

Voorkomen van salmonellae in in- en effluent en de eliminatie van salmonellae tijdens de zuivering in een rioolwaterzuiveringsinstallatie *)

Inleiding

In de afgelopen 10 jaar werden gemiddeld per jaar ca. 4500 gevallen van Salmonellosis bij de mens in Nederland aangegeven. Naar schatting is dit getal slechts 5-10 % van het werkelijke aantal voorkomende gevallen. Een deel van de patiënten blijft weken tot maanden salmonellae met de faeces uitscheiden. Uitvoerige onderzoeken in Nederland hebben tevens aangetoond, dat een hoog percentage van onze landbouwhuisdieren (varkens bijvoorbeeld 12 %) klinisch gezonde Salmonelladragers zijn (Kampelmacher et al., 1962; Guinée et al., 1964; v. Schothorst et al., 1965). Ook voedings- en voedermiddelen (vlees, eiprodukten, vismeel) zijn vaak met salmonellae besmet bevonden (Kampelmacher, Guinée en Clarenburg, 1962; Guinée, Kampelmacher en Valkenburg, 1967). Een en ander heeft tot gevolg, dat zowel riool- als oppervlaktewater in Nederland in sterke mate met salmonellae is besmet (v. d. Schaaf, 1965). Bij het hier te beschrijven onderzoek werd getracht dit, voorzover het rioolwater betreft, kwalitatief en kwantitatief te bepalen en wel bij de rioolwaterzuiveringsinstallatie in een grote stad (> 100.000 inwoners) in Nederland. Bovendien werd getracht na te gaan of en zo ja in welke mate salmonellae door deze zuivering worden geëlimineerd.

Beschrijving van de installatie

De te beschrijven rioolwaterzuiveringsinstallatie heeft op het ogenblik een capaciteit van 48.000 m³/dag voor 400.000 inwoners equivalenten; dit wil zeggen geschikt voor 300.000 inwoners en 100.000 inwoners equivalenten, voor industrie. De 3 voorbezinkbassins (inhoud per bassin 3300 m³), de 6 oxydatiebedden (inhoud per bed 2500 m³) en de 3 nabezinkbassins (inhoud per bassin 2500 m³), zijn dusdanig met elkaar verbonden, dat de werking van de installatie aangepast kan worden aan de hoeveelheid influent. In afb. 1 is een schema-

tisch overzicht van de rioolwaterzuiveringsinstallatie opgenomen.

Bij de hier te beschrijven proeven werd de installatie zo geschakeld, dat het rioolwater met een stroomsnelheid van 1500 m³/uur één voorbezinkbassin, 2 parallel geschakelde oxydatiebedden en één nabezinkbassin passeert.

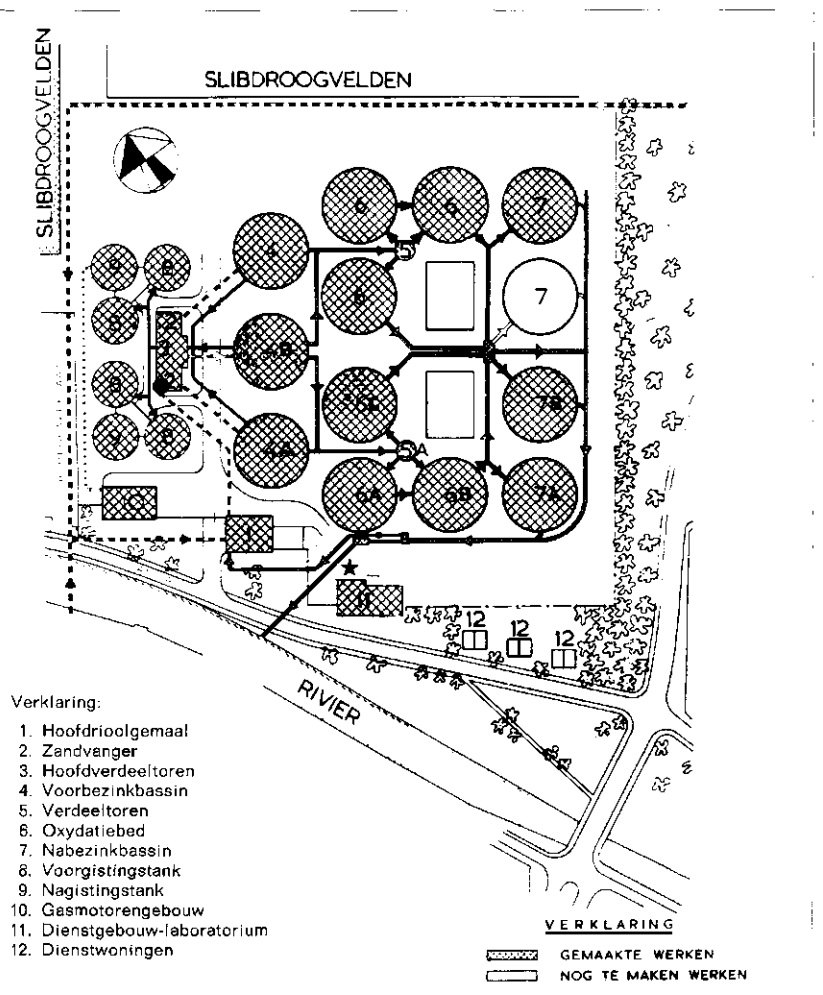
Onderzoek naar de verblijftijden van het rioolwater in de installaties **)

Een nadere informatie omtrent de verblijftijd van het rioolwater in de installatie is verkregen uit een onderzoek, waarbij gebruik is gemaakt van radioactief nuclide Na-24. Deze stof werd als een oplossing van NaCl aan het influent

toegevoegd en de activiteit ervan in het effluent met behulp van een gamma-scintillatieteller als functie van de tijd geregistreerd.

Door middel van integratie werd berekend, dat bij een stroomsnelheid van 1500 m³/uur de gemiddelde verblijftijd 6 uur bedroeg en het kleinste verdunningsvolume 9000 m³, d.w.z. op het tijdstip dat de grootste concentratie Na-24 is gemeten, zou de ingebrachte hoeveelheid Na-24 zich in 9000 m³ water homogeen opgelost moeten hebben. Tevens kon worden bepaald, dat na 10½ uur 90 % en na ca. 20 uur 99 % van het toegevoegde zout uit de installatie was verdwenen.

Afb. 1 - Rioolwaterzuiveringsinrichting.



*) Deze onderzoeken werden verricht in opdracht van de Hoofdinspectie van de Volksgezondheid voor de Hygiëne van het Milieu.

**) Dit onderzoek werd verricht door drs. R. van Dongen, Laboratorium voor Stralingsonderzoek, Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Utrecht.

Materialen en methoden

Voor de isolatie van salmonellae uit influent en effluent werden als ophopingsvloeistoffen gebruikt tetrathionaatbouillon volgens Muller-Kauffmann (MK) (Kampelmacher, 1967) en 10-voudig geconcentreerde seleniet aankweekvloeistof volgens Leifson (CS) (Merck). Na 18 - 20 uur en na 45 - 48 uur bebroeding bij 37 °C werd uitgestreken op briljantgroen-phenolroodagarplaat (Br) (Kampelmacher, 1967) met een doorsnede van 14 cm. De platen werden bij 37 °C bebroed gedurende 18 - 20 uur. Verdachte kolonies werden overgeënt op Triple-sugar-iron agar (Oxoid) en in Lysine decarboxylase medium (Taylor, 1961). Na een positieve biochemische bevinding volgde serologische typering.

De monsters effluent voor het onderzoek op *S.utrecht* werden geënt in MK. Na 18 - 20 uur en na 45 - 48 uur bij 43 °C (Harvey 1953; Edel, 1968) werd uitgestreken op Br. Het onderzoek verliep verder als boven werd beschreven.

Onderzoek van influent en effluent op het voorkomen van salmonellae

De bemonstering van het rioolwater had plaats in drie achtereenvolgende weken in september op woensdag. Het influent werd genomen op de plaats waar het in de zandvanger komt (afb. 1, no. 2 ●), het effluent uit de centrale afvoergoot (afb. 1, x).

Bij de eerste bemonstering van het in- en effluent werd van 9 uur tot 12 uur van elk een mengmonster verzameld, bij de tweede en derde bemonstering werden de monsters in één keer genomen en wel het influent om 9 uur en het effluent om 14 uur.

Het onderzoek op *Salmonella* werd semi-kwantitatief uitgevoerd. Daartoe werden in 10-voud onderzocht 0,1 ml, 1 ml en 10 ml influent en effluent in resp. 9 ml, 9 ml en 90 ml MK; 10 ml en 100 ml influent en effluent met resp. 1 ml en 10 ml CS.

Onderzoek naar de eliminatie van salmonellae tijdens de zuivering

Om na te gaan of en zo ja in welke mate salmonellae tijdens de zuivering in de installatie worden geëlimineerd werd besloten een belastingsproef uit te voeren. Hiertoe werd om 9 uur 's ochtends 300 ml bouilloncultuur van *S.utrecht* met een kiemgetal van 1×10^9 /ml (verkregen door bebroeding van *S.utrecht* in bouillon gedurende 16 uur bij 37 °C) in het influent in de hoofdverdeeltoren (zie afb. 1, no. 3) gestort. *S.utrecht* werd gekozen omdat deze *Salmonella* van de 0 52-groep nimmer in Nederland werden gevonden. Met grote mate van zekerheid kan daarom worden gesteld, dat de *Salmonella* 0 52, gevonden in het effluent, de in het influent gebrachte *S.utrecht* is. Daar bij het onderzoek naar de verblijftijden van

TABEL I - *Salmonellatypen in influent en effluent gedurende 3 achtereenvolgende weken op woensdag bemonsterd.*

Type	1e bemonstering		2e bemonstering		3e bemonstering	
	influent	effluent	influent	effluent	influent	effluent
<i>S.anatum</i>	—	—	—	—	+	—
<i>S.bareilly</i>	+	+	+	—	+	+
<i>S.california</i>	+	—	—	—	—	—
<i>S.dublin</i>	—	—	—	—	—	+
<i>S.give</i>	+	+	+	+	—	—
<i>S.heidelberg</i>	—	—	+	+	—	—
<i>S.manchester</i>	—	—	+	+	+	+
<i>S.meleagridis</i>	—	—	+	—	—	—
<i>S.minnesota</i>	+	—	—	—	—	—
<i>S.monteideo</i>	—	+	—	—	—	—
<i>S.muennen</i>	—	+	—	—	—	—
<i>S.newington</i>	+	+	—	—	—	—
<i>S.oranienburg</i>	+	—	—	+	+	+
<i>S.panama</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S.paratyphi B</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S.stanley</i>	—	+	+	+	—	—
<i>S.typhi murium</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S.virchow</i>	—	+	—	—	—	—
<i>S.worthington</i>	+	+	+	—	+	+

TABEL II - *Onderzoek van 0,1 ml, 1 ml, 10 ml en 100 ml influent en effluent in 2 verschillende ophopingsvloeistoffen, in 10-voud uitgevoerd en bebroed bij 37 °C.*

	Aantal monsters <i>Salmonella</i> -positief				
	0,1 ml in 9 ml MKx	1 ml in 9 ml MK	10 ml in 90 ml MK	10 ml in 1 ml CS ●	100 ml in 10 ml CS
<i>1e bemonstering</i>					
influent	5	5	2	6	9
effluent	1	0	7	8	8
<i>2e bemonstering</i>					
influent	2	7	6	3	5
effluent	1	1	7	5	5
<i>3e bemonstering</i>					
influent	4	8	3	4	8
effluent	2	7	2	7	5

x MK = Muller-Kauffmann

● CS = 10-voudig geconcentreerde seleniet-bouillon volgens Leifson

TABEL III - *MPN-bepaling in het effluent na toevoeging van $3 \cdot 10^{11}$ *S.utrecht* om 9 uur aan het influent in een rioolwaterzuiveringsinstallatie.*

Monsternamen om	Aantal positieve monsters			MPN per 100 l
	in 5 x 10 ml	in 5 x 1 ml	in 5 x 0,1 ml	
10.00	3	0	0	7,8
10.30	3	0	0	7,8
11.00	5	0	0	23
11.30	5	5	0	240
12.00	5	2	0	49
12.30	4	3	0	27
13.00	4	4	2	47
13.30	4	4	1	40
14.00	5	3	1	110
14.30	5	3	4	210
15.00	5	3	1	110
15.30	4	1	1	21
16.00	5	1	0	33
16.30	5	3	1	110
17.00	2	1	0	6,8
17.30	4	0	1	17
18.00	5	3	0	79
18.30	4	1	1	21
19.00	3	1	0	11
19.30	5	2	0	49
20.00	4	0	0	13
20.30	4	1	0	17
21.00	4	1	0	17
21.30	5	0	0	23
22.00	3	0	0	7,8
22.30	2	0	0	4,5
23.00	5	0	0	23

het rioolwater in de installatie is gebleken, dat het kleinste verdunningsvolume 9000 m³ bedroeg, werd in het influent 3.10¹¹ *S.utrecht* gebracht, zodat 3.10³ kiemen *S.utrecht*/100 ml in het effluent aanwezig zullen zijn als er geen zuivering plaatsvindt. Gezien het feit, dat na 10½ uur 90 % van de ingebrachte Na-24 was verdwenen, werd verwacht dat na deze tijd nog slechts 10 % der ingebrachte *S.utrecht* kiemen aanwezig zouden zijn. Een hoeveelheid van 300 Salmonella-kiemen/100 ml kan in dit materiaal nog worden teruggevonden. Op grond van de resultaten van de metingen, verricht met Na-24, werd besloten de monsterneming gedurende 14 uur na toevoering van de cultuur uit te voeren.

De monsters effluent werden genomen uit het centrale afvoerkanaal (afb. 1 x). De monsternamen begon om 10 uur, en werd elk half uur tot 23 uur uitgevoerd. In het totaal werden 27 monsters effluent à 150 ml getrokken. Direct nadat het monster was genomen, werd hiervan in 5-voud ingezet 10 ml, 1 ml en 0,1 ml in resp. 90 ml, 9 ml en 9 ml MK. De MPN-bepaling (Most Probable Number) werd uitgevoerd met behulp van de berekeningstabel volgens de Am. Publ. Health Ass. (1955).

Resultaten

Bij deze rioolwaterzuiveringsinstallatie komen zowel in influent als in effluent regelmatig salmonellae voor. Drie van de twaalf bij de mens in Nederland meest voorkomende Salmonella-typen (Kampelmacher, 1968) werden in elk monster aangetroffen, te weten: *S.typhi murium*, *S.panama* en *S.paratyphi B* (tabel I).

Isolatie van salmonellae uit sterk verontreinigd materiaal is bijzonder moeilijk.

Daarom zullen, wanneer van 10 monsters à 0,1 ml, 1 ml en 10 ml influent bij resp. 5, 5 en 2 monsters salmonellae worden geïsoleerd, meerdere monsters van 10 ml vals negatief zijn bevonden (tabel II). Dit is waarschijnlijk niet te wijten aan de relatieve concentratie der begeleidingsflora, dat wil zeggen de gelijk blijvende verhouding contaminanten - Salmonella, doch aan het absolute niveau van het aantal contaminanten.

Het feit, dat salmonellae gemakkelijker worden geïsoleerd uit effluent dan uit influent ondersteunt deze hypothese. Uit de resultaten van het onderzoek van 10 monsters à 0,1 ml influent tijdens 3 bemonsteringen, waarbij resp. 5, 2 en 4 monsters positief worden bevonden, kan echter wel worden geconcludeerd, dat volgens de Poisson-verdeling ten minste 200 Salmonellakiemen per 100 ml influent aanwezig zijn. Bij de drie bemonsteringen effluent waren resp. 1, 1 en 2 monsters van de 10 monsters à 0,1 ml positief. Dit wijst op de aanwezigheid van ten minste 100 Salmonellakiemen per 100 ml effluent.

Bij de belastingsproef werd ervan uitgegaan, dat de verdeling en doorstroming van *S.utrecht* in het rioolwater te vergelijken is met die van Na-24. Dit betekent, dat in effluent in de eerste 6 uur na het uitbrengen van de 3.10¹¹ *S.utrecht* kiemen maximaal 3.10³ kiemen/100 ml teruggevonden zouden kunnen worden.

In werkelijkheid werd in deze periode als hoogste waarde gevonden 240 kiemen/100 ml, hetgeen een reductie van 1 decimaal van het aantal *S.utrecht* kiemen betekent.

Gedurende, 10½ uur (de tijd waarin 90 % van de Na-24 uit de installatie verdween) werden uit het effluent teruggevonden gemiddeld 60 kiemen *S.utrecht*/100 ml.

Met het effluent is dan weggestroomd 10,5 (tijd) × 1500 × 10⁴ (hoeveelheid effluent per uur uitgedrukt in 100 ml) × 60 kiemen = 10¹⁰ kiemen *S.utrecht*, hetgeen bevestigt, dat de zuiverende werking van de hier beschreven rioolwater-

zuiveringsinstallatie ruim 1 decimaal draagt.

Conclusie

Wanneer 3.10¹¹ *S.utrecht* kiemen in het influent worden gebracht, worden gemiddeld in 10½ uur 60 kiemen/100 ml effluent teruggevonden. Indien dit vergeleken mag worden met de hoeveelheden Salmonellakiemen, in het effluent onder normale omstandigheden gevonden (100 kiemen/100 ml effluent) kan worden gesteld, dat continue ca. 10¹⁰ Salmonellakiemen per uur de installatie binnenkomen en ca. 10⁹ salmonellae per uur de installatie via het effluent (in 1500 m³) verlaten naar openbaar water. Gezien deze situatie verdient het overweging na te gaan of desinfectie van het effluent praktisch uitvoerbaar is. Bovendien verdient het aanbeveling na te gaan hoe de situatie is in de installaties, waar de reiniging op een ander principe berust, zoals bijv. oxydatiesloten vlg. Pasveer.

Literatuur

- American Public Health Association. 1955. „Standard methods for the examination of water, sewage and industrial wastes”, 10th ed. New York, 382 - 387.
- Edel, W. en Kampelmacher, E. H. 1968. *Comparative studies on Salmonella isolation in eight european laboratories*. Bull. Wld Hlth. Org., 39, 487 - 491.
- Guinée, P. A. M., Kampelmacher, E. H., Hofstra, K. en Keulen, A. van. 1964. *Salmonella bij gezonde runderen en kalveren in Nederland*. Tijdschr. Diergeneesk., 89, 1158 - 1169.
- Guinée, P. A. M., Kampelmacher, E. H. en Valkenburg, J. J. 1967. *Salmonella-isolaties in Nederland, 1961 - 1965*. Tijdschr. Diergeneesk., 92, 1109 - 1123.
- Harvey, R. W. S. en Thomson, S. 1953. *Optimum temperature of incubation for isolation of salmonellae*. Monthl. Bull. Minist. Hlth Lab. Serv., 12, 149.
- Kampelmacher, E. H., Guinée, P. A. M. en Clarenburg, A. 1962. *Salmonellakiemen, geïsoleerd in Nederland, 1951 - 1960*. Tijdschr. Diergeneesk., 87, 1405 - 1422.
- Kampelmacher, E. H., Guinée, P. A. M., Hofstra, K. en Keulen, A. van. 1962. *Verdere onderzoekingen over Salmonella in slachthuizen en bij normale slachtvarkens*. Tijdschr. Diergeneesk. 87, 1486 - 1520.
- Kampelmacher, E. H. 1967. *Comparative studies into the isolation of Salmonella from minced meat in five laboratories*. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 204, 100 - 111.
- Kampelmacher, E. H. 1968. *Laboratorium voor Zoönosen, Verslagen en Mededelingen betreffende de Volksgezondheid*, 20, 32 - 33.
- Schaaf, A. v. d. en Atteveld, J. C. 1965. *Voorkomen van salmonellae in het effluent van moderne inrichtingen van rioolwaterzuivering*. Geneesk. Gids, 43, 57 - 58.
- Schothorst, M. van, Guinée, P. A. M., Kampelmacher, E. H. en Keulen, A. van. 1965. *Onderzoek naar het voorkomen van Salmonellakiemen bij slachtkippen en -kuikens in Nederland*. Tijdschr. Diergeneesk., 90, 1523 - 1531.
- Taylor, W. L. 1961. *Isolation of salmonellae from food samples*. Appl. Microbiol., 9, 487.