

Virussen en drinkwater

1. Inleiding

Met het toenemend gebruik van oppervlaktewater en in de toekomst mogelijk hergebruik van afvalwater voor de bereiding van drinkwater is de problematiek rond de aanwezigheid van pathogene micro-organismen in water meer en meer in de belangstelling komen te staan.

Bij het klassieke bacteriologisch onderzoek berust de waarschijnlijkheid van afwezigheid van pathogene kiemen op de limitering van de aanwezigheid van niet pathogene darmbacteriën en de grotere resistentie van deze organismen ten opzichte van de pathogene darmbacteriën.

Met de resistentie van pathogene micro-organismen zoals virussen kan het echter anders zijn gesteld omdat ze qua bouw geheel verschillen van bacteriën.

Virussen bestaan uit een nucleïne zuur (DNA of RNA) omhuld door een eiwitmantel, die als bescherming dienst doet. Ze vermenigvuldigen zich niet zoals bacteriën door deling, maar gebruiken een deel van het biochemisch systeem van een cel, dat de cel zelf nodig heeft om goed te functioneren, zodat de cel uiteindelijk aan het virus te gronde kan gaan. De virussen die vooral van belang zijn bij de bereiding van drinkwater zijn de darm of entero-virussen, die in het algemeen kortstondige bewoners van het spijsverteringskanaal zijn (tabel I) [1, 2] en in diameter grootte variëren van 15-75 μ , d.w.z. de kleine entero-virussen zijn zo'n 30.000 keer kleiner dan de bekende E-coli bacterie.

TABEL I - Belangrijkste „entero” virussen die in het oppervlaktewater kunnen worden aangetroffen [1, 3, 4, 5].

Soort virus	aantal typen
1. Poliovirus	3
2. Coxsackie: groep A	24
groep B	6
3. Echovirus	33
4. Adenovirus	28
5. Infectieuze Hepatitis	1
Niet geklassificeerd virus	

Uit experimenten is gebleken, dat criteria die gelden voor bacteriële organismen betreffende overlevingskansen na een desinfectiebehandeling, voor de entero-virussen niet hoeven op te gaan, m.a.w. een negatieve coliform test hoeft niet in te houden dat er ook geen virussen aanwezig zijn.

Als voorbeeld, gelukkig uniek in de wereld kan India worden aangehaald waar een belangrijke virus-epidemie uitbrak door contaminatie van het drinkwater waarbij zo'n 30.000 gevallen werden geregistreerd.

Sedert de jaren 1930-1940, toen het Kling, Levaditi, Paul en Trask [6, 7] lukte om poliovirus tijdens een epidemie in Charleston, USA, in afvalwater aan te tonen, zijn pogingen gedaan om een aantal epidemieën te verklaren door het water te zien als verspreidingsmiddel van viruskiemen.

Er werd in die jaren intensief onderzoek verricht om na te gaan of deze hypothese juist was, echter met weinig resultaat, zodat het enthousiasme eind 1940 danig bekoelde.

De ontdekking van Coxsackie virus [8] eind 1940 en de daarop volgende ontdekking van het Echo- en Adenovirus, hernieuwde de belangstelling voor de virussen die in het afvalwater kunnen voorkomen en de mogelijke rol, die het water speelt bij de verspreiding van deze virussen.

Uit tal van onderzoeken die in die jaren zijn uitgevoerd en samengevat door Mosley [9], waarbij het drinkwater als verspreidingsmiddel van polio-virus werd gezien, kon het drinkwater echter nooit met zekerheid als verspreidingsmiddel worden aangetoond.

Anders is het gesteld met „water borne” epidemieën van infectieuze hepatitis (geelzucht), dat zich nog steeds aan de kweek weet te onttrekken maar de karakteristieke eigenschappen vertoont van een virus. Mosley toonde aan dat er ten minste 50 „water borne” epidemieën van infectieuze hepatitis hebben plaats gehad.

Infectieuze hepatitis is in de USA waarschijnlijk de meest frequente ziekte die door het water wordt verspreid. In de meest voorkomende gevallen is het daar te wijten aan contaminatie van kleine privé watervoorraden.

In ons land is door Wilting en Weiland in 1964 - 1965 een onderzoek verricht naar de aanwezigheid van entero-virussen bij o.a. een aantal rioolwaterzuiveringsinstallaties [5]. Zij vonden dat van de 790 monsters die zij verzamelden 7 % hiervan positief waren met Polio I, II en III, waarbij eveneens Adenovirus (1 %) en veel Reovirus (45 %) werd aangetoond.

Volgens de laatste gegevens kunnen zo'n 100 typen virussen, die afkomstig zijn van excretie produkten van geïnfilteerde individuen, in het oppervlaktewater voorkomen [1, 3]. Zij kunnen gedurende het hele jaar in het stedelijk afvalwater worden aangetoond [4], waaruit blijkt dat zij voor een deel de afvalwaterzuiveringsinstallatie passeren. Vooral aan het eind van de zomer en in het begin van de herfst blijkt dat de virussen in verhoogde hoeveelheden in het afval-

water worden aangetroffen [4, 5, 9, 10, 11, 12].

Deze resultaten en de gegevens van Wilting en Weiland beklemtonen nog eens de noodzaak om in Nederland regelmatig onderzoek te verrichten naar de aanwezigheid van virussen in water, waarbij naast het isoleren en kwantificeren van virussen vooral de aspecten van de overlevingskansen van enterovirussen in oppervlaktewater, het belang van drinkwater als verspreidingsmiddel van virussen en het gedrag van de virussen bij de zuivering van oppervlaktewater tot drinkwater de aandacht vragen.

2. Isoleren en kwantificeren van (entero)virussen

Voor de isolering van enterovirussen worden vnl. primaire apenier cellen gebruikt, d.w.z. cellen die rechtstreeks bereid zijn uit een apenier. Er worden echter ook continue cellijnen gebruikt, d.w.z. cellijnen die men continue kan doorkweken.

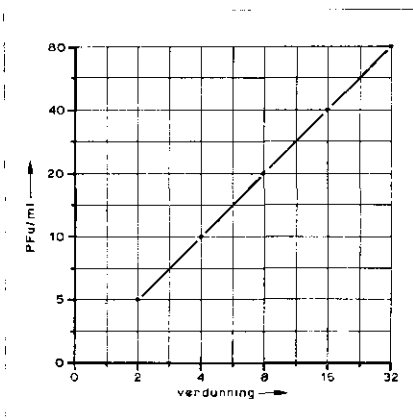
Cellen kunnen zich hechten aan een glasoppervlakte en zo kan er een monolaag gevormd worden op een glaswand. Na toevoeging van een virushoeveelheid op zo'n monolaag worden de cellen geïnfecteerd door het virus.

Het virus vermenigvuldigt zich in de cel waarbij tenslotte de cel lyseert en de virus partikeltjes (virions) naar buiten komen om vervolgens de omliggende cellen te infekteren. Het „dood” gaan van de cellen is bekend als het zgn. Cyto Pathogeen Effect (CPE). Verschillende virussen geven een CPE dat morfologisch verschilt.

De verspreiding van de virions kan gereduceerd worden door een laag agar over de geïnfecteerde monolaag te gieten. Het resultaat is, dat het CPE zich

Afb. 1 - Plaques veroorzaakt door Echo 7 en Polio I virus op Verocellen.





Afb. 2 - Lineair verband tussen verduunning en PFU/vol. [15].

tot een klein oppervlak beperkt, dat er meestal uitziet als een gaatje dat zichtbaar kan worden gemaakt door aan het geheel „neutraal rood” toe te voegen. De ronde gaatjes worden plaques genoemd (afb. 1).

Eén plaque komt meestal voort uit één geïnfecteerde cel, die veroorzaakt is door minimaal één infectieuze eenheid. Ook hier kunnen de diverse virussen verschillen geven in vorm en grootte van de plaques.

De virusconcentratie wordt bij de plaque methode opgegeven in plaque forming units per volume-eenheid monster (PFU/vol).

De uiteindelijke identifikatie van het virus kan verkregen worden met specifieke antisera, waarbij het virus door het antiserum wordt genutraliseerd.

Er wordt in hoofdzaak van twee methoden gebruik gemaakt voor kwantificering van virussen:

a. de tube methode waarbij de titer van het virus wordt bepaald.

Verskillende verduunningen van de virussuspensie worden onderzocht. Kwantitatieve hoeveelheden van elke virusverduunning (meestal in logaritmische stappen) worden geïnoculeerd op 4 tot 6 weefselkweekbuizen bij 37 °C en deze buizen worden bekeken op CPE *). Deze uitdrukking kan variëren afhankelijk van de gastheer waarop het virus wordt toegepast.

b. de reeds genoemde plaque methode.

Verskillende virusverduunningen worden geïnoculeerd op een monolaag van cellen, waarbij de cellen 1 à 2 uur later worden bedekt met een laag agar. Als de plaques verschijnen worden ze voor elke verduunning geteld, waarbij dan een lineair verband bestaat tussen het aantal PFU/vol en verduunning (afb. 2) [15].

Met de twee bovengenoemde methoden kan slechts een kleine hoeveelheid mon-

*) De titer van het virus wordt uitgedrukt als 50 percent tissue culture infective dose (TCID₅₀), d.i. die virusverduunning die in 50 % van de geïnoculeerde weefselkweekbuizen een CPE geeft).

ster kwantitatief op virussen worden onderzocht. De viruseenheden, die in een paar liter water voorkomen zullen dan ook eerst geconcentreerd moeten worden waarbij het volume van enkele liters tot een aantal milliliters moet worden teruggebracht.

3. Het concentreren van virussen uit water

Eén van de eerste concentratie methoden die werden gebruikt om virussen aan te tonen in water is de zgn. „gauze pad”-methode. Het is een in-situ-techniek en een modifikatie van de „Moore Swab”, die in de bacteriologie wordt toegepast. Het is een kwalitatieve methode waarbij voor een periode van 24 uur of langer een vulsel met gaas, katoen of synthetische stof in het te onderzoeken water wordt gedompeld. Na het absorberen wordt de swab geëluëerd en het eluaat onderzocht op virus.

Indien deze simpele concentratie methode wordt vergeleken met het nemen van een water monster, het zgn. grab of dip sample, dan blijkt dat de swab methode meer positieve resultaten geeft dan de dip methode [2] (tabel II).

TABEL II - Vergelijking van gauze pad en dip sample methode bij het isoleren van virussen uit afvalwater [2].

referentie		gauze pad		dip sample	
		geteste aantal	% pos.	geteste aantal	% pos.
Melnick e.a.	1954	324	60,4	231	28,6
Mack e.a.	1958	602	10,9	651	4,0
Bloom e.a.	1959	462	13,2	368	4,6
Mack e.a.	1962	268	16,4	293	0,3
Lund en Hedstrom	1969	84	88,1	84	38,1

De gauze pad methode zal dan ook eerst worden toegepast om een indruk te krijgen of er virus aanwezig is in het water. Daarna wordt de dip methode gebruikt om meer kwantitatief te kunnen werken, waarbij monsters van 1 tot 10 liter worden genomen, welke hoeveelheid vervolgens wordt geconcentreerd.

De laatste jaren zijn een aantal relatief goedkope methoden ontwikkeld om virus enigszins kwantitatief uit water te concentreren [8, 9], te weten:

1. membraan filters
2. oplosbare alginaat filters
3. polymeer twee fasen systeem
4. water onoplosbare poly-electrolyten
5. coagulatie middelen.

3.1. Membraanfilters

Het mechanisme van de membraan adsorptietechniek is afhankelijk van de oppervlakte eigenschappen van het virion. Onder speciale condities kan het virus efficiënt geadsorbeerd worden aan een membraanfilter dat een porie diameter heeft van 10 - 20 x zo groot als het virus partikkeltje [16]. Na het absorberen van het virus aan het membraan,

wordt het virus van het membraan verwijderd door elutie m.b.v. 3 - 5 ml vloeistof met een hoge pH [8 à 9].

Er zijn tal van modifikaties op deze membraan adsorptie methode toegepast [17, 18, 19]. Indien het water sterk verontreinigd is, zal in het algemeen een voorfiltratie moeten plaatsvinden, omdat anders het filter dicht slijt.

Een nadeel van een voorfiltratie is dat er in het algemeen een virusverlies zal optreden zodat maatregelen genomen moeten worden om dit te voorkomen. Cliver [20] die met Coxsackie A9 in leidingwater experimenten uitvoerde, vond dat hij 50 % kans had om 2 PFU/l aan te tonen met een membraanfilter.

Rao en Labzoffsky [21] gebruikten het voorfilterapparaat en membraanfilter als één unit, om het verlies van virusopbrengst bij voorfiltratie te voorkomen. Zij elueerden daarbij tezamen het voorfilter en membraanfilter waarbij een hogere recovery werd verkregen.

Wallis e.a. [18, 22, 23] hebben eveneens veel met membraanfilters gewerkt. Zij manipuleren met het medium door toevoeging van bivalente en trivalente ionen waardoor een verhoogde adsorptie aan

het membraan plaats vindt en door een verandering van de zuurgraad. Zij vonden dat organische en eiwitachtige stoffen interfereerden met de adsorptie van het virus aan het membraan. Zij trachten deze stoffen te verwijderen voordat adsorptie plaatsvindt [23]. Om deze interferentie tegen te gaan heeft het Cpheri in Nagpur (India) [19] een modifikatie op de methode van Wallis toegepast, die zeer goede resultaten oplevert. Een probleem blijft echter de verwerking van grotere hoeveelheden verontreinigd water waar organische, eiwitachtige, zwevende en vaste stoffen in voorkomen.

In één van de laatste publikaties geven Wallis e.a. [18] een mogelijke oplossing door tragsgewijs grote hoeveelheden water m.b.v. membraanfilters te concentreren.

3.2. Oplosbare alginaatfilters

Het te testen water wordt door een alginaatfilter gezogen, waarbij het virus het filter niet passeert. Vervolgens wordt het filter opgelost in een 3,8 % natriumcitraatoplossing en dit geheel wordt geïnoculeerd op weefselkweek.

De virus terugwinning bij deze methode

TABEL III - Terugwinning van virus uit water m.b.v. membraanfilters [1, 19, 25].

referentie		watertype	volume van water	% terugwinning van virus
Wallis e.a.	1967	afvalwater	5,7 l	100
Rao e.a.	1960	oppervlaktewater	0,5 l	53—100
Cliver	1970	leidingwater	1 l	26—90
Moore e.a.	1970	afvalwater	3,8 l	81—100
Cpheri - Nagpur - India	1970	afvalwater	—	90—100
Schäfer	1971	rivierwater	3,8 l	16—32

TABEL IV - Terugwinning van virus uit water m.b.v. oplosbare alginaatfilters [1, 24, 25, 27].

referentie		watertype	getest watervolume	% terugwinning van virus
Gärtner	1967	drinkwater	10 l	25—100
Gärtner	1970	oppervlaktewater	1 l	100
Nupen	1970	afvalwater	1 l	40
Poynter	1970	rivierwater	2 l	60—70
Kool	1972	leidingwater	1 l	70—90
Schäfer	1971	rivierwater	1 l	25—96

TABEL V - Terugwinning van virus uit water m.b.v. polymeer twee fasen systeem [1, 27, 29, 30, 31, 32].

referentie		watertype	getest watervolume	% terugwinning van virus
Shuval	1969	riool effluent	1 l	35—100
Lund	1970	riool effluent	0,2 l	100
Nupen	1970	afvalwater	1 l	40
Liu e.a.		leidingwater	2 l	57—100
Kool	1971	leidingwater	1 l	20—60
Schäfer	1971	rivierwater	0,2 l	46—75

TABEL VI - Terugwinning van virus uit water m.b.v. PE 60 [1, 27, 33, 34].

referentie		watertype	getest watervolume	% terugwinning van virus
Wallis	1969	riool effluent	3,8 l	93
England	1970	riool effluent	2 l	90—100
Jakubowski	1970	leidingwater	10 l	58—74
Kalter	1970	leidingwater	1 l	60
Berg	1971	gedest. water	1 l	14—53
Kool	1972	leidingwater	1 l	100

TABEL VII - Terugwinning van enterovirus uit water d.m.v. adsorptie aan precipiteerbare zouten en ijzeroxide [1, 36].

referentie		adsorbent	type water	getest volume	% terugwinning van virus
Wallis e.a.	1966	Al(OH) ₃	riool effluent	1 l	80
England	1970	Al(OH) ₃	riool effluent	0,4 l	80—100
Rao e.a.	1970	ijzeroxide	leidingwater	0,5; 150 l	87—90; 100
Jakubowski e.a.	1970	ijzeroxide	leidingwater	10 l	40—64
Metcalf	1970	ijzeroxide	leidingwater	1—10 l	80—97
Schäfer e.a.	1970	FeCl ₃	oppervlaktewater	5 l	45—100
England	1970	protamine sulfaat	riool effluent	1 l	80—100

varieert van 25-100 % [24, 25] (tabel IV). Sterk verontreinigd water moet echter een voorfiltratie ondergaan. Poynter [11, 26] gebruikt al een aantal jaren met goed resultaat de oplosbare alginaatfilters voor het aantonen van virussen in oppervlaktewateren te Engeland.

3.3. Polymeer twee fasen systeem

Deze methode die door Albertsson e.a. [28] ontwikkeld werd, berust hierop dat

een watermonster gemengd wordt met een combinatie van organische polymeren (Na-Dextraan en Poly-Ethyleenglycol), dat na een aantal uren een twee fasen systeem oplevert (tabel V).

In de kleinste fase (Dextraan) blijkt vnl. het virus te zitten dat gemakkelijk kan worden afgescheiden. Deze methode is eveneens in gebruik om een aantal virussen te zuiveren [29]. Concentratiefactoren van 100 tot 1000 kunnen worden verkregen met dien verstande dat de

terugwinning van het virus afhankelijk is van het virus waarmee wordt gewerkt [30, 31, 32]. Een voordeel van deze methode is, dat verontreinigd water geen voorfiltratie behoeft.

3.4. Water onoplosbare poly-electrolyten

Door Johnson en Fields [33] werd eind 1960 een niet in water oplosbaar poly-electrolyt beschreven dat virus adsorbeerde. Fields, Wallis e.a. [10, 34, 35] introduceerde eveneens een niet oplosbaar poly-electrolyt, het zgn. PE 60, dat in staat is met grote effectiviteit virus te adsorberen. Bij elutie met een vloeistof met een pH 8 à 9 vonden zij een terugwinning van 80 à 90 % (tabel VI).

3.5. Coagulatiemiddelen

Het mechanisme van deze techniek, waarbij ijzer- of aluminiumzouten worden gebruikt, is gelijk aan die van de membraan adsorptie techniek. Concentrering van virus vindt plaats doordat het virus selectief adsorbeert aan het adsorbent waarbij dit adsorbent vervolgens met een geringe hoeveelheid vloeistof met hoge pH wordt geëlueerd (tabel VII).

3.6. Samenvatting

Als de verschillende concentratiemethoden met elkaar worden vergeleken, blijkt dat zij zowel goede als minder goede resultaten kunnen opleveren.

De toepassingen van membraanfilters, PE 60 en precipitatie technieken lijken het meest veelbelovend omdat zeer grote hoeveelheden water (300 - 400 liter) onderzocht kunnen worden, dit in tegenstelling tot de alginaatfiltermethode en het polymeer 2 fasen systeem.

Voor het bepalen van een juiste keuze, zal echter nog nader vergelijkend onderzoek moeten worden verricht.

4. Voorkomen en overlevingskansen van virussen in water

Een aantal onderzoekers hebben de hoeveelheid virus getracht te bepalen, die door geïnfecteerde individuen wordt uitgescheiden en daarbij in het water terecht komt.

Clarke en Kalber [37] berekenden uit hun gegevens een theoretisch gemiddelde van 500 infectueuse eenheden enterovirus per 100 ml rioolwater.

Shuval [1] komt in zijn omgeving tot een gemiddelde van ongeveer 100 infectueuse eenheden per 100 ml rioolwater. De virushoeveelheid, die vervolgens in het oppervlaktewater kan voorkomen varieert dan van 0,5 - 10 infectueuse eenheden per liter [3, 26].

Het is nu aan te nemen, dat deze concentratie van het virus nog verder wordt gereduceerd d.m.v. natuurlijke omstandigheden.

Factoren [38, 39] die de overlevingskansen kunnen beïnvloeden zijn:

1. verblijftijd in het water;
2. kwaliteit van het water;

TABEL VIII - Gemiddeld aantal dagen nodig voor 99,9% reductie van de enterovirus concentratie in verschillende waterige milieus bij 4 °C [1].

mate van verontreiniging	Poliovirus	Echovirus 7	Echovirus 12	Coxsackie A9 virus
weinig (rivierwater)	27 dagen	26 dagen	33 dagen	10 dagen
gematigd (rivierwater)	19 dagen	15 dagen	19 dagen	20 dagen
veel (afvalwater)	100 dagen	130 dagen	60 dagen	12 dagen

TABEL IX - Aantal dagen nodig voor 99,9% reductie van virus concentratie bij verschillende temperaturen [1].

referentie	waartype	virus	temperatuur		
			4-6 °C	15-16 °C	20-25 °C
Clark 1964	rivierwater	Echo 12	19 dagen		5 dagen
Clark	rivierwater	Eche 7	15 dagen		7 dagen
Clark	rivierwater	Coxsackie A9	10 dagen		< 8 dagen
Clark	rivierwater	Polio 1	19 dagen		13 dagen
Clark	rivierwater	Echo 12	33 dagen		13 dagen
Coglia & Lodds 1962	rivierwater	Polio 1	60 dagen	45 dagen	15 dagen
Poynter 1968	rivierwater	Polio 3	50 dagen	18 dagen	—
Taylor 1967	rivierwater	Polio 3	67 dagen		
Clarke 1970	leidingwater	Echo 7	85 dagen		10 dagen
Clarke 1970	leidingwater	Coxsackie A9	98 dagen		15 dagen
Clarke 1970	leidingwater	Polio 1	140 dagen		95 dagen
Poynter 1968	leidingwater	Polio 3	168 dagen		—
Taylor 1967	leidingwater	Polio 3	167 dagen		

3. snelheid van de stroming;
4. temperatuur van het water.

Het blijkt dat virussen in het algemeen een langere levensduur hebben in sterk verontreinigd water dan in gematigd verontreinigd water (tabel VIII).

Er wordt aangenomen, dat in sterk verontreinigd water waarin veel organische en eiwitachtige stoffen voorkomen, het virusdeeltje beschermd wordt, waardoor weinig of geen oxidatie van het virus plaats vindt.

Dit verklaart echter nog niet de korte overlevingstijd in matig verontreinigd water.

Diverse onderzoekers hebben de overlevingstijd bij verschillende temperaturen van een aantal virussen onderzocht (tabel IX).

Uit deze resultaten blijkt duidelijk, dat verlaging van temperatuur een toename geeft in de overlevingstijd van het enterovirus.

Voor een nauwkeurige evaluatie van de gezondheidsrisico's die verbonden zijn aan de introductie van enterovirussen in het oppervlaktewater dient nog veel onderzoek te worden verricht naar de invloed van de diverse factoren op de overlevingskansen van virussen in het water.

5. Gedrag van virussen bij de drinkwaterbereiding

Tijdens de bereiding van oppervlaktewater tot drinkwater, wordt het oppervlaktewater een aantal keren behandeld. Bij diverse bereidingsstappen is het gedrag van virussen experimenteel nagegaan.

5.1. Chloring

Een chloorbehandeling is het meest ge-

bruikte desinfectieproces, dat wordt toegepast bij de bereiding van drinkwater. Laboratoriumstudies [1, 40, 41, 42, 43, 45, 46] hebben aangetoond, dat een aantal enterovirussen resistentier is tegen chlooring, dan organismen van de coliforme groep.

Ook is duidelijk geworden, dat het effect van een chloorbehandeling sterk afhankelijk is van de aard van het virus en van andere oxideerbare substanties die in het water aanwezig zijn [tabel X]. De zuurgraad waarbij de behandeling wordt uitgevoerd is eveneens van belang. Scarpino e.a. [44] toonden aan dat de resistentie van E-coli en Poliovirus bij een chloorbehandeling varieert afhankelijk van de pH. Daarom is het gebruik van de coli bacterie die als indikator-organisme van faecale vervuiling wordt aangehouden niet geheel representatief voor de waterkwaliteit uit virologisch oogpunt.

5.2. Ozon

Het leidt geen twijfel dat ozon bijzonder geschikt is voor het desinfecteren van water. Vanuit het oogpunt van volksgezondheid heeft deze methode enige voordelen. Vanwege zijn hoge redox-potentiaal heeft het ozon een sterkere desinfecterende werking dan andere chemische stoffen als chloor en chloordioxide en is daarom in staat vele organische verbindingen in het water te oxi-

deren die kleur, smaak en reukproblemen opleveren. Daarbij komt nog het voordeel dat een grote hoeveelheid ozon het water niet ongeschikt voor consumptie maakt, terwijl dit wel het geval kan zijn bij toevoeging van een overmaat aan chloor.

Afhankelijk van het soort micro-organismen doden ozonconcentraties van 0,8 - 7,5 ppm 99,9% van de micro-organismen binnen 60 sec in water met een pH = 7,2 [47].

Bij een restgehalte van 0,4 g/m³ en een inwerkingstijd van ten minste 4 minuten blijkt dat de inaktivering van enterovirussen groter is dan 99,99% voor zowel gedestilleerd water als gefiltreerd rivierwater (afb. 3) [48, 49].

Uit afb. 4 blijkt, dat het van belang is, of er nog veel andere oxideerbare stoffen in het water aanwezig zijn. De resultaten van dit experiment [43] tonen aan, dat tijdens de eerste 5 minuten geen inaktivering van het virus optrad, daar het ozon werd gebruikt om eerst de organische stoffen te oxideren.

Uit een en ander blijkt hoe belangrijk het is uit oogpunt van desinfectie om ozondosering als een van de laatste stappen bij de drinkwaterbereiding toe te passen.

5.3. Verandering van zuurgraad

Inaktivering van virussen kan eveneens geschieden door in een sterk alkalisch milieu te werken. Bij gebruik van Ca(OH)₂, NaOH en KOH in gedestilleerd water met een pH van 12 kon 90% van het Poliovirus I geïnactiveerd worden [1]. Het mechanisme van de inaktivering berust waarschijnlijk op de denaturatie van de eiwitmantel van het virusdeeltje en het daarop uiteenvallen van het deeltje.

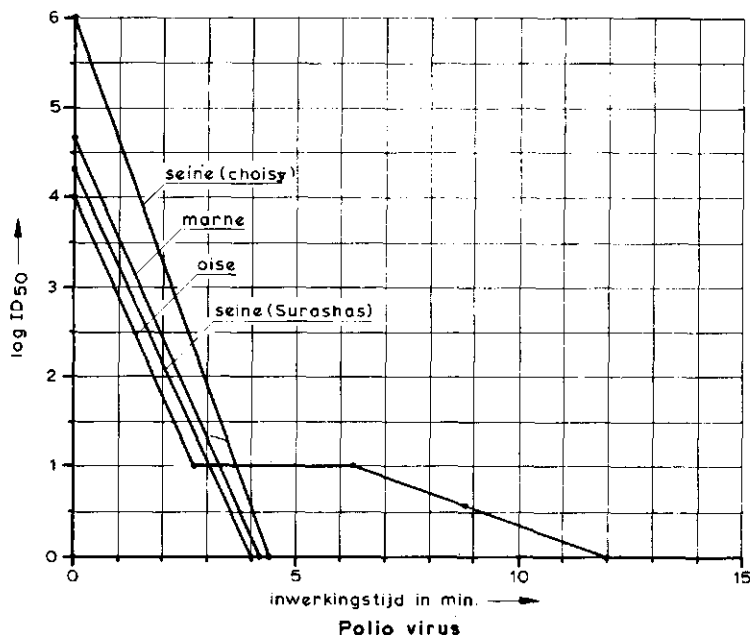
5.4. Precipitatie

Er vindt een verwijdering van virussen plaats bij coagulatie met behulp van metaal-coagulanten en synthetische polyelectrolyten (uitsluitend kationische polyelectrolyten) [50] (tabel XI).

Wallis en Melnick [36] gebruikten (Al)₃PO₄ en Al(OH)₃ om virussen te verwijderen, waarbij alleen de zuurgeoelge virussen (zoals Vaccinia, Herpes, Myco, Arbo en Rhinovirus) werden geadsorbeerd aan (Al)₃PO₄. Adenovirus en de niet zuurgeoelge enterovirussen konden verwijderd worden met behulp van Al(OH)₃. Chaudhuri e.a. [47] toonden aan, dat neergeslagen virus voor een deel niet geïnactiveerd was, zodat het

TABEL X - Invloed van chloorbehandeling op overlevingstijd van bacteriën en virussen in water [40, 43, 46].

organisme	kontakttijd	pH	gecombineerd restchloorgehalte in ppm	% reductie van micro-organisme
E-coli	20 minuten	8,3	0,4—0,6	95
Poliovirus	30 minuten	8,3	0,4—0,6	70
E-coli	20 minuten	8,3	0,5—0,8	99—100
Poliovirus	30 minuten	8,3	0,5—0,8	99—100



Afb. 3 - Inaktivering van enterovirus in rivierwater als functie van inwerkingstijd van ozon [48, 49].

TABEL XI - Verwijdering van virus door coagulatie m.b.v. aluminiumsulfaat en kathionische polyelectrolyten [12].

Coagulaat Al ₂ (SO ₄) ₃ mg/l	Polyelectrolyt mg/l	virus	% virus verwijdering
10	0	poliovirus 2	86
10	1 (purifloc C 32)	poliovirus 2	81
25,7	0	Faag T4	98
		Faag MS ₂	99,8
25,7	1 (prima flocc C7)	Faag T4	99,9
		Faag MS ₂	99,5

precipitaat waarin zich het virus bevindt met zorg behandeld moet worden. Door een zeer hoge pH (11 à 12) te combineren met een overmaat aan kalksoda, waardoor het water onthard wordt, kon 99,99 % van het aanwezige virus worden verwijderd [51].

Bij aanwezigheid van organisch materiaal in het water wordt de effectiviteit van virusverwijdering echter verlaagd. Het gebruik van flocculatiemiddelen en polyelectrolyten voor de verwijdering van virussen geeft op laboratoriumschaal goede resultaten. Of ze in de praktijk eveneens toegepast kunnen worden moet nog worden nagegaan, omdat de mate van virusverwijdering varieert met het betreffende flocculatiemiddel en virus.

6. Samenvatting en conclusies

Uit het voorgaande is duidelijk geworden dat in Nederland, evenals in andere landen virussen in het afvalwater aanwezig zijn en daardoor ook in het oppervlaktewater zullen voorkomen. Er is echter in Nederland nauwelijks kennis beschikbaar omtrent de graad van verontreiniging in oppervlaktewater en drinkwater met virussen.

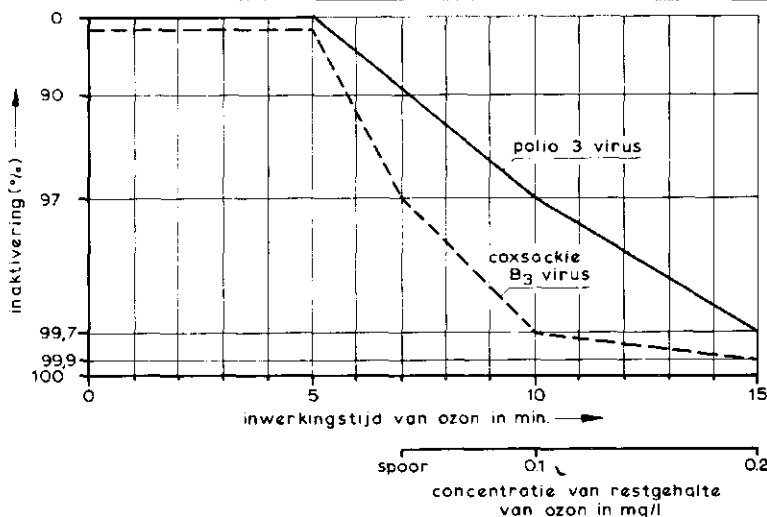
Het ontstaan van een epidemie in ons land door contaminatie van drinkwater met een enterovirus lijkt niet waarschijnlijk mits het oppervlaktewater goed wordt voorbehandeld, waarbij dan o.a. gedacht kan worden aan een minimale verblijftijd van 28 dagen in een reservoir, precipitatie-technieken, langzame zandfiltratie [52] en een ozonbehandeling als één van de laatste stappen in het drinkwaterbereidingsproces.

Door het toenemend gebruik van oppervlaktewater als grondstof voor de drinkwaterbereiding is het noodzakelijk om kennis over het voorkomen van virussen in oppervlaktewater te verkrijgen. Dit houdt in, dat onderzoek verricht moet worden betreffende de overlevingskansen van virussen in oppervlaktewater en de effectiviteit van de zuiveringsstappen die uit oppervlaktewater, drinkwater bereiden.

Steeds dient bedacht te worden, dat slechts enkele infectieuze viruseenheden volgens Plotkin en Katz [53] in staat zijn personen te infekteren, zodat zeer betrouwbare isolatiemethoden nodig zijn. Er zullen hiertoe methoden ontwikkeld moeten worden die in staat zijn virussen in grote volumina water aan te tonen, waarbij van kwantitatieve concentratiemethoden gebruik moet worden gemaakt. Onder de besproken concentratiemethoden lijken membraanfilters, het PE60 en de precipitatiemethoden het meest belovend. Door het RID worden momenteel vergelijkende onderzoeken verricht om één of meerdere isolatiemethoden te vinden die aan de gestelde eisen voldoen.

Met behulp hiervan zal een betere controle betreffende de effectiviteit van de zuivering van oppervlaktewater tot drinkwater tot stand kunnen komen, hetgeen een noodzakelijke voorwaarde vormt om de virologische betrouwbaarheid van het drinkwater in Nederland te kunnen garanderen.

Afb. 4 - Inaktivering van polivirus als functie van inwerkingstijd van ozon [43].



Literatur

1. Thirteenth Water Quality Conference 1971. Viruses and water quality occurrence and control. Department of Civil Engineering, University of Illinois at Urbana Champaign and the Illinois Environment Protection Agency.
2. Fenner, F. and White, P. O. *Medical Virology*. Academic Press 1970, New York and London.
3. Suval, H. I. and Katzenelson, E. *The detection of enteric viruses in the water environment in: Water pollution microbiology* (1972). R. Mitchel, Wiley Interscience, John Wiley & Sons Inc. New York.
4. Lund, E., Hedström, C. E. and Jantzen, N. *Occurrence of enteric viruses in waste water after activated sludge treatment*. Journal Water Pollution Control 1969 art 1-169.
5. Wilterding, J. B., Weiland, H. T. *Enteroviruses in children's homes and sewage*. 1966. European Symposium of poliomyelitis and allied diseases.
6. Pittler, H., Höpken, W. und Knocke, K. W. *Enteroviren und Adenoviren im abwasser Methode des Nachweises und epidemiologische Studie*. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene I org. 1967 204, p. 38.
7. Enders, J. F., Weller, T. H. and Robbin, F. C. Science 1949, 109, p. 85.
8. Daldorf, G. and Sickles, G. M. *An unidentified, filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis*. Science 1948, 108, p. 61.
9. Mosley, J. W. *Transmission of viral diseases by drinking water: in Transmission of Viruses by the Water Route: 1967*. G. Berg Interscience Publishers, New York/London/Sewney.
10. Grinstein, S., Melnick, J. L. and Wallis, C. *Virus isolations from sewages and from a stream receiving effluents of sewage treatment plants*. Bull. Wld. Wlth. Org. 1970: 42, p. 192.
11. Metropolitan Water Board, forty-fourth report on the results of the bacteriological chemical and biological examination of the London waters for the years 1969-1970.
12. Lund, E., Hedström, C. E. *A study on sampling and isolation methods for the detection of viruses in sewage*. Water Research 1969, 3, p. 823.
13. Grist, N. R., Ros, C. A. C., Bell, E. J. und Stolt, E. J. *Diagnostische Methoden in der klinischen Virologie*. George Thieme Verlag, Stuttgart, 1969.
14. Reed, C. J. and Muench, H. *A simple method of estimating fifty percent end points*. Am. J. Hyg., 1938, 27 : 3, p. 493.
15. Luria, S. E., Darnell Jr., J. E. *General Virology* 1968 John Wiley and Sons Inc. New York/London/Sidney.
16. Cliver, D. O. *Factors in the membrane filtration of enteroviruses*. Appl. Microbiol. 1965, p. 417.
17. Konowalchuk, J. and Speirs, J. I. *An evaluation of three agents for eluting adsorbed enterovirus from millipore membrane filters*. Can. J. Microbiol. 1971, 17, p. 135.
18. Wallis, C., Henderson, M. and Melnick, J. L. *Enterovirus concentration on cellulose membranes*. Appl. Microbiol. 1972, p. 476.
19. Cpheri, Nagpur, India 1971. *Enumeration of viruses from sewage*. Technical Digest no. 19.
20. Cliver, D. O. *Enterovirus detection by membrane chromatography in Transmission of viruses by the Water Route*, G. Berg, 1967.
21. Rao, N. U. and Labzoffsky, N. A. *A simple method for the detection of low concentration of viruses in large volumes of water by the membrane filter technique*. Can. J. Microbiol. 1969, p. 21.
22. Wallis, C. and Melnick, J. L. *Concentration of viruses from sewage by adsorption on millipore membranes*. Bull. Wld. Wlth. Org. 1967, 36, p. 219.
23. Wallis, C. and Melnick, J. *Concentration of enteroviruses on membrane filters*. J. Virology, 1967, 1, p. 472.
24. Retention and Recovery of polioviruses on a soluble ultra filter. H. Gartner in *Transmission of Viruses by the Water Route*. G. Berg, 1967.
25. Schäfer, E. *Experimentelle Untersuchungen zur quantitativen Erfassung von Polio-Impfvirus Type II in Oberflächewasser*. GWF Wasser/Abwasser, 1971, 112, p. 109.
26. Poynter. *Persoonlijke gegevens tijdens WHO studiereis in Engeland van H. J. Kool*.
27. Kool, H. J. *Niet gepubliceerde gegevens*.
28. Albertsson, P. A. *Partition of proteins in liquid polymer-polymer two-phase systems*. Nature, 1958, 182, p. 709.
29. Biphasic separation of microbiol. particles. P. A. Albertsson in *Microbiology volume 5B*, J. R. Norris and D. W. Ribbons, A.P. 1971.
30. Grindrod, J. and Cliver, D. O. *Limitations of the polymer two phase system for detection of viruses*. Arch. f. die gesamte Virusforschung, 1969, 28, p. 337.
31. Shuval, H. I., Fattal, B., Cumbalista, S. and Goldblum, N. *The Phase-separation method for the concentration and detection of viruses in water*. Water Research, 1969, 3, p. 225.
32. Grindrod, J. and Cliver, D. O. *A polymer two phase system adapted to virus detection*. Arch. f. die gesamte Virusforschung, 1970, 31, p. 365.
33. Johnson, J. H., Fields, J. E. and Darlington, W. A. *Removing viruses from water by polyelectrolytes*. Nature, 1967, p. 665.
34. Wallis, C., Grinstein, S., Melnick, J. L. and Fields, J. E. *Concentration of viruses from sewage and excreta on insoluble polyelectrolytes*. Appl. Microbiol. 1969, 18, p. 1007.
35. Wallis, C. and Melnick, J. C. *Detection of viruses in large volumes of natural waters by concentration on insoluble polyelectrolytes*. Water research, 1970, 4, p. 787.
36. Wallis, C. and Melnick, J. L. *Concentration of viruses on aluminium phosphate and aluminium hydroxide precipitates*. In *Transmission of Viruses by the Water Route*, G. Berg, 1967.
37. Clarke, N. A. and Kabler, P. W. *Human enteric viruses in sewage*. Public Health Service, 1964.
38. Prier, J. E. and Riley, R. *Significance of natural animal virus transmission in Transmission of Viruses by the Water Route*. G. Berg, 1967.
39. Nahon, N. and Kozikowski, E. *Thermal inactivation studies with Variola Virus*. Journal of Bacteriology, 1961, 81, p. 609.
40. Kjellander, J. and Lund, E. 1965. *Sensitivity of E-coli and poliovirus to different forms of combined chlorine*. JAWWA, 57, p. 893.
41. Shuval, H., Cymbalista, S., Wack, A., Zohar, Y. and Goldblum, N., 1967. *The inactivation of enterovirus in sewage by chlorination*. Loc. 3rd nlt. Conf. Water Pollution Res.
42. Clarke, N. A. Am. J. of Hyg. no. 3, 1956.
43. Cerkinsky, S. N. and Traktman, N. *The present status of research on the disinfection of drinking water in the USSR*. Bull. Wld. Hlth. Org. 1972, 46, p. 277.
44. Scarpino, P. V., Berg, G., Chang, S. L., Dahlings, D. and Lucas, M. *A comparative study of the inactivation of viruses in water by chlorine*. Water Research, 1972, 6, p. 959.
45. Kollons, S. A. *The presence of human enteric viruses in sewage and the removal by conventional treatment methods*. Appl. Microbiol., 1966, p. 145.
46. Kelly, S. and Anderson, W. *Chlorination of poliovirus*. Science, 1957, 126, p. 560.
47. Smith, D. K. *Disinfection and sterilization of polluted water with ozone*, 1967. Report AM. 6704 Ontario Research Foundation, Canada.
48. Coin et al. *Inactivation per l'ozone du virus de la poliomyélite present dans les eaux*. La Presse Medicale 1, 72, 1964 t, p. 2153.
49. Gomella, G. *Le traitement des eaux par l'ozone*. La Tribune de Cebedeau 20, 1967, 287, p. 397.
50. Chaudhuri, M. and Engelbrecht, R. S. *Removal of viruses from water by chemical coagulation and flocculation*. JAWWA, 1970, 62, p. 563.
51. Wentworth, D. F., Thorup, R. T. and Sproul, O. J. *Poliovirus inactivation in water-softening precipitation processes*. JAWWA, 1968, 60, p. 939.
52. Robeck, G. G., Clarke, N. A. and Destal, K. A. *Effectiveness of water treatment processes in virus removal*. JAWWA, 1962, 52, p. 1275.
53. Plotkin, S. A. and Katz, M., in *Transmission of Viruses by the Water Route*, G. Berg, 1967.