

Microbiologisch-hygiënische kwaliteit van spuislib van de biologische zuivering van gemeentelijk afvalwater (methoden voor onderzoek en resultaten)

Inleiding

De biologische zuivering van afvalwaters geschiedt in België bijzonder ofwel volgens het actief slib systeem ofwel volgens het bacteriebed systeem. In beide gevallen wordt slib gevormd: primair slib afkomstig van de voorbezinking van het rauwe afvalwater en secundair slib, afkomstig bijzonder van de aangroei van biomassa in het zuiveringssysteem. Volgens Escritt [1965] varieert de hoeveelheid primair slib uit huishoudelijk afvalwater van 1,1 tot 2,3 liter per dag en per persoon en



R. POFFÉ

Laboratorium voor
Industriële Microbiologie
& Biochemie
Universiteit Leuven

H. VAES

Laboratorium voor
Industriële Microbiologie
& Biochemie
Universiteit Leuven



E. VAN DEN EYNDE

Laboratorium voor
Industriële Microbiologie
& Biochemie
Universiteit Leuven



H. VERACHTERT

Laboratorium voor
Industriële Microbiologie
& Biochemie
Universiteit Leuven

schommelt het vochtgehalte tussen 95 en 98 %. Voor een zuiveringsinstallatie van 100.000 I.E. betekent dat meer dan 5 ton drogestof per dag. Volgens Imhoff *et al.* [1971] worden er per dag en per persoon ook 13 g drogestof aan secundair slib geproduceerd door bacteriebedden (met een oorspronkelijk watergehalte van dit slib van rond de 95 %) en rond de 30 g drogestof in actief slib systemen (met een oorspronkelijk watergehalte gaande tot 99 %). Met het toenemend aantal zuiveringsinstallaties zal de hoeveelheid slib steeds stijgen en worden regelmatig vragen gesteld omtrent de aanwending van dit slib, dat uiteindelijk een nieuw afvalprodukt is. In de meeste gevallen wordt het slib gedroogd, dikwijls na indikking, waarbij al dan niet chemicaliën worden gebruikt. Het drogen kan geschieden aan de lucht in slibbedden of na ontwatering van het slib m.b.v. centrifuges, filter-

persen, enz. Het niet ontwaterd slib kan ook eerst onderworpen worden aan aerobe stabilisatie of aan anaerobe digestie. Beide processen resulteren in volumevermindering. Anaeroob vergist slib heeft een watergehalte van rond de 93 %. Biologische stabilisatie leidt ook tot slib dat gemakkelijker op droogvelden kan ontwaterd worden. Stabilisatie is echter in elk geval noodzakelijk aangezien vers slib, door het hoog gehalte aan organische stof, gemakkelijk onderhevig is aan microbiële afbraak, met als gevolg stankemissie. Deze stabilisatie kan ook worden bekomen door chemische of door thermische behandelingen.

Mogelijke afvoerwegen voor slib zijn compositering, verbranding, pyrolyse en gebruik in land- en tuinbouw als meststof en grondverbeteraar. Enkele jaren terug hebben wij reeds de extractie van proteïnen uit slib beschreven met als doel slib te valoriseren als veevoeder [Verachtert en Houtmeyers, 1976]. Dit project hebben we recent terug in uitvoering gebracht. Hoe dan ook, voor verschillende toepassingsmogelijkheden kan slib een gevaar betekenen van microbiologisch-hygiënische aard. Bijzonder in slib van huishoudelijke oorsprong of afkomstig van hospitaal of de veeteeltsector zal de aanwezigheid van pathogene kiemen een risico kunnen inhouden. Tot de pathogene kiemen die kunnen voorkomen in huishoudelijk afvalwater, behoren bacteriën van de geslachten *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Clostridium*, *Leptospira*, *Mycobacterium*, fungi zoals *Candida albicans* en *Aspergillus fumigatus*, protozoën als *Entamoeba*, wormen en wormeieren van *Ascaris*, *Taenia* en enterovirussen zoals de *Poliovirus*, de *Coxsackievirussen*, de *Echo*-, *Adeno*- en *Reovirussen* en de *hepatitis virus A*.

Volgens Kabler [1959] en vele andere auteurs zouden actief slib systemen leiden tot betere verwijdering van pathogene bacteriën dan bacteriebedden. In een recente studie [Yaziz E Lloyd, 1979] gespreid over negen maanden, werden van 1300 tot 1700 *Salmonella*-kiemen geteld per liter rauw influent. Actief slib systemen verwijderden hiervan gemiddeld 99,88 % en bacteriebedden 93,04 %. Primaire bezinking leidde reeds tot rond de 75 % verwijdering, wat laat veronderstellen dat primair slib sterk besmet was. De overige kiemen komen terecht in het secundair slib. Een groot aantal werd waarschijnlijk afgedood gedurende de behandeling. Studies over de verdere overleving van pathogene kiemen in slib zijn niet talrijk.

Kampelmacher en Jansen [1974] bv. onderzochten de mogelijke contaminatie van graasland bemest met vergist slib. In dit onderzoek werd analoog getracht aan te tonen welke de contaminatiegraad is van verschillende slibsoorten en te verifiëren of de microbiologische methoden voor wateronderzoek ook toepasbaar zijn op slib, waarvan de consistentie en het drogestofgehalte zeer sterk kan variëren met de ouderdom [Bolton en Klein, 1971].

Methodiek

1. Bemonstering en monsterbehandeling

Van 10 zuiveringsinstallaties voor huishoudelijk afvalwater werden 27 slibmonsters onderzocht. Hun karakteristieken zijn omschreven in tabel I. Het waren monsters ofwel van actief slib, gedroogd spuislib of gestabiliseerd slib. Van gedroogd spuislib werd op 10 plaatsen een monster genomen, dat na verwijdering van de oppervlaktelaag werd overgebracht in steriele recipiënten. Daarna werden de deelmonsters verzameld in één mengmonster. Van het thermisch gedroogd slib werden de monsters genomen uit zakken waarin het als korrelig produkt was verpakt. De monsters werden meestal onmiddellijk na aankomst op het laboratorium onderzocht. Actief slib, secundair slib en retourslib zijn zeer vloeibaar en kunnen als dusdanig, na homogenisatie, gebruikt worden voor de microbiologische bepalingen. Slib dat na drogen hard en korrelig was geworden, werd eerst in een mortier fijn gewreven. Van alle slibsoorten werd dan een hoeveelheid overeenstemmend met ongeveer 1 g drogestof gesuspenseerd in 50 ml fysiologisch water en met een snel draaiende Lourdes mixer (Model MM-1A) op maximale snelheid gemengd. Er werd nagespoeld met nog 50 ml steriel fysiologisch water zodat een suspensie bekomen werd, die ongeveer 1 g droge slibstof bevatte per 100 ml. De invloed van de mengtijd werd nagegaan met een slibmonster van 7 maanden en een drogestofgehalte van 85,3 %. Na menging variërend van 0,5 tot 2,5 minuten werd het monster onderzocht op totaal aerob kiemgetal en aantal *Enterobacteriaceae*. Afb. 2 toont dat 1,5 min. menging voldoende is.

2. Microbiologische bepalingen

Microbiologische bepalingen werden uitgevoerd volgens het schema weergegeven in afb. 1.

2.1. Aerob kiemgetal

Dit werd bepaald op Trypton Soya agar na drie dagen incubatie op 28–30 °C.

TABEL I - Voornaamste karakteristieken van de onderzochte zuiveringsstations en aard en ouderdom van de onderzochte slibmonsters.

Zuiveringsstation	Capaciteit (I.E.)	Biologische zuivering (a)	Slibbehandeling (b)	Aard en ouderdom der slibmonsters (c)
I	15.000	bb.	an. ferm.	g.s. 7, 8 m.
II	25.000	bb.	an. ferm.	g.s. 1, 2, 3 m.
III (d)	62.000	bb.	an. ferm.	h.s.: g.s. 1 d., 5 m.
IV	80.000	bb.	an. ferm.	g.sps. 4 m.
V (d)	5.000	a.s.	aer. stab.	g.s. 3 w., 7 m.
VI	15.000	a.s.	aer. stab.	gest.s.: g.s. 5 m.
VII	20.000	a.s.	an. ferm.	rs.: g.s. 3 w.
VIII	30.000	a.s.	an. ferm.	a.s.; rs.: g.s. 4 d., 1 w., 2 w.
IX	40.000	a.s.	an. ferm.	rs.: g.s. 2 m.
X	35.000	a.s.	therm.dr.	rs.: g.s. 3 w.

- (a) bb.: bacteriebedden; a.s.: actief slib;
- (b) an. ferm.: anaerobe fermentatie; aer. stab.: aerobe stabilisatie; therm.dr.: chemisch conditioneren gevolgd door thermisch drogen;
- (c) g.s.: gedroogd spuislib; a.s.: actief slib; gest.s.: gestabiliseerd slib; rs.: retourslib; d.: dag(en); w.: we(ek)(en); m: maand(en); hs.: humusslib
- (d) spuislib werd gedroogd in overdekte slibdroogvelden.

2.2. Enterobacteriaceae

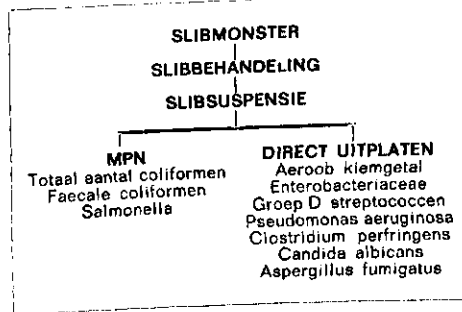
Violet Red Bile Glucose Agar volgens Mossel [1978] werd angewend. Paarsrode kolonies omgeven door een rode hof werden geteld na 24 uur incubatie op 35 °C.

2.3. Coli-achtigen en faecale coli-achtigen

Coli-achtigen werden bepaald volgens de MPN-methode met Lauryl Tryptosebouillon in de presumptieve test en Brilljantgroen Gal Lactosebouillon als bevestigende test [Standard Methods, 1971]. Faecale coli-achtigen werden bepaald volgens de MPN-methode door overenting van de positieve buisjes in de presumptieve test enerzijds in EC-bouillon, waarbij gasvorming wordt onderzocht, anderzijds in tryptone water waar indolvorming wordt opgezocht. Beide werden nagekeken na incubatie van 48 uur op 44 ± 0,5 °C. Deze methode vergt veel materiaal en tijd en ze werd vergeleken met de membraanfiltermethode. Daarvoor werden 10 ml van gepaste verdunningen van de actief slib-suspensie gefiltreerd op membranen (Gelman, 0,45 µm). Voor de gedroogde slibmonsters werden tot 100 ml van de suspensie gefiltreerd. Om sub-lethaal beschadigde cellen op te sporen, werden de membraanfilters eerst gedurende 2 uur bebroed op een resuscitatiemedium bestaande uit schijfjes verzadigd met Tryp-

TABEL II - Vergelijking van de MPN- en de M-FC agar-methode (membraanfiltermethode) voor het bepalen van het aantal faecale coliformen in slibmonsters.

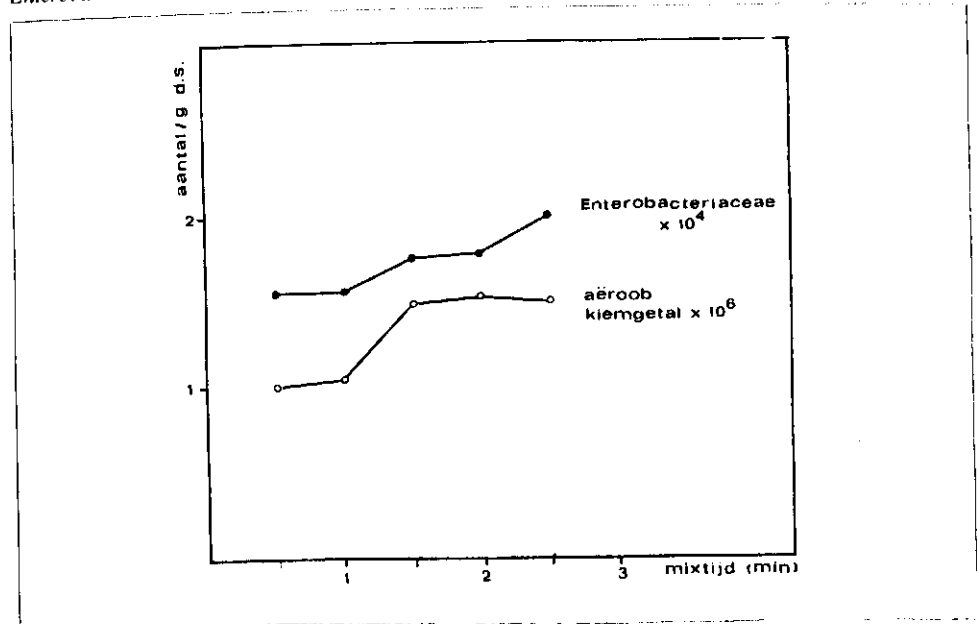
Aard en ouderdom der slibmonsters	Aantal faecale coliformen/g droge stof	
	MPN	M-FC Agar
retourslib	2,19.10 ⁵	2,86.10 ⁵
	2,76.10 ⁵	8,21.10 ⁵
spuislib 2 maanden	7,15.10 ²	niet telbaar



Afb. 1 - Schematisch overzicht van de verschillende microbiologische bepalingen uitgevoerd op de slib-suspensie (zie slibbehandeling).

tone Soya Gistextract-bouillon volgens Bissonnette et al. [1977]. Daarna werden de filters overgebracht op M-FC agar volgens Standard Methods [1971]. De

Afb. 2 - Invloed van de mixtijd der slibmonsters op het aerob kiemgetal en het aantal Enterobacteriaceae.



petrischalen, ingesloten in plastic zakjes, werden in incubatie gebracht in een waterbad, geregeld op 44 ± 0,5 °C, en na 24 uur onderzocht. Faecale coli-achtigen (*E. coli*) geven blauwe kolonies. Voor gedroogde slibmonsters bleek het aantal coli-achtigen laag wat filtratie vergde van de 100 ml suspensie. Dit resulteerde in belangrijke afzetting op de filter van slibbestanddelen hetgeen de groei van de bacteriën afremde of het observeren van kolonies erg moeilijk maakte. Waar actief slib (of andere zeer vloeibare slib-suspensies) gebruikt werd, kwamen de resultaten van de membraanmethode goed overeen met de MPN-methode en was de membraanmethode geschikt (tabel II).

2.4. Salmonella

Harvey en Price [1979] vergeleken verschillende methoden voor de opsporing van *Salmonella*. Als ophopingsmedium raadden zij Selenietbouillon of Muller-Kauffmann's Tetrathionaat-bouillon aan, zelfs beide media wanneer het monster meer dan één serotype zou kunnen bevatten. Kenner en Clark [1974] ontwikkelden een methode om *Salmonella* aan te tonen samen met *Pseudomonas aeruginosa* in monsters van verschillende waterklassen. Wij hebben de methode van Kenner en Clark vergeleken met deze van Muller-Kauffmann. In de Kenner-Clark-methode wordt eerst aangerijkt in een MPN-methode met Dulcitol Seleniet-Bouillon (DS) en bevestiging door uitstrijken op Xylose Lysine Desoxycholaat agar (XLD). De *Salmonella*-stammen geven hierop rode kolonies met zwarte center. Aan het medium kan novobiocine

(5 µg per ml) worden toegevoegd om bacteriën zoals *Proteus* te onderdrukken [Restaino, 1977]. Typische kolonies op XLD worden dan verder onderzocht op H₂S-vorming in Kliger IJzer agar en urease activiteit in Ureum agar. Alle *Salmonella* vergisten in Kliger medium de glucose maar niet de lactose, met gasvorming, en ze vormen H₂S met uitzondering van *S. paratyphi* en *S. cholerae suis*. Alle zijn urcase negatief. De methode Muller-Kauffmann is ook een MPN-methode met aanrijking in Tetrathionaat Bouillon en bevestiging door uitstrijken op Brilljantgroen agar (BG). Tetrathionaat reducerende bacteriën zijn o.a. *Salmonella* en *Proteus* [Knox *et al.*, 1943] waarvan *Proteus* kan worden onderdrukt met novobiocine [Jeffries, 1959]. Op BG wordt *Salmonella* onderscheiden van andere enterobacteriën: *Salmonella* zuurt het medium zwak aan, coliformen meer. *Salmonella* vormt dan rode kolonies en de coliformen gele. Voor evaluatie van beide methodes werden spuislibmonsters, geënt met *S. typhimurium*, onderzocht. De resultaten in tabel III duiden op een goede terugwinning van *Salmonella* en vergelijkbare resultaten voor beide methoden, uitgezonderd voor het monster van 7 maanden.

Beide methodes werden ook toegepast voor de analyse van spuislibmonsters van verschillende ouderdom en behandeling.

TABEL III - Vergelijking van de methode van Kenner en Clark met de methode volgens Muller-Kauffmann voor het bepalen van *Salmonella* in spuislibsuspensies geënt met *Salmonella typhimurium*.

Ouderdom der spuislibmonsters	Aantal <i>Salmonella</i> /g drogestof teruggevonden		
	geënt	Kenner en Clark	Muller-Kauffmann
1 week	2,3 · 10 ⁶ 19	1,3 · 10 ⁶ 38	1,4 · 10 ⁵
7 maanden	5,1 · 10 ⁵	3,9 · 10 ³	2,8 · 10 ⁵

TABEL IV - Vergelijking van de methode van Kenner en Clark met de methode volgens Muller-Kauffmann voor het bepalen van *Salmonella* in enkele niet-geënte spuislibmonsters.

Zuiveringsstation	Ouderdom der spuislibmonster	Aantal <i>Salmonella</i> /g drogestof	
		Kenner en Clark	Muller-Kauffmann
VIII	1 week	0	0
VIII	2 weken	0	0
V	3 weken	2	0
V	7 maanden	0	0
II	1 maand	0	0
II	2 maanden	0	0
II	3 maanden	0	0

Tabel IV toont aan dat geen *Salmonella* werd gevonden in de onderzochte monsters, uitgezonderd voor één monster, waar met de methode van Kenner en Clark

twee *Salmonella*-kiemen per g werden aangetoond. Deze laatste methode zal aangewend worden.

2.5. *Pseudomonas aeruginosa*

De methode van Kenner en Clark voor *Salmonella* zou ook toelaten *Ps. aeruginosa* te bepalen. Deze worden aangerijkt in DS-bouillon in de MPN-methode na incubatie op 40 °C. Op XLD agar geven ze dan slijmerige roosrode kolonies. Bevestiging geschiedt door opzoeken van pigmentvorming op Tech agar.

Dit pigment, pyocyanine, wordt dan extraheerd met choroform. Na enig onderzoek werd besloten deze methode niet te gebruiken aangezien DS-bouillon remmend werkte op *Ps. aeruginosa* en de MPN-methode dan te lage resultaten gaf. Er werd overgeschakeld naar enting rechtstreeks op Cetrimide Nalidixinezuur agar [Lowbury, 1955; Goto en Enomoto, 1970], en incubatie op 37 °C gedurende 24 tot 48 uur. Kolonies van *Ps. aeruginosa* zijn blauwgroen gekleurd of gaan licht fluorescerend zijn onder UV-licht. Voor verdere bevestiging worden een 20-tal kolonies willekeurig gekozen voor overenting in King's A agar en incubatie op 40 °C gedurende 24 uur. Pyocyaninevorming en oxydase reactie worden dan onderzocht.

2.6. D-streptococci

Kanamycine-Esculine-Azide agar [Mossel, 1977] wordt gebruikt. Na incubatie gedurende 18 tot 24 uur op 37 °C telt men de bruinzwarte kolonies.

2.7. *Clostridium perfringens*

Op Tryptose Sulfit Cycloserine agar [Harmon *et al.*, 1971] werden de zwarte kolonies geteld, na incubatie op 46 °C in anaerobiose (Gaspak-systeem) gedurende 12 uur. De zwarte kolonies zijn omgeven door een troebele hof als gevolg van lecithinase werking.

2.8. *Candida albicans*

Deze asporogene gist komt voor in uitwerpselen van normale individuen van alle leeftijd [Rose en Harrison, 1969]. Hij is commensaal, doch kan oorzaak zijn van huidinfecties en mond- en keelaandoeningen. Gekende media voor de opsporing van deze gist zijn: *Candida Molybdaat* Differentiatie agar [Mc Laren, 1960], Pagano-Levin agar [Pagano *et al.*, 1958], gemodificeerde Pagano-Levin agar [Stedham *et al.*, 1966] en *Candida* selectieve agar [Nickerson, 1953]. Deze media werden vergeleken met elkaar. Daarvoor werden gesteriliseerde (20 min., 120 °C) en niet gesteriliseerde spuislibmonsters eerst geënt met *C. albicans*. Vier verschillende media

werden geënt met monsters die respectievelijk 2 · 10⁻², 2 · 10⁻³ en 2 · 10⁻⁴ g droge slibstof per ml bevatten. De media werden onderzocht na drie dagen incubatie op 37 °C. Er werd vastgesteld dat met 2 · 10⁻² en 2 · 10⁻³ g slib drogestof soms remming optrad van gistgroei. Ook ontwikkelden zich te veel vreemde kolonies hetgeen de identificatie van *C. albicans* sterk bemoeilijkt. Op *Candida* selectieve agar bekwamen de beste terugwinning van de gist en de minste invloed van slibbestanddelen op deze groei. *C. albicans* vormde op dit medium donkerbruine tot zwarte kolonies met gekartelde rand. Op dit medium wordt de groei van andere gisten geremd door bismuth-sulfiet. Nochtans ook met dit medium, zoals blijkt uit tabel V, was de terugwinning slechts iets boven de 50%. Verder onderzoek lijkt hier noodzakelijk.

TABEL V - Recovery van *Candida albicans* op *Candida Selective Agar* (Nickerson) vanaf gesteriliseerde en niet-gesteriliseerde spuislibsuspensies (0,02 g drogestof/100 ml) geënt met 1720 eenheden per ml.

Ouderdom spuislib	Aantal <i>Candida albicans</i> eenheden/ml teruggevonden in geënte spuislibsuspensies	
	gesteriliseerde	niet gesteriliseerde
1 dag	760	900
4 dagen	—	399
3 weken	930	700
2 maanden	150	700
4 maanden	630	800
5 maanden	1150	900

2.9. *Aspergillus fumigatus*

Deze schimmel komt frequent voor in gecomposteerd huishoudafval en spuislib. Hij ontwikkelt tussen 20 en 50 °C en kan bij de mens longontstekingen geven en andere aandoeningen (aspergillose) [Klopper *et al.*, 1973; Kane en Mullins, 1973; Milner *et al.*, 1977].

De laatstgenoemde auteurs ontwikkelden een methode om de schimmel op te sporen in gecomposteerd huishoudelijk slib, met gebruik van Ossegal Antibiotica agar. Het medium bevatte streptomycine (50 µg per ml), penicilline (10 µg per ml) en aureomycine (2 µg per ml). Entingen werden in viervoud uitgevoerd: twee petriplaten werden op 44 °C en twee op 25 °C bebroed gedurende drie dagen. *A. fumigatus* geeft op 44 °C bruine kolonies met donker center (als gevolg van sporulatie). Op 25 °C is er geen sporulatie en bekomt men een andere morfologie; op die temperatuur telt men het aantal mesofiele fungi. De methode werd uitgetest op spuislib door aan gesteriliseerd en niet gesteriliseerd spuislib een gekend aantal kolonievormende eenheden van *A. fumigatus* toe te voegen, en na te gaan hoeveel er teruggevonden werden op Ossegal Antibiotica

TABEL VI - Invloed van het drogestofgehalte van gesteriliseerde en niet gesteriliseerde spuislib-suspensies, geënt met een gekend aantal kolonievormende eenheden van *Aspergillus fumigatus*, op de recovery van deze schimmel op Ossegal Antibiotica Agar, na 3 dagen incubatie op 44 °C.

Ouderdom spuislib	Aantal kolonievormende eenheden van <i>Aspergillus fumigatus</i> per ml slibsuspensie		niet gesteriliseerde slibsuspensie	
	gestriliseerde slibsuspensie		gestriliseerde slibsuspensie	
	2% drogestof (eenheden geënt 1180) teruggevonden	0,02% drogestof (eenheden geënt 710) teruggevonden	2% drogestof (eenheden geënt 233) teruggevonden	0,02% drogestof (eenheden geënt 70) teruggevonden
1 dag	4	175	15	70
4 dagen	14	200	11	70
3 weken	26	175	163	63
2 maanden	8	325	10	70
4 maanden	10	225	5	329
5 maanden	275	175	220	70
7 maanden	225	175	200	70

bedroeg het totaal aantal aerobe kiemen meer dan 10⁹ per g drogestof. Daarvan waren drie slibsoorten reeds aan droging onderhevig. In 13 monsters was het aantal tussen 10⁸ en 10⁹, waaronder slib dat reeds van 5 tot 8 maanden aan droging werd onderworpen. Zelfs thermisch gestabiliseerd slib bevatte nog 9,5 · 10³ kiemen per g drogestof. Het drogen lijkt in elk geval het aerob kiemgetal niet sterk te beïnvloeden. Dat kan als normaal beschouwd worden indien men stelt dat andere aerobe bacteriën dan deze oorspronkelijk aanwezig zijn gaan ontwikkelen of dat een groot aantal kiemen gewoon levensvatbaar blijven.

agar. De resultaten in tabel VI duiden op een invloed van het drogestofgehalte, waarbij 2% drogestof minder gunstig was dan 0,02%. Voor gesteriliseerd slib is de terugwinning in elk geval slecht. Ook hier lijkt meer onderzoek noodzakelijk.

Resultaten en bespreking

Volgens de juist beschreven methoden werden in totaal 27 monsters onderzocht. Alle resultaten zijn te vinden in tabel VII. Enorme verschillen in drogestofgehalte komen tot uiting. Humusslib van station III bevat slechts 0,03%, actief slib van station

VIII 0,23%, retourslib gemiddeld 1,1%. Gedroogd spuislib van tussen 1 dag en 1 maand bevatte van 7,4 tot ongeveer 28% drogestof. Slib van tussen 1 maand en 8 maanden verschilde in drogestofgehalte van 14 tot rond de 85%. Twee monsters van 2 maanden oud anaeroob vergist slib verschilden van 14 tot rond de 45% in drogestof. Gezien deze grote verschillen werden alle microbiologische analyses uitgedrukt in aantal kiemen per g drogestof. Met het opgegeven drogestofgehalte is het niet moeilijk het kiemgetal te berekenen voor de slibsoort in haar oorspronkelijke toestand. In 7 monsters

Het drogen lijkt wel een betere invloed te hebben op de indicatororganismen en *Salmonella* en *Ps. aeruginosa*. *Enterobacteriaceae* vindt men tussen 10⁶ en 10⁸ in vers slib, maar na 1 maand drogen begint dit terug te vallen tot 10¹ en 10⁵ g⁻¹. Dezelfde trend is terug te vinden bij de totale coliformen, al valt het aantal tot 10² g⁻¹ na enkele maanden drogen. Faecale coliformen (*E. coli*) lagen globaal lager dan totale coliformen en na enkele maanden drogen waren de aantallen gedaald tot 10² g⁻¹. Groep D streptococci waren in vers slib steeds aanwezig. Hun aantal verminderde sterk bij het drogen,

TABEL VII - Drogestofgehalten (in %) en resultaten der verschillende microbiologische bepalingen (in aantal per gram drogestof) van de onderzochte slibmonsters afkomstig van tien verschillende zuiveringsstations.

Station	Aard en ouderdom slib (a)	Drogestofgehalte %	Aantal per gram DROGESTOF							
			Aerob kiemgetal x 10 ⁸	Enterobacteriaceae x 10 ⁶	Totale coliformen x 10 ⁵	Faecale coliformen (<i>E. coli</i>) x 10 ³	Groep-D streptococci x 10 ⁵	Clostridium perfringens x 10 ³	Salmonella sp.	Pseudomonas aeruginosa x 10 ¹
VIII	a.s.	0,23	29,6	73	150	260	170	4,1		
III	hs.	0,03	2,39	2,3	540	9300	140	1,3	136	22
VIII	rs.	1,06	17,6	44	1,1	110	18	5,3	22	11,3
VIII	rs.	0,66	13	48	2400	3000	52	2,3	26	7,7
VIII	rs.	0,86	6,2	59	1600	9200	53	10	9	-(b)
VII	rs.	1,22	6,0	18	730	1000	8,9	4,1	0	5,2
IX	rs.	1,55	2,9	57	29	220	9,2	2,6	13	5,6
X	rs.	1,26	0,9	10	1200	270	1,0	9,0	2	4,5
VI	gest.s.	1,23	5,2	0,21	3,25	8,9	0,31	1,3	0	1,6
III	g.sps.	11,32	4,8	4,5	100	340	0,075	5,1	3	3,7
VIII	4 d	14,46	7,7	1,2	0,018	0,79	-(b)	4,6	0	11
VIII	1 w	18,97	0,48	2,9	1,8	17	-	7,1	0	-
VIII	2 w	25,55	74	8,5	4,4	1	0,1	4,0	0	-
VIII	2 w	20,39	2,3	24	4,5	26	-	4,3	-(b)	-
VIII	3 w	13,98	14	58	100	43	3,3	3,5	2	-
VII	3 w	27,89	8	120	0,44	0,2	-	1,7	0	1,6
X	ther.g.	3 w	94,85	0,00095	0	0	0,0004	0,036	0	0
II	g.sps.	1 m	7,4	2,1	0,41	1,4	2,7	0,002	1,8	0
II	2 m	45,1	21	0,57	0,21	1	-	1,7	0	-
IX	2 m	14,18	0,36	0,26	0,0071	0,71	-	3,1	0	0,33
II	3 m	25,22	52	4,8	0,061	1,5	0,058	3,3	0	-
IV	4 m	24,11	1	0,12	0,10	-(b)	0,082	4,5	1	0,11
VI	5 m	32,69	0,84	0,0083	0,00071	2,4	0,051	0,086	0	0,11
III	5 m	39,52	5	0,024	0,24	0,023	0,27	1,2	0	1,5
V	7 m	85,33	0,0015	0,017	0,09	0,32	0,032	51	0	-
I	7 m	22,80	2,7	0,034	0,0026	0,1	-	3,7	-	0
I	8 m	30,80	7,9	0,13	0,001	0,1	0,054	4,3	0	0,26

(a): a.s.: actief slib
 hs.: humusslib
 rs.: retourslib
 gest.s.: gestabiliseerd slib
 g.sps.: gedroogd spuislib
 ther.g.: thermisch gedroogd spuislib

(b): - : petrischalen niet telbaar wegens storende invloed van slibbestanddelen.

waardoor voor tellingen soms het onverdund slib het meest werd onderzocht, wat frequent moeilijkheden meebracht bij het aflezen van de platen. *Salmonella* werd bijzonder gevonden in vers slib en 3 maal in slib onder droging. De aantallen waren zeer laag vergeleken met de indicator-organismen. Men kan toch stellen dat in vers slib van 0 tot rond de 20 *Salmonella*-kiemen aanwezig zijn per 100 ml.

Ps. aeruginosa kon ook praktisch overal aangetoond worden, al waren sommige schalen weer moeilijk afleesbaar door de storende invloed van slibbestanddelen. Slechts in twee gevallen werden geen kiemen gevonden. Het drogen heeft in elk geval niet een zo duidelijk uitgesproken invloed.

Opvallend is de overleving van *Cl. perfringens*. Deze anaerobe sporevormer werd teruggevonden in alle monsters, waarvan er 85 % meer dan 10^6 kiemen bevatten per g drogestof. Drogen had hier blijkbaar geen of zeer weinig invloed en zelfs het thermisch gestabiliseerd slib bevatte nog meer dan 10^4 /g clostridia. Het gebruik van slib zal dus blijkbaar zeker leiden naar een sterke aanrijking van het milieu aan *Cl. perfringens*, tenzij grondiger sterilisatie wordt toegepast. Alhoewel Dudley *et al.* [1980] slib van slechts een drietal stations onderzochten, toch is er een relatief goede analogie vast te stellen tussen hun resultaten en de onze. Het totaal aerobisch kiemgetal schommelde tussen 10^8 en 10^9 g⁻¹, het aantal coliformen van 10^6 tot 10^7 g⁻¹ en het aantal faecale coliformen zowat tien maal lager. Ze vonden ook een zeer hoog aantal *Clostridium perfringens* (10^7 g⁻¹), doch slechts sporadisch *Salmonella*. Naar de aanwezigheid van pathogene fungi werd evenwel geen onderzoek uitgevoerd.

Microbiologische methoden gebruikt in de analyse van water enz. kunnen dus ook aangewend worden in de analyse van spuislib. Voor micro-organismen die slechts in kleine hoeveelheden aanwezig zijn zoals D-streptococci, *Ps. aeruginosa*, *C. albicans* en *A. fumigatus* kunnen bij noodzakelijk gebruik van onverdunde slibsuspensies moeilijkheden optreden. Slibbestanddelen kunnen dan remmend werken op de vorming van kolonies op de platen of kunnen het aflezen verstoren.

Spuislib is een sterk besmet materiaal en ook na maanden drogen is het niet te beschouwen als een onschadelijke afvalstof. Bij gebruik in de landbouw of tuinbouw is het dus zeker dat pathogene kiemen in de bodem gebracht worden en

hun overleving daar zal van beslissende invloed zijn. De resultaten vermeld in dit onderzoek tonen aan in hoever bepaalde methoden van analyses toepasbaar zijn. Een meer uitgebreid onderzoek naar de invloed van verschillende behandelingsmethoden van slib is noodzakelijk.

Literatuur

- American Public Health Association (APHA) (1971). *Standard Methods for Examination of Water and Waste Water*. 13th edn. APHA, New York.
- Bissonnette, G. K., Jezeski, J. J., McGeters, G. A. and Stuart, D. G. (1977). *Evaluation of recovery methods to detect coliforms in water*. Appl. Envir. Microbiol. 33, 590-595.
- Bolton, R. L. and Klein, L. (1971). *Sewage Treatment, Basic Principles and Trends*. 2nd. Edn. Butterworths, London.
- Dudley, D. J., Gueutzel, M. N., Ibarra, M. J., Moore, B. E. and Sagik, B. P. (1980). *Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges*. Appl. Envir. Microbiol. 39, 118-126.
- Escritt, L. B. (1965). *Sewage and sewage disposal: calculations, design and specifications*. 3rd edn. C. R. Books Ltd., London. In: Bolton en Klein 'Sewage Treatment'. 1971. p. 120.
- Goto, S. and Enomoto, S. (1970). *Nalidixic acid-cetrimide agar; a new selective plating medium for the selective isolation of Pseudomonas aeruginosa*. Jap. J. Microbiol. 14, 65.
- Harmon, S. M., Kautter, D. A. and Peeler, J. T. (1971). *Improved medium for enumeration of Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. 22, 688-692.
- Harvey, R. W. S. and Price, T. H. (1979). *A review. Principles of Salmonella isolation*. J. Appl. Bacteriol. 46, 27-56.
- Imhoff, K., Muller, W. J. and Thistlethwayte, D. K. B. (1971). *Disposal of sewage and other waterborne wastes*. 2nd edn. London, Butterworths.
- Jeffries, L. (1959). *Novobiocin-tetrathionate broth: a medium of improved selectivity for the isolation of Salmonella form faeces*. J. Clin. Pathol. 12, 568-571.
- Kabler, P. W. (1959). *Removal of pathogenic micro-organisms by sewage treatment processes*. Sew. Ind. Wastes. 31, 1373-1392.
- Kampelmacher, E. H. en Jansen, L. M. N. *Onderzoek naar de contaminatie door bacteriën van graasland, bemest met verteerd slib*. H₂O (7), 1974, 418-422.
- Kane, B. E. and Mullins, J. T. (1973). *Thermophilic fungi in a municipal waste compost system*. Mycologia. 65, 1087-1100.
- Kenner, B. A. and Clark, H. P. (1974). *Detection and enumeration of Salmonella and Pseudomonas aeruginosa*. J. Water Pollut. Contr. Fed. 46, 2163-2171.
- Klopotek, A. (1962). *Ueber das Vorkommen und Verhalten von Schimmelpilzen bei der Kompostierung städtischer Abfallstoffe*. Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol. 28, 141-160.
- Knox, R., Pollock, M. R. and Gell, P. G. H. (1943). *The selective action of tetrathionate in bacteriological media*. J. Hyg. 43, 147-158.
- Lowbury, E. J. L. and Collins, A. G. (1955). *The use of a new cetrimide product in a selective medium for Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Pathol. 8, 47-48.
- McLaren, J. A. (1960). *The cultivation of the pathogenic fungi on a molybdenum medium*. Mycologia. 52, 148-152.
- Millner, P. D., Marsh, P. B., Snowden, R. B. and Parr, J. F. (1977). *Occurrence of Aspergillus fumigatus during composting of sewage sludge*. Appl. Envir. Microbiol. 34, 80-90.
- Mossel, D. A. A. (1977). *Microbiological quality assurance of water in relation to food hygiene*. Arch. Levensm. Hyg. 28, 1-2.
- Mossel, D. A. A., Mengerink, W. H. J. and Scholts, H. H. (1962). *Use of a modified MacConkey Agar Medium for the selective growth and enumeration of Enterobacteriaceae*. J. Bacteriol. 84, 381.
- Nickerson, W. J. (1953). *Reduction of inorganic substances by yeasts. I. Extracellular reduction of sulfite by species of Candida*. J. Infect. Dis. 93, 43-56.
- Pagano, J., Levin, J. U. and Trejo, W. (1958). *Diagnostic medium for differentiation of species of Candida*. Antibiot. Ann. 1957-1958, 137-143.
- Restaino, L., Grauman, G. S., McCall, W. A. and Hill, W. M. (1977). *Effects of varying concentrations of novobiocin incorporated into two Salmonella plating media on the recovery of four Enterobacteriaceae*. Appl. Envir. Microbiol. 33, 585-589.
- Rose, A. H. and Harrison, J. S. (1969). *The Yeasts. Vol. 1. Biology of yeasts*. Academic Press, London and New York.
- Stedham, M. A., Kelley, D. C. and Coles, E. H. (1966). *Modified Pagano Levin Medium to isolate Candida species*. Appl. Microbiol. 14, 525-528.
- Verachtert, H. en Houtmeyers, J. *Extractie en onderzoek van proteïnen uit actief slib*. H₂O (10), 1976, 193-197.
- Yaziz, M. I. and Lloyd, B. J. (1979). *The removal of Salmonellas in conventional sewage treatment processes*. J. Appl. Bacteriol. 46, 131-142.