

Het voorkomen van *Clostridium botulinum* in een drietal drinkwaterproduktiebedrijven en in hun waterwingebieden

1. Inleiding

In het afgelopen decennium hebben zich, met uitzondering van 1977 en 1978, herhaaldelijk gevallen van massale sterfte bij watervogels voorgedaan. Deze sterfte werd veroorzaakt door *Clostridium botulinum* type C en soms door type D. De ziektegevallen deden zich voornamelijk voor in waterrijke gebieden, waaronder een aantal drinkwaterwingebieden. Uit een voorgaand onderzoek (3) dat in 1977 werd uitgevoerd, kwam naar voren dat waterwingebieden in hoge mate met *Cl. botulinum* besmet kunnen



DR. IR. S. NOTERMANS
Laboratorium voor Zoönosen
en Levensmiddelenmicrobiologie,
Rijksinstituut voor de
Volksgezondheid, Bilthoven



J. DUPRENNE
Laboratorium voor Zoönosen
en Levensmiddelenmicrobiologie,
Rijksinstituut voor de
Volksgezondheid, Bilthoven

zijn. Naast type C kwamen eveneens, zij het in geringe mate, ook de typen B en E voor. *Cl. botulinum* kiemen werden echter tijdens de productie van het drinkwater geëlimineerd en het voorkomen van deze kiemen was beperkt tot de eerste zuiveringstappen die in de drinkwaterproductiebedrijven worden toegepast. Teneinde te kunnen bepalen of de gevonden besmetting al of niet toeneemt, werd het voorkomen van *Cl. botulinum* in drinkwatergebieden bestudeerd. Daarnaast werd ook het onderzoek naar de eliminatie van deze kiemen tijdens de verschillende zuiveringsprocessen van het water herhaald. Aangezien de kans op het aantreffen van *Cl. botulinum* in het water uiterst gering is, werd de aanwezigheid van deze kiemen overwegend bepaald in de bovenste laag van de diverse filters en in het coagulatieslib.

2. Drinkwaterwingebieden en de drinkwaterproductiebedrijven

Onderzoekingen werden verricht in dezelfde drinkwaterwingebieden (Loenderveense plas, spaarbekkens Biesbosch en het infiltratiegebied Leiduin) en dezelfde drinkwaterproductiebedrijven (Weesperkarspel, Kralingen en Leiduin) die ook in het vorige onderzoek betrokken waren (3). Voor een beschrijving van de door deze bedrijven toegepaste zuiveringstechniek moge worden verwezen naar Notermans en Van Noorle Jansen (1978).

3. Materiaal en methoden

Evenals het onderzoek dat in 1977 plaatsvond, werden de waterwingebieden en de productiebedrijven in de maanden september en oktober bemonsterd. Monsters uit de drinkwaterwingebieden werden zoveel mogelijk verspreid over het gebied genomen. De monsters bestonden uit bodemslib van de spaarbekkens, plassen en transportkanalen. In de productiebedrijven werden de bovenste lagen van de diverse filters en coagulatieslib bemonsterd. In één bedrijf werden eveneens dieptemonsters van één nafilter verzameld. Bovendien werd in hetzelfde bedrijf water na de langzame zandfilters bemonsterd. De verschillende monsters werden onderzocht op het voorkomen van *Cl. botulinum*.

3.1. Bepaling van *Cl. botulinum*

De aanwezigheid van *Cl. botulinum* in de monsters slib e.d. werd bepaald door van deze monsters tweemaal 1 gram over te brengen in buizen met 30 ml leverbouillon. Deze werd samengesteld en bereid zoals beschreven door Haagsma (1973). Vervolgens werd één van de twee buizen 20 minuten bij 70 °C verhit, waarna zowel de verhitte als de onverhitte buizen bij 30 °C werden geïncubeerd. In enkele gevallen werden duplomonsters ingezet, die bij 37 °C werden geïncubeerd. Na een incubatietijd van vijf dagen werd de cultuurvloeistof op de aanwezigheid van *Cl. botulinum* toxinen onderzocht. Hiertoe werd de cultuurvloeistof 1 : 4 verdund met een 0,05 M fosfaatbuffer, pH 6,5, waaraan per liter 1 gram gelatine, 1 mg streptomycine en 10⁶ E penicilline was toegevoegd. Aan porties van 2 ml verdunde cultuurvloeistof werd 0,1 ml antibotulinum serum Instituut Pasteur, Parijs) toegevoegd.

Het type serum dat werd toegevoegd was afhankelijk van de in de cultuurvloeistof te verwachten toxinen. Van de aldus behandelde en onbehandelde vloeistoffen werd

0,5 ml intraperitoneaal ingespoten bij muizen met een gewicht van 18 - 20 g. De muizen werden vervolgens gedurende enkele dagen geobserveerd en gecontroleerd op sterfte onder voor botulisme specifieke verschijnselen.

De aanwezigheid van *Cl. botulinum* sporen in watermonsters werd bepaald door porties van 3 l te filteren met behulp van membraanfilters (millipore filters met poriëndiameter 0,2 µm). De filters werden vervolgens overgebracht in buizen met 30 ml leverbouillon. Daarna werden de buizen leverbouillon met filters 20 minuten bij 70 °C verhit. Incubatie van de buizen en onderzoek op de aanwezigheid van botulinum toxinen vond plaats zoals boven omschreven.

4. Resultaten

De resultaten over het voorkomen van *Cl. botulinum* in de onderzochte drinkwaterproductiebedrijven en in hun bijbehorende drinkwatergebieden zijn in de tabellen I, II en III weergegeven. Eveneens staan in deze tabellen de gegevens over het voorkomen van *Cl. botulinum* in 1977 vermeld.

Drinkwaterproductiebedrijf Weesperkarspel (tabel I)

Uit de resultaten blijkt dat, evenals in 1977, ook in 1978 *Cl. botulinum* frequent in het bodemslib van de Loenderveense plas aanwezig was. In de meeste monsters werden meerdere typen aangetoond. Opmerkelijk is dat type E in 1977 niet gevonden werd, terwijl dit type in 1978 in 80 % van de monsters aanwezig was.

Ook de snelfilters, met behulp waarvan het water uit de Loenderveense plas wordt gefiltreerd, waren besmet met *Cl. botulinum*. Hier waren dezelfde typen aanwezig als in het bodemslib van de plas. *Cl. botulinum* kiemen konden niet meer worden aangetoond in het coagulatieslib,

TABEL I - Voorkomen van *Clostridium botulinum* in het drinkwaterproductiebedrijf Weesperkarspel.

onderzocht materiaal	1977			1978		
	n *	pos **	type(n) en frequentie	n *	pos **	type(n) en frequentie
bodemslib	10	7	B 1 x C 7 x	20	20	B 3 x C 17 x D 11 x E 16 x
Loenderveense plas						
zand snelfilters	8	5	B 1 x C 4 x	10	7	B 1 x C 2 x D 2 x E 4 x
Loenderveen						
coagulatieslib	2	0	—	4	0	—
zand snelfilters	6	0	—	10	0	—
zand langzame randfilters	6	0	—	12	0	—

* aantal onderzochte monsters

** aantal monsters waarin *Cl. botulinum* voorkomt

TABEL II - Voorkomen van *Clostridium botulinum* in het drinkwaterproductiebedrijf Kralingen.

onderzocht materiaal	1977			1978		
	n *	pos **	type(n) en frequentie	n *	pos **	type(n) en frequentie
spaarbekkens Biesbosch						
1. bodemslib plas Honderd Dertig	15	10	B 1 x C 9 x E 1 x	15	15	B 14 x D 1 x E 9 x
2. bodemslib Petrusplaat	15	10	B 1 x C 9 x	15	15	B 14 x E 3 x
bodemslib ontvangstbekken te Kralingen	6	4	C 2 x E 2 x	10	5	B 3 x E 2 x
coagulatieslib	6	3	B 2 x E 1 x	6	2	B 1 x E 1 x
zand dubbellaagfilters	6	0	—	18	0	—

* aantal onderzochte monsters

** aantal monsters waarin *Cl.botulinum* voorkomtTABEL III - Voorkomen van *Clostridium botulinum* in het drinkwaterproductiebedrijf te Leiduin.

onderzocht materiaal	1977			1978		
	n *	pos **	type(n) en frequentie	n *	pos **	type(n) en frequentie
duinfiltratiegebied						
1. slib transportkanalen	45	12	B 9 x C 2 x E 1 x	40	8	B 5 x E 4 x
2. slib verzamelkom	9	9	B 9 x E 1 x E 1 x	8	8	B 7 x E 1 x
zand snelfilters	8	8	B 4 x E 4 x	10	3	B 3 x
zand langzame zandfilters						
1. oppervlaktefilters	8	6	B 4 x C 1 x E 1 x	10	8	B 8 x
2. op 5 cm diepte	10	2	B 1 x	10	5	B 5 x
3. op 10 cm diepte	10	0	—	10	0	—
4. op 20 cm diepte	10	0	—	10	1	B 1 x
5. op 40 cm diepte	10	0	—	5	0	—
6. op 80 cm diepte	10	0	—	5	0	—
water na langzame zandfiltratie (porties van 3 l)	4	0	—	10	0	—

* aantal onderzochte monsters

** aantal monsters waarin *Cl.botulinum* voorkomt

de snelfilters en de langzame zandfilters van het productiebedrijf te Weesperkarspel.

Drinkwaterproductiebedrijf Kralingen (tabel II)

De besmetting van de spaarbekkens blijkt in 1978 te zijn toegenomen. In 1977 waren 20 van de 30 onderzochte monsters positief. In deze monsters domineerde *Cl.botulinum* type C. In 1978 waren alle onderzochte monsters positief en in ongeveer één derde van het aantal monsters waren twee typen aanwezig. In geen van deze monsters kon *Cl.botulinum* type C worden aangetoond.

Het bodemslib van het ontvangbekken te Kralingen en het coagulatieslib waren eveneens, zij het in mindere mate, met *Cl.botulinum* besmet. Ook hier werd geen type C aangetoond. Na coagulatie en ozonbehandeling kon *Cl.botulinum* niet meer worden aangetoond.

Drinkwaterproductiebedrijf Leiduin (tabel III)

In het duinfiltratiegebied te Leiduin kwam *Cl.botulinum* minder frequent voor dan in de andere twee drinkwaterwingebieden. Evenals in 1977 domineerde *Cl.botulinum* type B. Dit type kwam eveneens voor in de monsters, afkomstig van de snelfilters en de nfilters. Het voorkomen van *Cl.botulinum* op de langzame zandfilters was, op een uitzondering na, beperkt tot de bovenste 10 cm van het filterbed. In het water na de langzame zandfiltratie kon geen *Cl.botulinum* worden aangetoond.

5. Discussie

In de waterwingebieden kwamen in 1977 *Cl.botulinum* type C sporen het meest frequent voor. Dit werd gerelateerd aan de massale vogelstrefte veroorzaakt door dit type. In de afgelopen twee jaren werd deze

sterfte niet waargenomen. Toch blijkt *Cl.botulinum* nog steeds frequent in de onderzochte waterwingebieden voor te komen. De bemesting betrof ditmaal echter meer *Cl.botulinum* type B en E dan type C.

Het lag in de lijn van de verwachting dat type C in 1978 niet frequenter aangetroffen zou worden dan in 1977. Een reden voor het minder vaak treffen van type C is niet eenvoudig aan te geven. In het algemeen kan er namelijk van worden uitgegaan dat *Clostridium* sporen vrij lang onder natuurlijke omstandigheden in leven kunnen blijven. Het zou echter kunnen dat type C sporen de faag verliezen die de genetische grondslag vormt voor toxineproductie en dus herkenning (Eklund e.a., 1971). De reden voor de toename van de overige typen is vooralsnog niet te geven, aangezien niet bekend is waar deze kiemen zich zo massaal in de natuur zouden kunnen vermeerderen. Het is echter niet uitgesloten dat deze typen ook al in voorgaande jaren in dezelfde mate aanwezig waren, doch dat ze toen door het massaal voorkomen van *Cl. botulinum* type C niet opgespoord konden worden. Immers, uit een ander onderzoek (Notermans e.a., 1979) is gebleken dat, wanneer *Cl.botulinum* type C in een monster domineert, uitgroei van overige typen in de gebruikte cultuurvloei-stof wordt geremd.

De kans dat *Cl.botulinum* in het uit oppervlaktewater geproduceerd drinkwater aanwezig is, blijkt uitermate klein te zijn, aangezien *Cl.botulinum*, evenals in 1977, slechts in materiaal behorende bij de eerste zuiveringsstappen kon worden aangetoond. Waarschijnlijk worden door ozonisatie en coagulatie van het water clostridia sporen geïnactiveerd en/of verwijderd. Een uitzondering vormde wederom het productiebedrijf te Leiduin, waar geen coagulatie en ook geen ozonbehandeling worden toegepast. In dit bedrijf waren de nfilters (voorlaatste zuiveringsstap) met *Cl.botulinum* type B besmet. Het feit echter dat *Cl.botulinum* zowel in 1977 als in 1978 alleen in de bovenste laag van de langzame zandfilters aanwezig waren, en dat geen *Cl.botulinum* in het gefiltreerde water aangetoond kon worden, wijzen er op, dat deze kiemen niet door het filter heen dringen.

Er kan dan ook worden geconcludeerd dat, ook al zijn de waterwingebieden in sterke mate met *Cl.botulinum* kiemen besmet, de kans bijzonder gering is dat deze kiemen in het drinkwater terecht komen. Aangezien het oppervlaktewater met voor de mens pathogene *Cl.botulinum* typen besmet is, zou onderzoek moeten worden onder welke 'natuurlijke' condities de

- cance of actinomycetes in water supply. In G. Sykes and F. A. Skinner (eds.), actinomycetales, characteristics and importance, 219-230. London-New York.
- Frankland, P. and Frankland, P. 1894. *Microorganisms in water. Their significance, identification and removal*. London, Longmans, Green, and Co.
- Geldreich, E. E., Nash, H. D., Reasoner, D. J. and Taylor, R. H., 1975. *The necessity of controlling bacterial populations in potable waters, bottled water and emergency water supplies*. J. Am. Wat. Works Ass. 67: 117-124.
- Gräf, W. und Bauer, L., 1973. *Roter Bakterienaufwuchs (Corynebacterium rubrum n. spec.) in Leitungswassersystemen*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig., B 157, 291-303.
- Haenle, O. 1903. *Die Bakterienflora der Metzger Wasserleitung*. Strassburg, Heitz.
- Ingraham, J. L., 1958. *Growth of psychrophilic bacteria*. J. Bacteriol. 76: 75-80.
- Jannasch, H. W., 1968. *Competitive elimination of Enterobacteriaceae from seawater*. Appl. Microbiol. 16: 1616-1618.
- Kayser, H., 1900. *Die Flora der Strassburger Wasserleitung*, Kaisers Lautern.
- Kelstrup, J., Funder-Nielsen, T. D., and Theilade, J., 1977. *Microbial aggregate contamination of water lines in dental equipment and its control*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. Microbiol. 85: 177-183.
- Koch, R., 1893. *Wasserfiltration und Cholera*. Gesammelte Werke, Bd 2, Teil 1, Leipzig, Georg Thieme, 1912.
- Kooij, D. van der. 1977. *The occurrence of Pseudomonas spp. in surface water and in tap water as determined on citrate media*. Antonie van Leeuwenhoek 43: 187-197.
- Leclerc, H. et Butiaux, R., 1962. *Fréquence des Aeromonas dans les eaux d'elimination*. Ann. Inst. Pasteur 103: 97-100.
- Leefflang, K. W. H., 1963. *Microbiologic degradation of rubber*. J. Am. Wat. Works Ass. 55: 1523-1535.
- Leefflang, K. W. H., 1968. *Biologic degradation of rubber gaskets used for sealing pipe joints*. J. Am. Wat. Works Ass. 60: 1070-1076.
- Lustig, A., 1893. *Diagnostik der Bakterien des Wassers*. Jena, Gustav Fischer.
- Matulewich, V. A., Strom, P. F., Finstein, M. S., 1975. *Length of incubation for enumerating nitrifying bacteria present in various environments*. Appl. Microbiol. 29: 265-268.
- Von Meijenburg, K., 1971. *Transport-limited growth rates in a mutant of Escherichia coli*. J. Bacteriol. 107: 878-888.
- Monod, J. 1949. *The growth of bacterial cultures*. Ann. Rev. Microbiol. 3: 371-394.
- Müller, G., 1972. *Koloniezahbestimmungen im Trinkwasser*. Gas-Wasser-Fach, 113: 52-100.
- Müller, G., 1974. *Vorkommen und Bedeutung technisch unerwünschter Bakterien in der Trinkwasserversorgung*. Zentralbl. Bakteriologie Hyg. I. Abt. orig. A. 227: 50-55.
- Morita, R. Y., 1975. *Psychrophilic bacteria*. Bacteriol. Rev. 39: 144-167.
- N3043, 1956. *Bacteriologisch onderzoek van drinkwater*, KIWA, Rijswijk.
- Poynter, S. F. B. and Mead, G. C., 1964. *Volatile organic liquids and slime production*. J. appl. Bacteriol. 27: 182-195.
- Publ.bl. E.G. 18, 1975. C214: 10 en gewijzigd vlg. R/2736/76 (ENV. 123): 27.
- Rook, J. J., 1955. *Microbiological deterioration of vulcanized rubber*. Appl. Microbiol. 3: 302-309.
- Schalekamp, M., 1969. *Untersuchungen zur Abklärung des Phänomens der Wiederverkeimung in Rohrnetzen im Zusammenhang mit Ozonung*. Gas Wasser Abwasser 49: 253-257.
- Schubert, R. H. W., 1975. *Der Nachweis von Spuren der Bacillus-Species in Rahmen der hygienischen Wasserbeurteilung*. Zentralbl. Bakteriologie Hyg. I. Abt. Orig. b. 160: 155-162.
- Schubert, R., 1976. *Der Nachweis von Aeromonaden der 'Hydrophila-Punctata-Gruppe' im Rahmen der hygienischen Trinkwasserbeurteilung*. Zentral-bl. Bacteriol. Hyg. I. Abt. Orig. B. 161: 482-497.
- Selenka, F., Meissner, R., 1971. *Unterschiedliche Erfassung von Keimgruppen auf Nährböden bei der Bestimmung der Keimzahl im Wasser*. Arch. Hyg. 154: 488-499.
- Sheata, T. E., and Marr, A. G., 1971. *Effect of nutrient concentration on the growth of Escherichia coli*. J. Bacteriol. 107: 210-216.
- Sleen, N. van der, 1894. *Sur l'examen bacteriologique qualitatif de l'eau*. Archives du Musée Teyler. Ser. II, Vol. IV, 3me Partie, Haarlem.
- Strobel, K., 1972. *Pyrogenuntersuchungen an Inhalationswässern bei intravenöser Injektion und Inhalation*. Dtsch. Gesundh. wesen 27: 1618-1623.
- Trinkwasser-Verordnung, 1975. *Verordnung über Trinkwasser und über Brauchwasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasser-Verordnung)*. Die Trinkwasser-Verordnung, 213-227, Schmidt, E. Berlin.
- VEWIN, 1961. *Aanbevelingen terzake van het bepaalde in artikel 4, lid 2 van de Waterleidingwet*. Vermande Zonen, IJmuiden.
- Victoreen, H. T., 1969. *Soil bacteria and color problems in distribution systems*. J. Am. Wat. Works Ass. 61: 429-431.
- Waterleidingwet, 1957. *Wet van 6 april 1957, Stb. 150, houdende regelen met betrekking tot het toezicht op waterleidingbedrijven en tot de organisatie van de openbare drinkwatervoorziening*, Vermande Zonen, IJmuiden.
- Waterleidingbesluit, 1960. *Bestuut van 7 juni 1960, Stb. 345, houdende technische, hygiënische, geneeskundige en administratieve uitvoeringsmaatregelen van de Waterleidingwet*. Voorschriften Volksgezondheid, Vermande Zonen, IJmuiden.
- Windle Taylor, E., 1965. *Symposium on consumer complaints: Introduction*. Proc. Soc. Wat. Treatm. Exam. 14: 99-101.
- Windle Taylor, E., 1969-1970. *Aerobic sporing bacilli, fungi, and actinomycetes in slow filters*. Rep. Res. Bacteriol. Chem. Biol. Exam. London Wat. 44: 16-22.
- Windle Taylor, E., 1969-1970. *The growth, survival and distribution of fluorescent pseudomonads in water*. Rep. Res. Bacteriol. Chem. Biol. Exam. London Wt. 44: 27-38.
- Wolzogen Kühr, C. A. H. von, en Vlucht, L. S. van der, 1951. *Aerobe en anaerobe ijzerkorrosie in waterleidingbuizen*. Water, 24: 3-11.
- Zimmerman, O. E. R., 1900. *Die bakterien unserer Trink- und Nutzwasser, ins besondere des Wassers der Chemnitzer Wasserleitung*. Chemnitz, Carl Brunner.
- • •
- *Vervolg van pagina 260*
- Het voorkomen van Clostridium botulinum in een drietal drinkwaterproductiebedrijven en in hun waterwingebieden.**
- kiemen toxinen kunnen produceren en of deze toxinen door de verschillende zuiveringsprocessen worden geïnactiveerd en/of verwijderd.
- 6. Samenvatting**
- Cl.botulinum kwam, evenals in 1977, zeer frequent in waterwingebieden voor. In 1977 domineerde Cl.botulinum type C. In de monsters die in 1978 onderzocht werden domineerde Cl.botulinum type E. Dit type werd in 36 % van de onderzochte monsters aangetroffen, type B, C en D in resp. 30, 19 en 13 % van de onderzochte monsters.
- In de drinkwaterproductiebedrijven was het voorkomen van Cl.botulinum evenals in 1977 beperkt tot de eerste zuiveringsstappen. In één productiebedrijf werd Cl.botulinum ook op de langzame zandfilters aangetroffen. Hun voorkomen was echter beperkt tot de bovenste laag van het filter. In het water, na deze langzame zandfiltratie, kon Cl.botulinum niet worden aangetoond. Geconcludeerd kon worden dat de kans uitermate gering is dat Cl.botulinum kiemen die in het oppervlaktewater aanwezig zijn ook in het drinkwater voorkomen.
- Dankbetuiging**
- Dank is verschuldigd aan de heren dr. ir. J. A. Schellart en P. Kooy (Gemeentewaterleidingen Amsterdam), drs. W. C. A. van Bremen (NV Waterwinning gebied Brabantse Biesbosch) en ir. A. J. van der Veer (drinkwaterleiding der Gemeente Rotterdam) voor het behulpzaam zijn bij het nemen van diverse monsters en voor het kritisch doornemen van het manuscript.
- Literatuur**
- Eklund, M. W., Poysky, F. T., Reed, S. M. en Smith, C. A. *Bacteriophages and toxigenicity of Clostridium botulinum type C*. Science, New York; 480-482, 1971.
- Haagsma, J. *Etiologie en epidemiologie van botulisme bij watervogels in Nederland*. Dissertatie RU Utrecht, 1973.
- Notermans, S. en Noorle Jansen, M. van. *Het voorkomen van Clostridium botulinum en indicatorkiemen in drinkwaterwingebieden en drinkwater productiebedrijven*. H₂O; 16, 344-347, 1978.
- Noterman, S., Dufrenne, J. en Schothorst, M. van. *Influence of incubation temperature on the detection of Cl.botulinum types A, B and E in mud samples naturally contaminated with Cl.botulinum type C*. Eur. J. Microbiol. 1979 (in press).
- • •