

Onderzoekingen over het voorkomen van *Listeria monocytogenes* in effluenten

1. Inleiding

In de afgelopen jaren werden door ons in het kader van studies over epidemiologie der salmonellose een groot aantal monsters effluent en oppervlaktewater onderzocht. Hierbij is gebleken, dat haast ieder monster effluent salmonellae bevat en dat deze kiemen regelmatig in oppervlaktewater (voornamelijk water uit rivieren, meren en plassen) voorkomen [1, 2, 3, 4]. Het is aan te nemen, dat het water voornamelijk door faeces van geïnfecteerde mensen en dieren gecontamineerd wordt. Een en ander leidde



PROF. DR. E. H. KAMPELMACHER
Laboratorium voor Zoönosen en Levensmiddelenmicrobiologie, Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Bilthoven



LUCRETIA M. VAN NOORLE JANSEN
Laboratorium voor Zoönosen en Levensmiddelenmicrobiologie, Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Bilthoven

tot de veronderstelling, dat ook andere pathogene micro-organismen, die regelmatig in faeces van mens en dier worden gevonden en waarbij het zowel zieke individuen als klinisch gezonde dragers betreft, in effluenten zouden kunnen worden gevonden.

Aangezien *Listeria monocytogenes* tot deze categorie behoort, zoals o.a. uit eigen onderzoekingen [5, 6, 7] is gebleken, werd om deze veronderstelling te toetsen een aantal monsters effluenten op het voorkomen van deze kiem onderzocht. Gezien de zeer goede resultaten, die bij chloring van deze effluenten ten opzichte van Salmonella

werden verkregen [8], werden bij dit onderzoek ook monsters gechloord effluent betrokken.

2. Bemonstering

De bemonstering vond plaats gedurende de jaren 1972, 1973 en 1974. Voor de bemonstering zijn uitgezocht mechanisch-biologische rioolwaterzuiveringsinstallaties, met (Harderwijk, Elburg, Bunschoten Spakenburg) of zonder (Groenekan, Zeist) chloring, als ook uitsluitend mechanische rioolwaterzuiveringsinstallaties (Koudekerke, Vrouwenpolder, Westkapelle, Zoutelande). Bij Groenekan werden de monsters verzameld in de afvoersloot, bij de andere plaatsen vond de bemonstering plaats in de afvoerstroam van het effluent, met dien verstande dat bij de installaties te Elburg en Harderwijk de effluentstroam zowel vóór als na chloring en te Bunschoten Spakenburg alleen na chloring werd bemonsterd. In deze drie installaties wordt voor chloring chloorbleekloog gebruikt, waarvan het werkzaam chloorgehalte 150 gram per liter bij een soortelijk gewicht van 1,2 bedraagt. Het chloorbleekloogverbruik varieerde, maar gemiddeld werd in Elburg 2 gram, in Harderwijk ca. 5 gram en in Bunschoten Spakenburg ca. 2 gram chloor per m³ effluent gebruikt [8]. In Elburg vond in de onderzoeksperiode tevens een experimentele fosfaatverwijdering met ijzer- en aluminiumzouten plaats.

3. Materiaal en methoden

De monsters effluent werden verzameld in steriele 250 ml flessen. De bemonstering van het effluent na chloring werd uitgevoerd in flessen met 2 ml 0,1 n natrium-thiosulfaat, teneinde het eventueel nog aanwezige vrije chloor te reduceren.

Ter plaatse werd het rest-chloorgehalte in het effluent na chloring bepaald met de

orthotolidine-methode voor totaal werkzaam chloor [9]. Voor het onderzoek op *L.monocytogenes* werd in het laboratorium 5 maal 10 ml van een monster onderzocht, aangezien het dan mogelijk is met behulp van de MPN-methode [10] een indruk te verkrijgen betreffende de aantallen *Listeria* kiemen. Alle monsters werden op de dag van monsternamen ingezet. De submonsters van 10 ml werden overgebracht in flesjes met 60 ml tryptose-fosfaatbouillon (TPB), die bij 4 °C werden bewaard. Voor het eerst na één maand en vervolgens maandelijks (tot en met de 12e maand) werden alginaat-tampons in de flesjes gedoopt welke daarna in het Stuart-medium gedurende 1 week bij 22 °C werden bebroed. Vervolgens werden de tampons opgelost in 10 ml Ringer-Calgon vloeistof en werd de suspensie uitgestreken op een tryptaflavine-nalidixinezuur-serum-agarplaat (TNSA). Deze platen werden gedurende 48 uur bij 37 °C bebroed en vervolgens met behulp van een platenmicroscop met Henry'se belichting (doorvallend licht onder een hoek van 45°) bekeken. Blauw-groen oplichtende kolonies, die typisch zijn voor *L.monocytogenes* werden met een druppel 3 %-ige H₂O₂ getest op katalase-activiteit. Indien de kolonies katalase-positief waren, werd een soortgelijke kolonie geënt in een U-buisje met 0,25 % bouillon-agar. Het buisje werd gedurende enkele dagen bebroed bij 22 °C. Na het waarnemen van voor *L.monocytogenes* typische groei door beweeglijkheid, werd overgeënt op een bloedagar-plaat ter verkrijging reincultuur, welke biochemisch en serologisch werd onderzocht.

4. Resultaten

De resultaten van het onderzoek zijn in tabel I samengevat. Hieruit blijkt, dat uit 28 (93 %) van de 30 onderzochte monsters

TABEL I - Isolatie van *L.monocytogenes* uit effluenten van enkele rioolwaterzuiveringsinstallaties in Nederland.

Installaties	Aantal monsters positief		Aantal submonsters positief		Aantal geïsoleerde culturen	<i>L.monocytogenes</i>				
	type 1	3	4b	haemolytisch		ontypeerbaar indifferent				
niet-gechloord effluent										
Elburg	7	5	35	15	15	6	—	1	5	3
Harderwijk	7	7	35	22	23	8	—	1	2	12
Groenekan	10	10	50	31	31	7	—	11	9	4
Zeist	2	2	10	6	6	2	1	2	1	—
Koudekerke	1	1	5	1	1	—	—	—	1	—
Vrouwenpolder	1	1	5	5	5	—	—	—	—	5
Westkapelle	1	1	5	5	5	5	—	—	—	—
Zoutelande	1	1	5	3	3	—	—	—	1	2
Totaal	30	28	150	88	89	28	1	15	19	26
gechloord effluent										
Elburg	13	2 *	65	6	6	3	—	3	—	—
Harderwijk	14 **	1 ***	70	1	1	1	—	—	—	—
Bunschoten Spakenburg	7	2 *	35	2	2	—	—	2	—	—
Totaal	34	5	170	9	9	4	—	5	—	—

* = restchloorgehalte < 0,05 mg/l

** = restchloorgehalte > 0,20 mg/l

*** = restchloorgehalte 0,40 mg/l

TABEL II - Frequentie-verdeling van de aantallen *L.monocytogenes* per 100 ml effluent.

MPN/100 ml 95 % betrouwbaarheids grenzen	0 0 - 6,0	2,2 0,1 - 12,6	5,1 0,5 - 19,2	9,2 1,6 - 29,4	16,0 3,3 - 52,9	> 16,0 8,0 - ∞
niet gechloord effluent						
Elburg	2	2	—	1	—	2
Harderwijk	—	2	—	2	1	2
Groenekan	—	—	3	4	2	1
Zeist	—	1	—	—	—	1
Koudekerke	—	1	—	—	—	—
Vrouwenpolder	—	—	—	—	—	1
Westkapelle	—	—	—	—	—	1
Zoutelande	—	—	—	1	—	—
Totaal	2	6	3	8	3	8
gechloord effluent						
Elburg	11	1	—	—	—	1
Harderwijk	13	1	—	—	—	—
Bunschoten Spakenburg	5	2	—	—	—	—
Totaal	29	4	—	—	—	1

ongechloord effluent *L.monocytogenes* kon worden geïsoleerd. Van de 150 onderzochte submonsters van 10 ml waren 88 (59 %) positief. Van de 34 monsters effluent na chlooring, verdeeld over 170 submonsters, bleken 5 monsters (9 submonsters) positief te zijn. Het restchloorgehalte bleek in 1 monster meer dan 0,40 mg/l en in de andere monsters minder dan 0,05 mg/l te bedragen.

In tabel II is de MPN per 100 ml effluent genoteerd. Hieruit blijkt o.a., dat door chlooring het aantal *Listeria*-kiemen sterk terugloopt.

In tabel III zijn de aantallen monsters aangegeven, welke in de loop der maanden na bewaring in tryptose-fosfaat-bouillon bij 5 °C positief bevonden werden. Uit deze gegevens blijkt, dat bij niet gechloorde effluënten uit 1/3 deel der positieve monsters na 1, uit 1/3 deel na 2 en uit 1/3 deel na 3 - 8 maanden *Listeria* werd geïsoleerd. Bij gechloorde effluënten werd de helft der positieve monsters pas na 10 maanden bewaring in TPB gevonden.

5. Bespreking der resultaten

Evenals dit voor *Salmonella* het geval is, blijkt *L.monocytogenes* regelmatig in effluënten voor te komen. Een en ander is, gezien de hoge percentages *Listeria*-positieve faeces, die bij klinisch gezonde mensen en dieren gevonden worden, niet verwonderlijk [5, 6]. De hypothese, dat faeces de voornaamste bron van contaminatie van effluënten zou moeten zijn, wordt door de typenverdeling ondersteund. Evenals bij klinisch gezonde mensen houdt het aantal typeerbare (53 x) en ontypeerbare (45 x) stammen bij onderzoek van effluënten elkaar in evenwicht. Ook de hier gevonden type's 1 en 4b zijn bij mens en dier de meest belangrijke, die in de afgelopen 15 jaar in Nederland in vrijwel gelijke verhouding voorkomen.

Indien *Listeria*-kiemen met *Enterobacteriaceae*, welke in mechanisch-biologische en mechanische installaties steeds met een factor van ca. 2 decimalen werden gereduceerd, vergeleken kunnen worden, kan worden gesteld, dat de concentratie van

L.monocytogenes in het influent tenminste 10 kiemen per ml moet dragen om het aantal in de effluënten te kunnen verklaren.

Over het voorkomen van *L.monocytogenes* in afvalwater in andere landen is, voor zover ons bekend, tot nu toe slechts één publicatie verschenen en wel in Hongarije over isolatie uit rioolwater en oppervlaktewater [10]. Hierbij werden resp. 43,5 % en 5 % der monsters positief bevonden. Ook bij dit onderzoek werd TNSA als selectieplaat gebruikt.

Het feit, dat *L.monocytogenes* regelmatig in effluënten voorkomt, betekent dat deze kiem steeds weer in ons milieu wordt geïntroduceerd. Welke consequenties dit voor de gezondheid van mens en dier heeft is moeilijk vast te stellen. Ondanks het ubiquitair voorkomen van de kiem geeft deze slechts een enkele maal aanleiding tot ziekte en werd geen toename van listeriosegevallen in Nederland gedurende de laatste 15 jaar waargenomen. Wel is het zo, dat bepaalde omstandigheden, zoals bijv. graviditeit en zeker ook bij onderdrukking van de immuniteit, bijv. door cortisone en andere therapieën welke gebruikt worden bij o.a. maligne tumoren, de kans op het tot stand komen van een *Listeria*-infectie verhogen. Dit zou reden kunnen zijn, om de aanwezigheid van deze potentieel pathogene kiem in ons milieu zo veel mogelijk te willen beperken. Uit onderzoekingen van effluënten na chlooring, waarbij slechts uit 5 der 34 onderzochte monsters *L.monocytogenes* kon worden geïsoleerd, blijkt, dat met deze wijze van decontaminatie goede resultaten kunnen worden verkregen, indien het restchloorgehalte tenminste 0,1 mg/l bedraagt. Dit komt geheel overeen met de resultaten van chlooring van effluënten ten opzichte van *Salmonella* in de twee in tabel I genoemde installaties, zoals recentelijk is gebleken [8].

TABEL III - Aantal positieve monsters in de loop der maanden verkregen na bewaring in tryptose-fosfaat-bouillon bij 4 °C. Niet gechloord effluent.

<i>L.monocytogenes</i>	mnd 1	mnd 2	mnd 3	mnd 4	mnd 5	mnd 6	mnd 7	mnd 8	mnd 9	mnd 10	mnd 11	mnd 12	Totaal
Type 1	12	10	2	—	4	—	—	—	—	—	—	—	28
Type 3	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
Type 4b	7	4	—	—	—	—	1	3	—	—	—	—	15
Ontypeerbaar													
haemolytisch	4	11	1	—	2	1	—	—	—	—	—	—	19
indifferent	9	10	3	—	2	2	—	—	—	—	—	—	26
Totaal	32	35	6	—	9	3	1	3	—	—	—	—	89
Gechloord effluent													
Type 1	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1*	4
Type 3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Type 4b	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	5
Ontypeerbaar													
haemolytisch	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
indifferent	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Totaal	1	3	—	—	—	—	—	—	—	—	2	3	9

* restchloorgehalte 0,40 mg/L

6. Samenvatting

Bij het onderzoek van 30 monsters ongechloord effluent werd uit 28 (93 %) *L.monocytogenes* geïsoleerd. 88 (59 %) van de submonsters à 10 ml bleken positief te zijn. Een en ander wijst erop, dat *L.monocytogenes* de kans heeft zich door middel van afvalwater in ons milieu te handhaven. Welke consequenties dit voor de volksgezondheid heeft, is voornamelijk moeilijk te evalueren. Wel lijkt het gewenst deze potentieel pathogene kiem, die voor bepaalde groepen van de bevolking een verhoogd infectie-risico betekent, waar mogelijk te elimineren. Uit de 34 monsters effluent na chlooring, kon slechts 5 maal *L.monocytogenes* worden geïsoleerd. Het restchloorgehalte van 4 positieve monsters effluent was echter < 0,05 mg/l. Een adequate chlooring zal er wellicht toe kunnen bijdragen, dat *Listeria*-kiemen niet weer in het milieu terecht komen.

Literatuur

1. Edel, W., Guinée, P. A. M., Schothorst, M. van and Kampelmacher, E. H.: *The Role of Effluents in the Spread of Salmonellae*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221 (1972) 547-549.
2. Kampelmacher, E. H. and Noorle Jansen, L. M. van: *Comparative Studies on the Isolation of Salmonella from Effluents*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B. 157 (1973) 71-77.
3. Edel, W., Guinée, P. A. M., Schothorst, M. van and Kampelmacher, E. H.: *Salmonella Cycles in Foods with Special Reference to the Effects of Environmental Factors, Including Feeds*. Can. Inst. Food Sci. Technol. 7.6 (1973) 64-67.
4. Kampelmacher, E. H. and Noorle Jansen, L. M. van: *Salmonella und E.coli in Rhein und Maas beim Einströmen in den Niederlanden*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 158 (1973) 177-182.
5. Kampelmacher, E. H. and Noorle Jansen, L. M. van: *Isolation of Listeria monocytogenes from Faeces of Clinically Healthy Humans and Animals*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 211 (1969) 353-359.
6. Kampelmacher, E. H. and Noorle Jansen, L. M. van: *Further Studies on the Isolation of L.monocytogenes in Clinically Healthy Individuals*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221 (1972) 70-77.
7. Kampelmacher, E. H., Huysinga, W. Th. and Noorle Jansen, L. M. van: *The Presence of Listeria monocytogenes in Faeces of Pregnant Women and Neonates*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 222 (1972) 258-262.
8. Kampelmacher, E. H., Fonds, A. M. en Noorle Jansen, L. M. van: *Reductie van Salmonella, E.coli, coliformen en faecale streptococci door chlooring van effluenten in rioolwaterzuiveringsinstallaties te Elburg en Harderwijk, H₂O (1976) in druk.*
9. *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 13th Edition (1971) 117.
10. Oblinger, J. L. and Koburger, J. A.: *Understanding and teaching the Most Probable Number technique*. J. Milk Food Technol. 38 (1975) 540-545.
11. Duc, N. D. and Méro, F.: *Breeding Listeria monocytogenes from sewage-water and superficial water*. Egesztudomány 15 (1971) 333-336.

Het Europees milieubeleid

Dankzij de milieu-conferentie van de Raad van Europa, die 23 en 24 maart j.l. in Brussel is gehouden, zal er een duidelijke kentering komen in het Europese natuureenhoudingsbeleid. Mede als gevolg van een Nederlands initiatief zijn de ministers van de 18 bij de Raad van Europa aangesloten landen tot de aanvaarding van een aanbeveling gekomen die de nadruk legt op een ecologische benadering van het landgebruik. De conferentie heeft ook grote aandacht besteed aan het probleem van de bescherming van de trekvogels en van de gebieden die voor deze vogels van levensbelang zijn. Een speciale commissie van de Raad van Europa zal gaan werken aan een verdragstekst waarin de tijdens deze conferentie bereikte overeenstemming over bepaalde principes wordt vastgelegd. Uiterlijk in 1979 moet dat nieuwe verdrag gereed zijn. Staatssecretaris Meier van CRM, die Nederland op de conferentie in Brussel vertegenwoordigde, heeft zich uitgesproken voor het houden, binnen enkele jaren, van een "tussentijdse conferentie", om "de vaart in het werk te houden". Hoogstwaarschijnlijk zal ons land die conferentie voorbereiden. De deelnemende ministers hebben zich in Brussel op het standpunt gesteld dat juist nu, in een tijd van economische teruggang, het voeren van een preventief ecologisch beleid geboden is. De (Duitse) Secretaris-Generaal van de Raad van Europa, Kahn-Ackermann, had er al eerder op gewezen dat er een gevaar is dat nationale overheden, geïnspireerd door de economische teruggang, zich laten verleiden tot een verwaarlozing van het milieubeleid. Zo is het bijv. niet denkbeeldig, aldus Kahn-Ackermann, dat in een tijd dat gestreefd wordt naar het opvoeren van de werkgelegenheid, regeringen aarzelen met het toepassen van het principe "de vervuiler betaalt".

Kahn-Ackermann noemde als een concreet probleem de bouw van kerncentrales. De gevolgen van dit soort installaties voor het milieu zijn wetenschappelijk nog niet te overzien, zo zei hij. Overigens is op de twedaagse conferentie de milieubescherming veel meer aan de orde geweest dan het tegengaan van milieuvervuiling.

De discussie over de bescherming van de flora en de fauna heeft geleid tot de conclusie dat het beleid van de bij de Raad van Europa aangesloten landen zoveel mogelijk op één lijn gebracht moeten worden. Het in de maak zijnde internationale verdrag voor bescherming van trekvogels is daar een voorbeeld van. Bij de trekvogelbescherming zal grote aandacht worden besteed aan de leefplaatsen van deze dieren en er zal naar gestreefd worden het aantal reservaten uit te breiden. Voorts is een