist slib. Door middel van onderzoek van verschillende verdunningen kon worden aangetoond dat de hoeveelheid toxine die door *C. botulinum* stam B-Okra in vers slib werd geproduceerd, beduidend hoger was dan in uitgegist slib: 30.000 vs. 4.000 muis i.p. LD₅₀ (ter vergelijking: onder optimale omstandigheden in een cultuurmedium wordt ca. 100.000 muis i.p. LD₅₀ gevormd); (één muis i.p. LD₅₀ is de hoeveelheid toxine aanwezig in 0,5 ml van het monster waarvan 50 % van de gebruikte muizen sterft bij intraperitoneale toediening). Wanneer supernatant van gecentrifugeerd slib door een papierfilter werd gezogen, bleek stam Okra niet in staat te zijn in het filtraat toxine te vormen (tabel V). Sterilisatie van het filtraat bevorderde de toxineproductie niet. Na filtratie door een membraanfilter (poriëngrootte 0,45 of 0,22 µm) bleek in het filtraat van vers slib wel toxineproductie mogelijk, doch niet in dat van uitgegist slib. De resultaten van een oriënterend onderzoek naar het voorkomen van *C. botulinum* op wel en niet met zuiveringsslib bemeste weilanden, zijn weergegeven in afb. 1. Uit dit onderzoek blijkt dat monsters van met zuiveringsslib van de installatie te Raalte bemeste weilanden alle positief waren op *C. botulinum* (gemiddeld ca. 100 kiemen/100 g). Van niet met slib bemeste weilanden

TABEL V - Groei van *C. botulinum* type B-Okra (10 sporen/ml) in slibfiltraat.

Soort slib	Behandeling filtraat	Toxineproductie na filtratie door:		
		papier filter	0,45 µm	0,22 µm
vers	geen	—	+	+
	gesteriliseerd	—	+	+
uitgegist	geen	—	—	—
	gesteriliseerd	—	—	—



Afb. 1 - Voorkomen van *C. botulinum* op niet en wel met zuiveringsslib bemeste weilanden.

werd slechts 50 % positief bevonden (gemiddeld ca. 10 kiemen/100 g).

Discussie

Uit de resultaten van dit onderzoek valt af te leiden dat *C. botulinum* regelmatig aanwezig is in zuiveringsslib, zoals dit wordt aangeboden voor bemestingsdoeleinden. Tussen de onderzochte installaties bleken grote verschillen te bestaan, zowel wat betreft de mate van besmetting van het slib als het dominerende type van *C. botulinum*. Overigens dient hierbij opgemerkt te worden dat de detectiegrens voor de verschillende *C. botulinum*-typen kan verschillen. Er was geen duidelijk verschil tussen de percentages positieve monsters van vers en uitgegist slib. Dit duidt erop dat vermeerdering van de kiem tijdens de anaerobe vergisting niet optreedt. Een reductie van het aantal kiemen, dat wordt gevonden voor vele andere soorten bacteriën en ook voor virussen, protoza en wormeieren, treedt echter evenmin op. Groei van *C. botulinum* in slib was wel mogelijk na sterilisatie door autoclaveren of door membraanfiltratie. Hieruit kan worden afgeleid dat de noodzakelijke nutriënten wel in slib aanwezig zijn, terwijl tevens aanwijzingen werden verkregen dat de hoeveelheid nutriënten in vers slib groter was dan die in uitgegist slib. Het uitblijven van groei van *C. botulinum* tijdens de anaerobe vergisting moet dan ook worden toegeschreven aan remming

door andere micro-organismen. Gezien hun overleving van het pasteurisatieproces, moeten deze micro-organismen mede tot de sporenvormers behoren. Met andere woorden, de groei van *C. botulinum* in zuiveringsslib wordt naar alle waarschijnlijkheid geremd door de aanwezigheid van andere clostridia. Deze bacteriën konden inderdaad in grote aantallen (ca. 5×10^7 /g drogestof) in zowel vers als uitgegist slib worden aangetoond. Onder de clostridia was de soort *C. perfringens* sterk overheersend. Deze kiem, die in ca. 40 % van de faeces van gezonde mensen wordt aangetroffen in aantallen van 10^4 per gram nat gewicht [Cabelli, 1978], komt normaal in rioolwater voor in aantallen van ca. 10^3 per ml. Dat de aanwezigheid van *C. sporogenes* de toxinevorming door *C. botulinum* kan verhinderen, werd reeds beschreven door Jordan and Dack [1924]; door Smith [1975] werd hetzelfde effect aangetoond voor *C. perfringens*.

Samenvattend kan gesteld worden dat de in zuiveringsslib voorkomende *C. botulinum* kiemen afkomstig zijn uit het toegevoerde rioolwater. Tengevolge van indikking zijn monsters vers slib vaker positief dan monsters rioolwater, en omdat de kiem de anaerobe gisting overleeft, is ook uitgegist slib besmet. De nog verdere indikking die plaatsvindt op slibdroogbedden, leidt tot een nog hoger besmettingspercentage. De vraag is nu wat de oorsprong is van de in rioolwater voorkomende *C. botulinum* kiemen. Uit de verschillende besmettingspercentages en typen in de onderzochte rioolwaterzuiveringsinstallaties volgt dat besmetting met huishoudelijk afvalwater onwaarschijnlijk is. Als mogelijke bronnen blijven dan over industrieel afvalwater of hemelwater. De hoge besmettingspercentages in Raalte en Schijndel zouden inderdaad door specifieke industriële effluente kunnen worden verklaard. In Raalte, waar frequent type B werd aangetroffen, wordt het afvalwater behandeld van twee runderslachterijen. Onder runderen is in de afgelopen jaren een aantal botulisme-uitbraken veroorzaakt door *C. botulinum* type B [Haagsma en Ter Laak, 1978]. Onderzoekingen in het rioolwater van een slachterij te Raalte hebben echter nog niet tot de isolatie van *C. botulinum* geleid. In Schijndel, waar type C of D (vermoedelijk type C) dominant was, zijn veel kippenmesterijen op de riolering aangesloten. *C. botulinum* type C veroorzaakt in Nederland regelmatig gevallen van botulisme in pluimveemestbedrijven [Haagsma en Ter Laak, 1977]. Omtrent de betekenis van de aanwezigheid van *C. botulinum* in zuiveringsslib kunnen op basis van het huidige onderzoek nog geen uitspraken worden gedaan. Weliswaar werd een verhoging van het aantal kiemen

op met slib uit Raalte bemeste weilanden aangetoond, doch of deze aantallen aanleiding geven tot het ontstaan van kringlopen op rundveebedrijven, is nog niet onderzocht. Bovendien is het aantal onderzochte monsters nog te klein om een definitieve conclusie te rechtvaardigen. In de komende jaren zal het onderzoek naar de besmetting van weilanden en het eventuele ontstaan van kringlopen op de betreffende bedrijven, nog worden voortgezet.

Dankbetuiging

Veel dank is verschuldigd aan de beheerders van de rioolwaterzuiveringsinstallaties, de heren N. Flemming (De Bilt), A. J. Tijsterman (Alphen-Noord), G. Houwer (Utrecht), J. Jonkers (Raalte) en J. van der Heijden (Schijndel) voor hun medewerking bij de uitvoering van het onderzoek en het beschikbaar stellen van gegevens. Bij de uitvoering van de bemonstering werd medewerking verleend door de heer J. Sint (Veterinaire Hoofdinspectie van het Staats-toezicht op de Volksgezondheid).

Literatuur

- Cabelli, V. J. (1978). *Obligate anaerobic indicators*. In Berg, G. (ed). *Indicators of viruses in water and food*. Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor Mich., p. 173.
- Engers, L. E. van (1980). *Enquête betreffende de produktie, bestemming en kwaliteit van zuiveringsslib in Nederland in het jaar 1978*. H₂O (13) 1980, blz. 293 - 294.
- Haagsma, J. (1973). *Etiology and epidemiology of botulism in waterfowl in The Netherlands*. Proefschrift Rijksuniversiteit, Utrecht.
- Haagsma, J. en Laak, E. A. ter (1977). *Bijdrage tot de etiologie en de epidemiologie van botulismus bij slachtkuikens*. Tijdschr. Diergeneesk. 102, 429 - 436.
- Haagsma, J. en Laak, E. A. ter (1978). *Atypical cases of type B botulism in cattle caused by supplementary feeding of brewers' grains*. Neth. J. Vet. Sci. 103, 312 - 325.
- Jordan, O. E. and Dack, G. H. (1924). *The effect of Clostridium sporogenes on Clostridium botulinum*. J. Inf. Dis. 35, 576 - 580.
- Notermans, S., Breukink, H. J., Wensing, T. and Wagenaar, G. (1978). *Incidence of Clostridium botulinum in the rumen contents and faeces of cattle fed brewers' grains naturally contaminated with Clostridium botulinum*. Neth. J. Vet. Sci. 103, 1327 - 1333.
- Notermans, S., Kozaki, S. and Schothorst, M. van (1979). *Toxin production by Clostridium botulinum in grass*. Appl. Environm. Microbiol. 38, 767 - 771.
- Notermans, S., Havelaar, A. H. and Schellart, J. (1980). *The occurrence of Clostridium botulinum in raw-water storage areas and their elimination in water treatment plants*. Water Research 14, 1631 - 1635.
- Notermans, S., Dufrenne, J. and Oosterom, J. (1981). *Persistence of Clostridium botulinum type B on a cattle farm after an outbreak of botulism*. Appl. Environm. Microbiol. 41, 179-183.
- Smith, L. D. (1975). *Inhibition of Clostridium botulinum by strains of Clostridium perfringens isolated from soil*. Appl. Microbiol. 30, 319-323.