

januari 2001

***Cryptosporidium* en *Giardia*: voorkomen in rioolwater, mest en oppervlaktewater met zwem- en drinkwaterfunctie**



dr. G.J. Medema
drs. H.A.M. Ketelaars
dr. W. Hoogenboezem



riwm

kiwa

januari 2001



***Cryptosporidium* en *Giardia*: voorkomen in rioolwater, mest en oppervlaktewater met zwem- en drinkwaterfunctie**

Redactie

dr. G.J. Medema, Kiwa
drs. H.A.M. Ketelaars, WBB
dr. W. Hoogenboezem, PWN

Auteurs

dr. W. Hoogenboezem, PWN (7)
drs. H.A.M. Ketelaars, WBB (1,2,5,7)
dr. G.J. Medema, Kiwa (1,2,4,5,6,7)
ing. G.B.J. Rijs, RIZA (2,3)
ing. J.F. Schijven, RIVM (2,4)

Uitgever

Vereniging van Rivierwaterbedrijven - RIWA

in samenwerking met:

Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling - RIZA

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu - RIVM

Kiwa NV Onderzoek en Advies

ISBN 9036953324

RIZA rapportnr. 2000.035

Inhoudsopgave

Afkortingen	7
Samenvatting	9
Voorwoord	17
1 Inleiding	19
1.1 <i>Cryptosporidium</i> - en <i>Giardia</i> -infecties via water	19
1.2 Veilig drinkwater: <i>total system approach</i>	22
1.3 Bronnen van <i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i>	24
1.4 Het voorkomen van <i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i> in oppervlaktewater	26
1.5 Bepalingsmethode	26
1.6 Doelen van het onderzoek	27
2 Methoden	29
2.1 Isolatie en detectie van <i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i>	29
2.1.1 Water	29
2.1.2 Mest	31
2.1.3 Microscopische beoordeling	32
2.2 Microbiologisch onderzoek	33
2.3 Fysisch en chemisch onderzoek	33
2.4 Kwaliteitsborging	33
2.4.1 Protozoa	33
2.4.2 <i>Clostridium perfringens</i>	35
2.4.3 Virussen	36
2.4.4 Overige parameters	36
2.5 Statistische analyse	36
2.5.1 Beschrijvende statistiek meetgegevens	36
2.5.2 Rendement meetmethode protozoa in rioolwater, effluent en oppervlaktewater	36

3	<i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i> in rioolwater	41
3.1	Inleiding	41
3.2	Doelen van het onderzoek	44
3.3	Selectie locaties	44
3.3.1	Rwzi Kralingseveer (KRAL)	45
3.3.2	Rwzi Amsterdam Westpoort huishoudelijk (WEST)	45
3.3.3	Ruw rioolwater België	45
3.4	Bemonstering	46
3.5	Onderzoek	46
3.6	Data-evaluatie	47
3.7	Resultaten en discussie	48
3.7.1	<i>Cryptosporidium</i> - en <i>Giardia</i> -gehalten	48
3.7.2	Geometrisch gemiddelde waarden	53
3.7.3	Emissie via stedelijk afvalwater	56
3.7.4	Correlatie van de gehalten aan <i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i> met de microbiologische en chemische parameters	58
3.8	Conclusies	59
4	<i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i> in mest van landbouwhuisdieren	61
4.1	Inleiding	61
4.1.1	Overdracht van dier naar mens	61
4.2	Doelen van het onderzoek	62
4.3	Bemonstering	63
4.3.1	Vleeskalveren	64
4.3.2	Melkkoeien	64
4.3.3	Vleeskuikens	64
4.3.4	Legkippen	64
4.3.5	Monsterneming kalvermestverwerkingsbedrijf	64
4.3.6	Monsterneming slachthuisafvalwater	65
4.4	Onderzoek	66
4.5	Data-evaluatie	66
4.6	Resultaten	67
4.6.1	<i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i> in mest van landbouwhuisdieren	67
4.6.2	<i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i> in kalvergier, ingedikte mest en effluent van een kalvermestverwerkingsbedrijf	76
4.6.3	<i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i> in slachthuisafvalwater	79
4.6.4	Bacteriologisch en chemisch onderzoek van slachthuisafvalwater en van het effluent van kalvermestverwerking	80

4.7	Discussie en conclusies	82
4.8	Aanbevelingen	84
5	Oppervlaktewater	87
5.1	Inleiding	87
5.1.1	Voorkomen in Nederlands oppervlaktewater	87
5.1.2	Voorkomen in Belgisch oppervlaktewater	89
5.2	Doelen van het onderzoek	89
5.3	Selectie locaties	90
5.4	Bemonstering	91
5.5	Onderzoek	91
5.6	Data-evaluatie	92
5.7	Resultaten	92
5.7.1	Voorkomen van <i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i>	92
5.7.2	Seizoensvariaties	94
5.7.3	Correlatie met andere waterkwaliteitsparameters	99
5.7.4	Protozoavracht via Rijn en Maas	101
5.7.5	Verloop van de gehalten aan protozoa en indicatororganismen in de stroomgebieden	102
5.7.6	Benodigde verwijderingscapaciteit	103
5.7.7	Virusgehalten in Rijn en Maas	105
5.7.8	Seizoensvariatie virusgehalten	106
5.7.9	Virusvracht via Rijn en Maas	106
5.8	Conclusies	107
6	Zwemwater	109
6.1	Inleiding	109
6.2	Doelen van het onderzoek	110
6.3	Selectie zwemgelegenheden	110
6.4	Bemonstering	111
6.5	Onderzoek	111
6.6	Data-evaluatie	112
6.7	Resultaten	112
6.8	Risico-analyse	116
6.9	Discussie en conclusies	117

7	Geïntegreerde eindbeschouwing	119
7.1	Detectiemethode voor <i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i>	119
7.1.1	Rendement	119
7.1.2	Betekenis voor de interpretatie van de protozoagegevens	120
7.1.3	Infectiviteit	121
7.2	Bronnen	121
7.2.1	Huishoudelijk afvalwater	122
7.2.2	Mest van landbouwhuisdieren	124
7.2.3	Kalvermestverwerkingsbedrijven	125
7.2.4	Slachthuisafvalwater	125
7.2.5	Totale 'productie' van <i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i>	125
7.2.6	Aanvoer via Rijn en Maas	126
7.3	Relatieve belang van de verschillende bronnen	127
7.4	Oppervlaktewater met drinkwaterfunctie	128
7.5	Oppervlaktewater met zwemwaterfunctie	129
7.6	Correlatie met andere waterkwaliteitsparameters	131
7.7	'Early warning' van piekgehalten aan protozoa	133
7.8	Routes van <i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i> naar het oppervlaktewater	134
8	Aanbevelingen	135
9	Dankwoord	137
	Literatuur	139
	Bijlage 1	147
	Bijlage 2	167

Afkortingen

AWW	=	Antwerpse Waterwerken
BI	=	Betrouwbaarheidsinterval
BIWM	=	Brusselse Intercommunale Watermaatschappij
BZV	=	Biologisch zuurstofverbruik
COLI37	=	Bacteriën van de coligroep
CZV	=	Chemisch zuurstofverbruik
DELTA	=	DELTA Nutsbedrijven
DZH	=	Duinwaterbedrijf Zuid-Holland
FRNAPH	=	F-specifieke RNA-fagen
FSTREP	=	Fecale streptococci
FTE	=	Formazine troebelingsseenheid
GWA	=	Gemeentewaterleidingen Amsterdam
i.e.	=	inwoner equivalenten
KRAL	=	Rwzi Kralingseveer
kvd	=	kolonievormende deeltjes
NKj	=	Kjeldahl stikstof
pve	=	plaque vormende eenheden
PWN	=	PWN Waterleidingbedrijf Noord-Holland
RIVM	=	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
RIWA	=	Samenwerkende Rivierwaterleidingbedrijven
RIZA	=	Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling
rwzi	=	rioolwaterzuiveringsinrichting
SCP	=	<i>Clostridium perfringens</i>
SSRC	=	Sporen van sulfietreducerende clostridia
THCOL	=	Thermotolerante bacteriën van de coligroep
WBB	=	Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch
WEST	=	Rwzi Amsterdam Westpoort
WG	=	Waterbedrijf Groningen
WML	=	Waterleiding Maatschappij Limburg
WMN	=	Waterleidingbedrijf Midden-Nederland
WMO	=	Waterleiding Maatschappij Overijssel
WOT	=	Waterleidingbedrijf Oost-Twente
WRK	=	Watertransportmaatschappij Rijn-Kennemerland
WRK3	=	WRK, pompstation prinses Juliana

Samenvatting

De aanwezigheid van *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten in de grondstof van drinkwaterbedrijven is een bedreiging voor de bereiding van veilig drinkwater. Om die reden heeft RIWA in 1995 een onderzoek geïnitieerd naar het voorkomen van deze parasieten in het water van Maas en Rijn. Uit dit en ander onderzoek bleek dat *Cryptosporidium* en *Giardia* voorkomen in Nederlands oppervlaktewater. Als vervolgonderzoek is door een samenwerkingsverband van RIVM, RIZA, Kiwa en een aantal RIWA-lidbedrijven in 1997-1998 een onderzoek uitgevoerd naar het belang van stedelijk afvalwater, mest, mestverwerking en slachthuisafvalwater als bronnen van deze parasieten. Daarnaast is de buitenlandse aanvoer via Rijn en Maas in kaart gebracht en is bij een aantal innamepunten voor de drinkwatervoorziening in Nederland en België en bij 3 zwemlocaties in oppervlaktewater het voorkomen van deze parasieten gekarakteriseerd. Naast *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn ook andere microbiologische, fysische en chemische parameters gemeten om hun relatie met het voorkomen van de beide parasieten (en mogelijk voorspellende waarde) vast te stellen.

Bepalingsmethode

De gebruikte bemonsterings- en detectietechniek was ten tijde van dit onderzoek 'state-of-the-art', maar het rendement van de bepaling was variabel en laag. Het geometrisch gemiddelde rendement was 2,6% voor *Cryptosporidium* en 15,6% voor *Giardia*. Voor slachthuisafvalwater was het geometrisch gemiddelde rendement respectievelijk 38 en 68%. De metingen van *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn voor deze rendementen gecorrigeerd, om hun werkelijke gehalten zo goed mogelijk te benaderen.

Stedelijk afvalwater

Cryptosporidium en *Giardia* waren consistent aanwezig in het influent en effluent van twee rwzi's en in het ongezuiverd rioolwater van de stad Luik. Het geometrisch gemiddelde gehalte van *Cryptosporidium* in het ruwe rioolwater lag bij rwzi Kralingseveer (KRAL) op 540/l en bij Amsterdam Westpoort (WEST) op 4650/l. Voor *Giardia* was dit respectievelijk 1220 en 21300/l. De zuivering van afvalwater verwijderde *Cryptosporidium* met gemiddeld 1,3 - 1,5 log-eenheden en *Giardia* met gemiddeld 1,9 - 2,0 log-eenheden. De gehalten van *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten blijken dus per locatie sterk te verschillen (fig. 3.6; tabel 3.5). Een verklaring voor die verschillen

kon niet worden gevonden in verschillen in type rioolwater of in de aanwezigheid van slachthuizen of ziekenhuizen in het voorzieningsgebied. Seizoensinvloeden op de aantallen (oö)cysten in ongezuiverd stedelijk rioolwater van KRAL, WEST en Luik werden niet aangetoond (fig. 3.1 - 3.5). In ruw rioolwater waren cysten in hogere aantallen aanwezig dan oöcysten. Een betere verwijdering van cysten in het zuiveringsproces leidde ertoe dat de gehalten aan oöcysten en cysten in het effluent ongeveer gelijk waren (tabel 3.5). De in Nederland en België gemeten aantallen (oö)cysten in al dan niet gezuiverd stedelijk afvalwater, liggen binnen de ruime bandbreedte van de in de buitenlandse literatuur gerapporteerde gehalten in rioolwater.

Door de meetgegevens te extrapoleren naar de totale hoeveelheid huishoudelijk afvalwater konden emissieberekeningen worden uitgevoerd. Van de totale bruto emissie aan *Cryptosporidium*-oöcysten uit huishoudens komt minder dan 5% in het Nederlandse oppervlaktewater terecht. Dat zijn echter nog steeds $1,4 \times 10^{14}$ oöcysten. Circa 62% van de netto emissie van huishoudens naar oppervlaktewater wordt veroorzaakt door gezuiverde effluentlozingen van rwzi's. De bijdrage als gevolg van riooloverstorten bedraagt 18%; 20% is het gevolg van directe lozingen vanuit verspreide bebouwing. De gezuiverde effluentlozingen van rwzi's (34%), de riooloverstorten (30%) alsmede de ongezuiverde directe lozingen (36%) dragen evenredig bij aan de netto emissie van *Giardia*-cysten uit huishoudens naar het Nederlandse oppervlaktewater ($2,3 \cdot 10^{14}$ cysten/jaar). Dit is minder dan 5% van de bruto emissie uit huishoudens.

In ruw rioolwater correleerden beide protozoa met een groot aantal andere microbiologische parameters (*Clostridium perfringens*, F-specifieke RNA-fagen en fecale streptococci) en chemische parameters (BZV en zwevende stof). In het gezuiverde effluent was een positieve correlatie waarneembaar tussen beide protozoa en de sporen van sulfietreducerende clostridia en die van *Clostridium perfringens*.

Mest van landbouwhuisdieren

Vleeskalveren vormen potentieel een kwantitatief belangrijke bron van *Cryptosporidium* en *Giardia* (fig. 4.3-4.8). Van de pasgeboren dieren is 90% van de koppels positief. De mest van kalveren < ½ jaar bevat $5,3 \times 10^5$ - $5,2 \times 10^7$ *Cryptosporidium*/kg en $2,5 \times 10^6$ - $3,2 \times 10^7$ *Giardia*/kg. Driekwart van deze mest ($2,6 \times 10^9$ kg) komt (na opslag) op het land terecht. Een kwart gaat naar de kalvermestverwerking. De bijdrage van effluent van kalvermestverwerking aan de *Cryptosporidium*-belasting van oppervlaktewater bleek gering. Tijdens het indikken van kalvermest bij kalvermestverwerkingsbedrijven sterft ongeveer 80% van de *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten in de aangevoerde mest af (fig. 4.11). De kalvermest die op het land wordt gebracht is dus potentieel een

grote bron van *Cryptosporidium* en *Giardia*. Belangrijke onbekende om het werkelijke belang te bepalen is in welke mate deze protozoa door uit- en afspoeling van op het land gebrachte mest in het oppervlaktewater terechtkomen. In mest van melkkoeien (tabel 4.4) werden in dit onderzoek geen oöcysten aangetoond, in slechts één van de 55 mengmonsters werden enkele *Giardia*-cysten gevonden. Op grond van deze beperkte resultaten kon geen kwantificering van de emissie van melkkoeien worden gegeven. Jong melkvee is wellicht een potentieel belangrijke emissiebron, die nog niet voldoende is onderzocht. *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn niet in mest van vleeskuikens aangetoond, derhalve levert deze mest waarschijnlijk geen bijdrage van betekenis aan de emissie. Legkippen vormen een belangrijke emissiebron voor *Cryptosporidium*. Dit zou echter *Cryptosporidium baileyi* kunnen zijn, een niet menspathogene *Cryptosporidium*-soort. In dit onderzoek kon geen onderscheid tussen verschillende soorten *Cryptosporidium* worden gemaakt. Varkens blijken op grond van het onderzoek van het slachthuisafvalwater besmet te zijn met *Cryptosporidium* en *Giardia*. Omdat het voorkomen van (oö)cysten in varkensmest niet kon worden bepaald, kan de emissie via varkensmest niet worden geschat. Afvalwater van runder-, varkens- en pluimveeslachterijen levert geen bijdrage van betekenis aan de lozing van *Cryptosporidium* en *Giardia* op het oppervlaktewater. De gehalten lagen in dezelfde orde van grootte als die voor het oppervlaktewater (tabel 4.9). Slachthuisafvalwater van vleeskalveren is nog niet onderzocht. Mogelijk dragen deze wel substantieel bij aan de protozoabelasting van het oppervlaktewater.

Oppervlaktewater

Cryptosporidium en *Giardia* kwamen voor op alle onderzochte oppervlaktewaterlocaties (tabel 5.2 - 5.3). Het percentage positieve monsters op de onderzochte locaties varieerde van 33 - 100% voor *Cryptosporidium* en van 67 - 100% voor *Giardia*. De gemiddelde gehalten aan *Cryptosporidium*-oöcysten varieerden van 1,4 - 87 per liter en aan *Giardia* van 1,5 - 95 per liter. In de zomerperiode waren de gehalten aan *Cryptosporidium* en *Giardia* relatief laag, in de nazomer en herfst was op de meeste locaties een relatief snelle stijging van de gehalten zichtbaar (fig. 5.1 - 5.2).

De beste en meest voorkomende correlaties werden aangetroffen tussen de gehalten van *Cryptosporidium* en van *Giardia* (tabel 5.4 - 5.5). Fecale streptococci correleerden op de meeste locaties met zowel *Cryptosporidium* als *Giardia*. Ook een toename in het debiet correleerde met een verhoging van de gehalten aan protozoa.

De jaarlijkse protozoavrucht in de Rijn bij Lobith was $1,7 \times 10^{15}$ *Cryptosporidium*-oöcysten en $1,4 \times 10^{15}$ *Giardia*-cysten en voor de Maas bij Eijsden $2,1 \times 10^{14}$ oöcysten en $3,6 \times 10^{14}$ cysten (fig. 5.3 - 5.4).

Het water bij de monsterpunten Lobith en Eijsden werd ook onderzocht op het voorkomen van enterovirussen en reovirussen. De jaarlijkse vracht bij Lobith bedraagt $5,8 \times 10^{12}$ enterovirussen en $1,1 \times 10^{14}$ reovirussen. De Maas bij Eijsden vertoonde zelfs een iets hoger gehalte: $7,6 \times 10^{12}$ enterovirussen per jaar en $1,2 \times 10^{13}$ reovirussen komen jaarlijks via de Maas Nederland binnen.

De meetgegevens bij innamepunten zijn gebruikt voor de berekening van de benodigde verwijderingscapaciteit. Deze wordt beïnvloed door de variatie in de gemeten gehalten en de variatie in de opbrengst van de meetmethode. Om deze variatiebronnen in de berekening tot hun recht te laten komen, is een zogenaamde Monte Carlo analyse uitgevoerd. De benodigde gemiddelde verwijderingscapaciteit van de oppervlaktewaterzuiveringssystemen varieerde, afhankelijk van de gehalten aan protozoa in de grondstof op de verschillende locaties van 5,8 - 7,0 $^{10}\log$ -eenheden voor *Cryptosporidium*-oöcysten en van 6,0 - 7,8 voor *Giardia*-cysten (tabel 5.6 - 5.7). Het 95-percentiel van de verwijderingscapaciteit voor oöcysten varieerde van 6,4 - 7,5 $^{10}\log$ -eenheden en voor *Giardia*-cysten van 7,1- 8,5 $^{10}\log$ -eenheden.

Zwemwater

De microbiologische kwaliteit van het zwemwater op de onderzochte zwemlocaties voldeed ruim aan de zwemwaternorm. Het gemiddelde gehalte aan thermotolerante bacteriën van de coligroep lag net boven 100 per 100 ml, het niveau waarboven in epidemiologisch onderzoek is vastgesteld dat een meetbare verhoging van de kans op maagdarminfecties optreedt (fig. 6.3). *Cryptosporidium* en *Giardia* kwamen voor op alle zwemlocaties.

Beide parasieten waren gedurende het gehele badseizoen in het zwemwater aantoonbaar. De aantallen waarin beide parasieten voorkwamen in zwemwater waren duidelijk gecorreleerd (fig. 6.1). Er bleek geen correlatie aantoonbaar tussen de routine waterkwaliteitsparameter (thermotolerante bacteriën van de coligroep) en de aantallen parasieten. Er bestond wel een correlatie tussen aantallen parasieten en F-specifieke RNA-fagen en een negatieve correlatie met het gehalte aan chlorofyl-a, waarschijnlijk doordat hoge aantallen algen de bepaling van de protozoa negatief beïnvloedden (tabel 6.3).

Met de gemeten gehalten aan *Cryptosporidium* en *Giardia* in zwemwater is een analyse van het infectierisico op basis van drie blootstellingsscenario's uitgevoerd, waarbij een bepaalde blootstelling is aangenomen (zwemfrequentie, volume water ingeslikt) en is aangenomen dat alle gemeten parasieten ook levensvatbaar en infectieus zijn. Daaruit kwam naar voren dat bij de gemeten aantallen *Cryptosporidium* en *Giardia* het risico bij één keer zwemmen in het seizoen relatief laag is (0,2-0,5%). Duidelijk is wel dat het risiconiveau van zwemmen in oppervlaktewater ruim boven het maximaal acceptabele

jaarrisico ligt, zoals dat voor drinkwaterconsumptie wordt gehanteerd (0,01% ofwel 1 infectie per 10.000 personen per jaar). Bij herhaalde blootstelling is het risico van zwemmen nog duidelijk hoger, namelijk 14 tot 71 infecties op de 100 personen per jaar. Een zwemmer die regelmatig een dergelijke zwemgelegenheid bezoekt, heeft dus een aanzienlijk risico om besmet te raken met *Cryptosporidium* of *Giardia*.

Correlaties

Cryptosporidium en *Giardia* worden via feces in het milieu verspreid en zullen daarom naar verwachting een positieve correlatie vertonen met de algemeen gebruikte indicatoren voor fecale besmetting zoals thermotolerante bacteriën van de coligroep (THCOL), fecale streptococci (FSTREP), sporen van sulfietreducerende clostridia (SSRC), sporen van *Clostridium perfringens* (SCP) en F-specifieke RNA-fagen (FRNAPH) (fig. 7.3).

In alle gevallen bleken *Cryptosporidium* en *Giardia* goed met elkaar te correleren. De mate van correlatie wordt mede bepaald door de opwerkingsmethode van de protozoa-bepaling. De variaties van die opwerkmethode beïnvloeden hier ook de gevonden verbanden. In ruw rioolwater correleerden beide protozoa met een aantal microbiologische (SCP, FRNAPH en FSTREP) en chemische (BZV en zwevende stof) parameters. In het gezuiverde effluent correleerden SSRC en SCP vooral goed. Ook in het oppervlaktewater bleken beide protozoa goed met elkaar te correleren. Daarnaast bleek er een correlatie te bestaan met FSTREP. In de Rijn correleerden beide parasieten met de troebelingsgraad, in de Maas werd dit alleen voor *Giardia*-cysten gevonden. Zware regenval en sterke dooi kunnen leiden tot het afspoelen van dierlijke mest en het overstorten van rioleringsystemen. Dergelijke gebeurtenissen zullen gepaard gaan met een plotselinge toename van de troebelingsgraad, die wellicht gebruikt kan worden als 'early warning system'. Op veel plaatsen werd een negatieve correlatie gevonden tussen *Giardia* en de temperatuur. Dit kan vermoedelijk worden toegeschreven aan het eerder afsterven van *Giardia*-cysten bij een hogere temperatuur.

Bronnen

Met de gegevens van (on)gezuiverd rioolwater en het mestonderzoek is te berekenen dat in Nederland jaarlijks $1,87 \times 10^{16}$ *Cryptosporidium*-oöcysten worden geproduceerd; 84% komt van kalvergier, 13% vanuit huishoudens en 2,3% uit mest van legkippen. Voor de *Giardia*-cysten met een jaarlijkse 'productie' van $1,08 \times 10^{16}$ levert stedelijk afvalwater 72% en kalvergier ongeveer 26% (fig. 7.1). Het is nog onbekend welk gedeelte van de in dierlijke mest gevonden (oö)cysten daadwerkelijk het oppervlaktewater bereikt. Vermoedelijk is dat slechts een geringe fractie.

Via de Rijn en Maas worden jaarlijks naar schatting respectievelijk ruim 10^{15} en 10^{14} (oö)cysten aangevoerd (fig. 7.2). Vergeleken met de aanvoer vanuit het buitenland lijken de bijdragen van biologisch gezuiverd en ongezuiverd stedelijk afvalwater en het effluent van de kalvermestverwerking kwantitatief van ondergeschikt belang (fig. 7.2). Voor locaties die weinig of niet beïnvloed worden door Rijn of Maas kunnen deze bronnen wel van belang zijn. Ook lokaal zal de waterkwaliteit door deze bronnen worden beïnvloed. De (oö)cysten aanwezig in mest van kalveren, vleeskalveren en legkippen zouden in potentie een substantiële bijdrage kunnen leveren. Er is echter nog geen inzicht in welke aantallen uit die mest uiteindelijk in het Nederlandse oppervlaktewater terechtkomen. Men kan wel becijferen wat het betekent als slechts een klein gedeelte van dit (oö)cysten-reservoir tot het oppervlaktewater zou doordringen. Als bijvoorbeeld 1% in het oppervlaktewater komt, zal dit geen merkbare verhoging van het gehalte aan protozoa in Maas of Rijn veroorzaken. Maar ook hier zou dit voor lokaal oppervlaktewater wel tot een substantiële verhoging kunnen leiden.



Figuur S1 Routes van belangrijke bronnen van *Cryptosporidium* en *Giardia* naar het oppervlaktewater in Nederland. De dikte van de pijl geeft het relatieve belang van de route aan. Gestippelde pijlen geven aan dat niet voldoende informatie aanwezig is voor een reële schatting.

Deze studie heeft meer inzicht gegeven in de gehalten aan (oö)cysten in het Nederlandse en Belgische oppervlaktewater, de buitenlandse aanvoer en de gehalten in afvalwater van huishoudens, slachthuizen en mestverwerkingsbedrijven (fig. S1). In het transport-schema van (oö)cysten ontbreekt nog kwantitatieve informatie over het transport van dierlijke mest naar het oppervlaktewater en ook is er nog gebrek aan informatie over de bijdrage door de natuurlijke fauna.

Aanbevelingen

- De bepalingsmethode zodanig verbeteren, dat een hoger en constanter rendement verkregen wordt. Verder is het van belang informatie te verzamelen over levensvatbaarheid en soortsbepaling van de gevonden (oö)cysten om de werkelijke belasting met ziekteverwekkende parasieten te kunnen bepalen.
- Bepalen wat de daadwerkelijke afdoding is bij desinfectie van rwzi-effluenten, bijvoorbeeld met UV.
- In dit onderzoek is met name aandacht besteed aan de infectierisico's van de protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia* voor de mens via inname van drinkwater en tijdens zwemmen in oppervlaktewater. Of de aangetoonde gehalten in het Nederlandse oppervlaktewater ook een risico inhouden voor andere doelgroepen, zoals voor vee bij veedrenking, is niet bekend en verdient in de toekomst nadere aandacht.
- Meer gegevens verzamelen over de emissie van (oö)cysten door o.a. jong melkvee, varkens en vleeskuikens en de gehalten aan (oö)cysten in afvalwater van slachthuizen voor vleeskalveren.
- Nader onderzoek uitvoeren naar de uit- en afspoeling van de protozoa in de mest op het land.
- Meer kennis verzamelen van de ruwwaterkwaliteit voor de drinkwaterbedrijven die oppervlaktewater gebruiken en de kennis over de verwijderingcapaciteit tijdens zuiveringsprocessen vergroten. Vooral pieken in de belasting maken een betrouwbare schatting van de benodigde verwijdering moeilijk. Het vaststellen van de verwijderingscapaciteit van de zuiveringsprocessen zal vooral door locatie-specifieke metingen van surrogaatparameters dienen te geschieden.
- De buitenlandse aanvoer blijkt de belangrijkste bron van de (oö)cysten in Rijn en Maas te zijn. Internationaal overleg dient daarom plaats te vinden om een verbetering van de waterkwaliteit te bewerkstelligen.
- Meer zwemwaterlocaties dienen onderzocht te worden, in het bijzonder in gebieden waar uitspoeling van mest, lozing van ongezuiverd rioolwater en effluenten van rwzi's een belangrijke rol zouden kunnen spelen.
- Seroprevalentie-onderzoek bij zwemmers kan gegevens opleveren over de besmettingsgraad.
- Met behulp van de in dit onderzoek verzamelde gegevens kan de emissie en verspreiding van de protozoa gemodelleerd worden, waarbij de datasets van het oppervlaktewater als validatiepunten kunnen dienen. Het emissie- en verspreidingsmodel is te gebruiken voor het voorspellen van gehalten op zwemwaterlocaties en bij nieuw te realiseren innamepunten, bijvoorbeeld voor huishoudwater.

Voorwoord

De aan drinkwater gerelateerde 'outbreaks' van cryptosporidiosis en giardiasis in de Verenigde Staten van Amerika en Groot-Brittannië in de afgelopen jaren hebben de aandacht van de waterleidingwereld getrokken. In Nederland en België zijn overigens geen 'outbreaks' geweest die met drinkwater in verband gebracht kunnen worden. Toch is ook daar extra aandacht ontstaan voor de parasitaire protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia*, omdat bij genoemde incidenten is gebleken dat overlevingsstadia van deze parasieten (respectievelijk oöcysten en cysten) in staat bleken door zuiveringssystemen te kunnen dringen, waarbij een desinfectie wordt toegepast die tot nu toe als betrouwbaar beschouwd werd.

Om de mogelijke gevaren van protozoa voor de drinkwaterproductie te kunnen beoordelen, is het noodzakelijk om informatie te verzamelen over het voorkomen van deze parasieten in het oppervlaktewater dat gebruikt wordt voor de bereiding van drinkwater en om na te gaan wat de bronnen van deze parasieten zijn. Als de (piek)belasting van het te gebruiken oppervlaktewater eenmaal bekend is, kan men de zuiveringsinstallaties zodanig ontwerpen, dat het gehalte van parasieten in het geproduceerde drinkwater geen gevaar voor de volksgezondheid oplevert.

RIWA heeft in samenwerking met RIVM in 1996 een inventariserende studie gerapporteerd naar het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* op enkele oppervlaktewaterlocaties en de potentiële bronnen van beide parasieten (rioolwater en mest) in het Maasstroomgebied. Daarmee zijn enkele antwoorden op de bovengestelde informatiebehoefte gegeven (Medema *et al.*, 1996). In deze eerste studie is tevens duidelijk geworden dat een samenwerkingsverband met andere organisaties een belangrijk voordeel kan bieden. Het onderhavige rapport beschrijft een tweede onderzoek, dat is uitgevoerd door een samenwerkingsverband van RIVM, RIZA, Kiwa en enkele RIWA-lidbedrijven in Nederland en België. Door expertise, onderzoeksgeld en capaciteit te bundelen, is informatie verzameld die voor alle deelnemers van belang is en tevens voor elke deelnemer specifieke onderzoeksvragen beantwoordt. RIVM heeft zich met name gericht op de bijdrage die mest van diverse landbouwhuisdieren levert aan de belasting van het oppervlaktewater. Daarnaast heeft RIVM samen met RIZA de belasting van rioolwater en de verwijderingsefficiëntie van enkele rioolwaterzuiveringsinrichtingen onderzocht. Ook heeft RIZA de gehalten

protozoa onderzocht op de plaatsen waar Maas en Rijn ons land binnenstromen, alsmede enkele zwemgelegenheden in oppervlaktewater die aan deze rivieren zijn gelegen. De bijdrage van Kiwa en de RIWA-lidbedrijven heeft zich vooral gericht op de gehalten bij innamepunten van oppervlaktewater voor de bereiding van drinkwater in Nederland en België.

Het zal duidelijk zijn dat, dankzij deze samenwerking, een gedetailleerd beeld is verkregen van de bronnen en abundantie van *Cryptosporidium* en *Giardia* in de Nederlandse oppervlaktewateren. Er is een grote hoeveelheid gegevens verzameld. Deze worden in voorliggend rapport samengevat en besproken. In het 'Databoek *Cryptosporidium* en *Giardia* onderzoek 1997-1998' zijn alle ruwe data opgenomen die in dit onderzoek zijn verzameld.

W. Hoogenboezem

Voorzitter RIWA-projectgroep

1 Inleiding

1.1 *Cryptosporidium*- en *Giardia*-infecties via water

De parasitaire protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia* hebben de laatste decennia in de Verenigde Staten en Groot-Brittannië een aanzienlijk aantal epidemieën van maag-darminfecties via water veroorzaakt. Deze epidemieën of 'outbreaks' zijn zowel opgetreden via recreatief contact met oppervlaktewater, als door consumptie van verontreinigd drinkwater. In veel gevallen werd dit drinkwater bereid uit oppervlaktewater, maar er zijn ook 'outbreaks' opgetreden via drinkwater bereid uit grondwater. In het geval van de oppervlaktewaterzuivering werden veel 'outbreaks' veroorzaakt door het optreden van een piekverontreiniging in het ruwe water als gevolg van hevige regenval of het intreden van dooi, waar de zuivering niet op berekend was. Ook waren duidelijke en minder duidelijke onvolkomenheden in de bedrijfsvoering regelmatig aanleiding voor 'outbreaks' (tabel 1.1). Bij de grondwaterzuivering betrof het of oevergrondwaterwinningen, waarbij het opgepompte water was verontreinigd via het rivierwater en onvolgende werd nagezuiverd, of grondwaterwinningen waar de bronnen/putten onvolgende waren beschermd tegen binnendringen van menselijke of dierlijke fecaliën. Ook besmetting van het water in het distributiesysteem door lekkages, open reservoirs, open leidinggedeelten of werkzaamheden, is in een aantal gevallen de oorzaak van een 'outbreak' geweest. Overigens blijkt uit tabel 1.1 ook dat in een groot aantal gevallen geen directe oorzaak voor de besmetting van het drinkwater is gevonden.

In Nederland of België zijn, voor zover bekend, geen epidemieën van *Giardia* of *Cryptosporidium* via drinkwater veroorzaakt. Wel is in de zomer van 1995 een epidemie van cryptosporidiosis opgetreden in het westen van Nederland. Onderzoek naar de oorzaak gaf aan dat dit geen drinkwater-gerelateerde epidemie was, maar waarschijnlijk via zwembaden was overgedragen (Van Asperen *et al.*, 1996). Mank (pers. meded.) heeft aanwijzingen dat een dergelijke epidemie elke zomer optreedt. Zwembaden zijn ook in het buitenland beschreven als bron van 'outbreaks' van *Cryptosporidium*-infecties (Casemore *et al.*, 1997).

Uit diverse onderzoeken blijkt dat in Nederland net zo veel mensen ziek worden door *Cryptosporidium* en *Giardia* als in andere geïndustrialiseerde landen (Medema, 1999). De belangrijkste route waarlangs deze mensen besmet raken, is waarschijnlijk contact met besmette personen of dieren, maar ook recreatie in oppervlaktewater en zwembaden

zijn mogelijke oorzaken. Het feit dat het meeste drinkwater wordt bereid uit beschermd grondwater en dat oppervlaktewater uitgebreid wordt gezuiverd en vaak wordt beschermd tegen piekverontreiniging door opslag in bekkens, maakt drinkwater een weinig waarschijnlijke (maar wel kwetsbare) route.

In België wordt sinds 1998 onderzoek gedaan naar de mogelijkheid van overdracht via drinkwater door klinische gegevens te vergelijken van stoelgangonderzoek in de regio's Antwerpen (drinkwater uit oppervlaktewater) en Turnhout (drinkwater uit grondwater) (Pattyn, pers. meded.). Tot nu toe werd weinig *Cryptosporidium* en *Giardia* aangetroffen in beide regio's en is er geen significant verschil in voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in feces monsters tussen de twee regio's vastgesteld.

Tabel 1.1 Via drinkwater of mogelijk via drinkwater veroorzaakte epidemieën van cryptosporidiose.

plaats	jaar	aantal zieken	type zuivering	oorzaak	over- schrijding norm	N oöcysten/l in drinkwater	referentie
Braun Station, Texas, VS	1984	117 ¹ 2006 ²	gechloord bronwater	fecale verontreiniging bron	-	n.a.	d'Antonio <i>et al.</i> , 1985
Sheffield, UK	1986	49 ¹ 537 ²	geen (?)	hevige regenval, koeien waar- schijnlijke bron			Craun <i>et al.</i> , 1998
Carrollton, Georgia, VS	1987	13.000 ²	conventioneel	onzorgvuldige procesvoering	nee	0,63-2,2	Hayes <i>et al.</i> , 1989
Ayrshire, UK	1988	271 ¹ > 200 ²	conventioneel	nabesmetting met koeienmest	nee	0,04-2,8	Smith <i>et al.</i> , 1988
Swindon, Oxfordshire, UK	1989	516 ¹ 5.000 ²	conventioneel	hergebruik terugspoelwater; koeien in stroomgebied besmet	nee	0,002-77	Badenoch, 1990
South East Thames Region, UK	1989	65 ¹	?	?	?	-	Craun <i>et al.</i> , 1998
Loch Lomond, UK	1989	442 ¹	gechloord en gezeefd (23 µm) opp.water	nabesmetting?	-	0,008-0,4	Badenoch, 1990
North Humbershire, UK	1989	477 ¹	bekken, snelle en langzame zand- filtratie, chloring	bypass langzame zandfilters, hevige regenval	nee	n.a.	Badenoch, 1990
Isle of Thanet, UK	1990- 1991	47 ¹	?	bronwater aangevuld met opp.water, hevige regenval	-	n.a.	Joseph <i>et al.</i> , 1991
Berks County, Pa, VS	1991	551 ²	chloring	bron beïnvloed door opp.water	nee	-	Moore <i>et al.</i> , 1994
South West Thames Region, UK	1991	311 ¹	?	?	?	-	Craun <i>et al.</i> , 1998
South West Thames Region, UK	1991	15 ¹	?	?	?	-	Craun <i>et al.</i> , 1998
Northern Region, UK	1992	63 ¹	filtratie en chloring	?	?	-	Furtado <i>et al.</i> , 1998
North Western Region, UK	1992	12 ¹ 42 ²	chloring	mest gestrooid in de buurt van het reservoir	?	-	Furtado <i>et al.</i> , 1998
Medford, Ore., VS	1992	 > 3.000 ²	gechloord bronwater	bron beïnvloed door opp.water	nee	-	Moore <i>et al.</i> , 1994
Talent, Ore., VS	1992	 	filtratie	inadequate filtratie van rivier- water	nee	n.a.	Moore <i>et al.</i> , 1994
Torbay, South Western Region, UK	1992	108 ¹	bron: geen rivier: filtratie +?	verontreinigde bron of slechte filtratie van rivierwater			Craun <i>et al.</i> , 1998; Furtado <i>et al.</i> , 1998
Bradford, Yorkshire, UK	1992	125 ¹	langzame zand- filtratie, chloring	doorslag gereinigde filters, hevige regenval		positief	Craun <i>et al.</i> , 1998; Furtado <i>et al.</i> , 1998
North Warrington, Mersey, UK	1992- 1993	47 ¹ 1840 ²	bronwater, filtra- tie en chloring	verontreiniging met rioolwater en grazend vee			Craun <i>et al.</i> , 1998; Furtado <i>et al.</i> , 1998
Milwaukee, Wi, VS	1993	403.000 ²	conventioneel	inadequate zuivering	nee	0.007-013 ³	MacKenzie <i>et al.</i> , 1994
Yakima County, Wash., VS	1993	7 ¹	bronwater	bron beïnvloed door opp.water	-		Craun <i>et al.</i> , 1998

Tabel 1.1 (vervolg)

plaats	jaar	aantal zieken	type zuivering	oorzaak	over- schrijding norm	N oöcysten/l in drinkwater	referentie
Cook County, Minn., VS	1993	27 ¹	druk-gefiltreerd meerwater	fecale besmetting			Craun <i>et al.</i> , 1998
Clark County, Nev., VS	1993	103 ¹	gefiltreerd meerwater	geen			Craun <i>et al.</i> , 1998
Kitchener-Waterloo, Ont., Canada	1993	193 ¹ > 23900 (acute gas- troenteritis)	bronwater en opp.water	bron onder invloed van rivier, start filtratie rivierwater, veel smeltwater, lage dosis ozon			Craun <i>et al.</i> , 1998
Wessex, UK	1993	40 ¹	bronwater, chlooring	onbekend			Craun <i>et al.</i> , 1998; Furtado <i>et al.</i> , 1998
Northern Region, UK	1993	5 ¹ 43 ²	?	?	?	-	Craun <i>et al.</i> , 1998
Yorkshire, UK	1993	97 ¹	filtratie en chlooring	?(slechte ruwwaterkwaliteit)	?	0	Craun <i>et al.</i> , 1998; Furtado <i>et al.</i> , 1998
Wessex, UK	1993	27 ¹	filtratie en chlooring	?	?	0	Craun <i>et al.</i> , 1998; Furtado <i>et al.</i> , 1998
Walla Walla, Wash., VS	1994	134 ¹	bronwater	bron via irrigatiekanaal beïn- vloed door rioolwater			Craun <i>et al.</i> , 1998
Zuid Engeland, UK	1994	224 ¹	filtratie en chlooring	?		positief	Craun <i>et al.</i> , 1998; Furtado <i>et al.</i> , 1998
Trent, UK	1994	33 ¹	?	?	?	-	Craun <i>et al.</i> , 1998
Torbay, UK	1995	575 ¹	?	flocculatie omzeild		positief	Craun <i>et al.</i> , 1998; Furtado <i>et al.</i> , 1998
Wirral Peninsula, North West Region, UK	1996	52 ¹	?	geen onvolkomenheden	?	enkele	<i>Cryptosporidium</i> Capsule 4(7): 5
Collingwood, Ont., Canada	1996	39 ¹ 150 (verdacht)	ongefiltreerd meerwater	veel afwatering a.g.v. heftige storm	nee		Craun <i>et al.</i> , 1998
Emilia Romagna, Italië	1995	42 ¹	?	verontreinigde opslagtanks (4 en 37 oöcysten/l in sediment)			<i>Cryptosporidium</i> Capsule 3(3):5
Cranbrook, B.C., Canada	1996	29 ¹	ongefiltreerd meerwater	koeien in het stroomgebied			Craun <i>et al.</i> , 1998
Kelowna, B.C., Canada	1996	2000 ² 100 ¹	ongefiltreerd meerwater	positief voor oöcysten			
Eagle Harbour, Fl., USA	1996	4000 ² 77 ¹	?	koeien in het stroomgebied mogelijke oorzaak	?	0	Craun <i>et al.</i> , 1998
Ogose, Japan	1996	9000 ²	?	?	?	?	<i>Cryptosporidium</i> Capsule 2(8): 3
West Hertfordshire/ North London, UK	1997	345 ¹	gefiltreerd grondwater	?		0,3/l (max.)	<i>Cryptosporidium</i> Capsule 2(11): 3-4
First Nation community, Ont., Canada	1997	11 ¹ 100 ²	chlooring	?	?		Willocks <i>et al.</i> , 1998
South Thames, UK	1997	34 ¹	?	? in ruwwater oöcysten aange- troffen (5,2/l)	?	?	<i>Cryptosporidium</i> Capsule 2(7): 2-3
Te Aroha, Waikato, Nieuw Zeeland	1998	4 ¹	conventionele zuivering	filtratiestap gedeeltelijk buiten werking	?	0/l	<i>Cryptosporidium</i> Capsule 3(11): 8
Chilliwack, B.C., Canada	1998	13 ¹ 25-30 ²	grondwater aangevuld met bergbeekwater	?			<i>Cryptosporidium</i> Capsule 3(1): 4 en 3(2):9
Brushy Creek, Texas, VS	1998	32 ¹ 1300 ²	chlooring van infiltration gallery wells	verontreiniging met rioolwater			<i>Cryptosporidium</i> Capsule 3(7): 3
North Western Region, UK	1998	24 ¹	privé water- voorziening	oöcysten in de watertank			<i>Cryptosporidium</i> Capsule 3(10): 1-2
Marmaris, Turkije	1998	15 ¹	?	privé watervoorziening aange- sloten op het openbare water- systeem	?	?	<i>Cryptosporidium</i> Capsule 3(11): 8
Grasmere, North West Region, UK	1998	> 350 ¹	microzeven/ chlooring	positieve schapen in de buurt van Thirlmere Reservoir ?			<i>Cryptosporidium</i> Capsule 4(2):8

¹: bevestigde gevallen; ²: geschat aantal gevallen; ³: gemeten in gesmolten ijs; er zijn geen gegevens gepubliceerd van de concentraties in drinkwater.

n.a.: niet aangetoond

1.2 Veilig drinkwater: *total system approach*

Het optreden van de 'outbreaks' van *Cryptosporidium*- en *Giardia*-infecties via drinkwater in de Verenigde Staten, Groot-Brittannië en andere geïndustrialiseerde landen deed bij waterleidingbedrijven en de Rijksoverheid de vraag rijzen hoe veilig het drinkwater is ten aanzien van deze parasieten. De oorzaken van de 'outbreaks' in het buitenland beperkten zich niet tot situaties waarin de zuivering niet adequaat was of een bepaalde fase in de zuivering had gefaald. De 'outbreaks' traden ook op via ogenschijnlijk goed behandeld drinkwater. Bovendien sloeg de bewakingsmonitoring van de zuivering ten tijde van de 'outbreaks' geen alarm, omdat het gehalte bacteriën van de coligroep en de troebeling in het drinkwater binnen de normen waren gebleven (Fraun *et al.*, 1998).

Cryptosporidium en *Giardia* hebben een aantal eigenschappen die de overdracht via water vergemakkelijken:

- ze komen algemeen voor in oppervlaktewater;
- beide protozoa zijn niet gastheerspecifiek, ze komen zowel voor bij de mens als bij landbouwhuisdieren;
- ze zijn persistent in het milieu;
- ze zijn resistent tegen chemische desinfectie;
- ze zijn zeer infectieus: het binnenkrijgen van een enkele (oö)cyste geeft al een bepaald risico.

Deze combinatie van eigenschappen maakt dat *Cryptosporidium* en *Giardia* kritische parameters zijn voor de bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater. De Nederlandse en Vlaamse waterleidingbedrijven en de Nederlandse overheid zijn daarom een onderzoeksprogramma gestart om de veiligheid van het drinkwater vast te stellen.

Het optreden van 'outbreaks' via drinkwater dat is besmet met *Cryptosporidium* of *Giardia* maar voldoet aan de norm voor bacteriën van de coligroep en troebeling, geeft aan dat deze methode van kwaliteitsbewaking onvoldoende garanties biedt (zie bijvoorbeeld de grootschalige epidemie van Milwaukee in 1993; tabel 1.1). Een alternatief zou kunnen zijn het eindproduct (drinkwater) te monitoren op *Cryptosporidium* en *Giardia*. Dit alternatief wordt nu in Groot-Brittannië voorgeschreven. De gebruikte meetmethode voor beide parasieten is echter niet specifiek voor levende en menspathogene soorten. In sommige gevallen geven zelfs algen vals-positieve resultaten. Dit betekent dat bij de huidige detectiemethode veel vragen gesteld kunnen worden indien het gebruikt wordt voor drinkwatermonitoring: aantonen van dode of niet-pathogene *Cryptosporidium* of

Giardia (of zelfs vals-positieve deeltjes zoals bijvoorbeeld algen) in drinkwater brengt onrust teweeg, terwijl er geen directe gezondheidsrisico's aan zijn verbonden. De problemen die Sydney Water en de overheid in New South Wales hiermee hebben gehad geven dit duidelijk aan (McClennan, 1998).

De aanpak van de Nederlandse en Vlaamse waterleidingbedrijven is daarom niet gericht op eindproductbewaking, maar op een '*total system approach*'. Dit omvat:

1. kennis van de stroomgebieden en de bronnen van verontreiniging daarin;
2. kennis van de grondstofkwaliteit (besmettingsniveau, piekverontreinigingen);
3. kennis over de effectiviteit van de zuivering;
4. kennis over de bescherming van het distributienet.

Door het meten van de aanwezigheid van *Cryptosporidium* en *Giardia* bij de innamepunten, worden de kwaliteit van de grondstof en de fluctuaties daarin bepaald. De kwaliteit van de grondstof moet door de zuivering omgezet worden in veilig drinkwater. De hoge resistentie en infectiviteit van deze parasieten betekenen dat een nul-risico in de praktijk niet realiseerbaar is. De zuivering moet zodanig zijn ontworpen en bedreven worden, dat gezondheidsrisico's door deze ziekteverwekkers zo ver mogelijk, in ieder geval tot beneden het niveau waarop het risico verwaarloosbaar wordt, worden verlaagd.

Het Ministerie van VROM heeft samen met de Inspectie Milieuhygiëne een concept beleidstandpunt opgesteld, waarin is vastgesteld dat een risico op infectie via drinkwater maximaal 1 per 10.000 personen per jaar mag bedragen (gezondheidsrisico via drinkwater verwaarloosbaar). Ditzelfde risiconiveau was eerder al door de US Environmental Protection Agency geponeerd als verwaarloosbaar risiconiveau voor infecties via drinkwater (Regli *et al.*, 1991). In het voorstel voor de herziening van het Waterleidingbesluit is dit risiconiveau ook opgenomen (Versteegh *et al.*, 1999).

De dosis-respons relaties voor *Cryptosporidium* en *Giardia*, die zijn vastgesteld met menselijke vrijwilligers, zijn te extrapoleren naar de gehalten die maximaal in drinkwater aanwezig mogen zijn om te voldoen aan het risicocriterium (Teunis *et al.*, 1997), analoog aan de wijze waarop toxicologische normen tot stand komen.

Deze gehalten zijn weergegeven in tabel 1.2. Deze gehalten liggen ver beneden de detectiegrens van de protozoa-meetmethode.

Tabel 1.2 Maximaal toelaatbare gehalte (MTG) van *Cryptosporidium* en *Giardia* in drinkwater (Versteegh *et al.*, 1998).

	MTG (n/l)	MTG (afwezig in .. m ³)
<i>Cryptosporidium</i>	$2,2 \times 10^{-5}$	45
<i>Giardia</i>	$5,5 \times 10^{-6}$	180

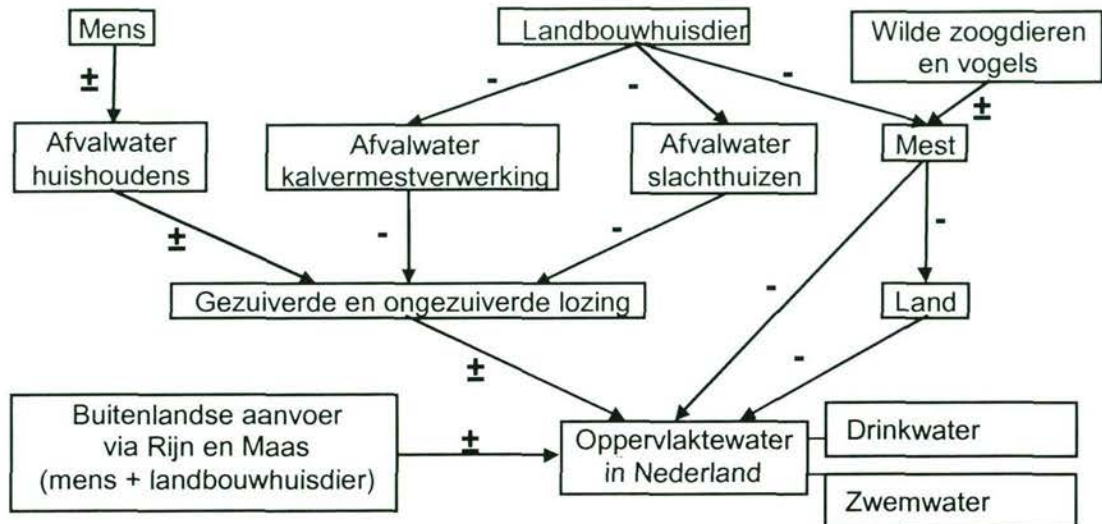
Om aan te kunnen tonen dat wordt voldaan aan deze richtwaarden, wordt op basis van het verschil tussen de protozoagehalten in de grondstof en de maximaal toelaatbare gehalten in drinkwater de benodigde verwijderingscapaciteit van de zuivering vastgesteld. Het zuiveringsrendement kan worden vastgesteld door onder *full-scale* condities de verwijdering van de van nature aanwezige anaërobe sporen of deeltjes te meten (Hijnen *et al.*, 1999) of door het uitvoeren van doseerexperimenten in praktijksituaties (Schijven *et al.*, 1999a, Hoogenboezem *et al.*, 1999) of proefinstallaties (Medema, *et al.*, 2000).

1.3 Bronnen van *Cryptosporidium* en *Giardia*

Dit samenwerkingsverband tussen RIZA, RIVM, RIWA, Kiwa en waterleidingbedrijven heeft zich gericht op de eerste twee stappen van de *total system approach*: het verkrijgen van kennis over de verontreinigingsbronnen (rioolwater en mest) en over het voorkomen in oppervlaktewater dat wordt gebruikt als zwemwater of voor de bereiding van drinkwater. De rationale hiervoor is dat veel van de 'outbreaks' via drinkwater in het buitenland zijn veroorzaakt door een piekbelasting van de zuivering (tabel 1.1). Het is daarom van belang om niet alleen het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* bij het innamepunt te monitoren, maar ook de verontreinigingsbronnen te kennen om piekverontreinigingen te kunnen zien aankomen. Daarnaast is het met de kennis over de verontreinigingsbronnen en hun relatieve belang wellicht mogelijk om maatregelen te nemen die de emissie van deze protozoa terugdringen. Een lagere belasting van het oppervlaktewater betekent in veel gevallen lagere zuiveringskosten en een lager risico voor zwemmers in oppervlaktewater. Om vast te stellen of en waar zinvol maatregelen kunnen worden genomen, is het van belang inzicht te krijgen in de relatieve bijdrage van de verschillende bronnen aan de verontreiniging van het oppervlaktewater bij een innamepunt.

De verontreiniging van oppervlaktewater wordt veroorzaakt door uitscheiding van (oö)cysten door besmette mensen en dieren. Dat betekent dat lozingen van, al dan niet gezuiverd, huishoudelijk afvalwater en mest van landbouwhuisdieren en wilde dieren potentiële bronnen zijn. Omdat Nederland de delta is van met name de Rijn en de Maas is ook de aanvoer van (oö)cysten vanuit het buitenland een mogelijk relevante bron

(Medema & Schijven, 2000). In figuur 1.1. zijn de routes van de belangrijkste bronnen van *Cryptosporidium* en *Giardia* naar het oppervlaktewater in Nederland schematisch weergegeven.



Figuur 1.1 Routes van belangrijke bronnen van *Cryptosporidium* en *Giardia* naar het oppervlaktewater in Nederland. -: bij aanvang van het onderzoek onbekende hoeveelheden (oö)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia* per jaar in het oppervlaktewater terechtkomen. ±: enige gegevens bekend, nog onvoldoende voor een betrouwbare schatting.

Eerdere studies hebben laten zien dat *Cryptosporidium* en *Giardia* zowel in ongezuiverd rioolwater als in het effluent van rioolwaterzuiveringsinstallaties (rwzi's) voorkomen (Medema *et al.*, 1997a; 1999). Ook bij Nederlandse runderen en paarden komt *Cryptosporidium* voor (De Leeuw *et al.*, 1984; Breukink, pers. meded.; Medema & Ketelaars, 1998). Over het voorkomen van *Giardia* bij landbouwhuisdieren in Nederland of België zijn geen gegevens bekend. Beide parasieten zijn in een scala aan landbouwhuisdieren aangetroffen (Erlandsen, 1994; Chalmers *et al.*, 1995; Casemore *et al.*, 1997; Majewska *et al.*, 1998; Bull *et al.*, 1998; Medema *et al.*, 2000; Sturdee *et al.*, 1999). *Cryptosporidium*-infecties komen vooral voor bij pasgeboren kalveren en lammeren (Casemore, 1997). De infectie is daar hevig en er worden hoge aantallen oöcysten uitgescheiden (circa 10^{6-7} per gram feces).

Ook de natuurlijke fauna kan besmet zijn met *Cryptosporidium* of *Giardia* (Medema *et al.*, 1999; Fayer *et al.*, 1997; Erlandsen, 1994) en via de feces oppervlaktewater besmetten.

Medema *et al.* (1996) hebben voor het Maasstroomgebied geïnventariseerd waar zich gezuiverde en ongezuiverde lozingen van rioolwater, slachthuizen en hoge dichtheden landbouwhuisdieren bevinden. Uit de combinatie van metingen en bronneninventarisatie lijkt voor de Maas naar voren te komen dat de lozingen van ongezuiverd rioolwater, die in het Belgische deel van het stroomgebied optreden, de belangrijkste bron van *Cryptosporidium* en *Giardia* in de Maas te zijn. Daadwerkelijke metingen in (on)gezuiverd rioolwater zijn nodig om de werkelijke rol van deze bron in te schatten. Ook metingen naar de frequentie van voorkomen van beide parasieten in dierlijke mest zijn van belang om een kwantitatieve inschatting van deze potentiële bron te kunnen maken.

1.4 Het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in oppervlaktewater

Uit een RIWA/RIVM-inventarisatiestudie van najaar 1995 is gebleken dat zowel Rijn als Maas relatief hoog belast zijn met de darmparasieten (Medema *et al.*, 1996). De gemiddelde gehalten van de beide parasieten lagen in beide rivieren in dezelfde orde van grootte. De maxima lagen in het Belgische deel van de Maas hoger dan in de Rijn. De gemiddelde en maximale *Giardia*-gehalten lagen hoger dan die van *Cryptosporidium*. De gehalten van *Cryptosporidium* en *Giardia* in Rijn en Maas zijn dermate hoog, dat een uitgebreide zuivering nodig is om deze pathogenen afdoende te verwijderen. De hoge gehalten en de resistentie tegen desinfectiemiddelen maken deze protozoa een kritische procesparameter voor de drinkwaterbereiding, met name voor directe zuivering. Piekmatige of hoge belastingen leveren het grootste risico op doorslag van de parasieten. Het kunnen voorspellen van piekbelastingen maakt het mogelijk om hierop te anticiperen.

Cryptosporidium en *Giardia* zullen ook voorkomen in oppervlaktewater dat gebruikt wordt als zwemwater. Om te bepalen of zwemmers een risico lopen op een infectie door de protozoa, is onderzoek op zwemwaterlocaties van belang.

1.5 Bepalingsmethode

De beschikbare methoden voor *Cryptosporidium* en *Giardia* hebben over het algemeen een laag en variabel rendement. Er zijn daarom in dit onderzoek frequent rendementsmetingen uitgevoerd. Alle gehalten aan *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten die in dit rapport zijn gerapporteerd, zijn gecorrigeerd voor het rendement van de meetmethode, evenals in het eerdere RIWA-onderzoeksrapport over *Cryptosporidium* en *Giardia* (Medema *et al.*, 1996). In hoofdstuk 2 staat beschreven op welke wijze deze rendementscorrectie is uitgevoerd. De gehanteerde rendementscorrectie maakt het moei-

lijk om een direct vergelijk met andere, in de literatuur gerapporteerde, gegevens over het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* te maken, tenzij de beschikking bestaat over het rendement van de gebruikte methoden en de wijze waarop dit is vastgesteld.

1.6 Doelen van het onderzoek

- 1) Kwantificeren van de relatieve bijdrage van de potentiële bronnen ongezuiverd rioolwater en afvalwater van slachthuizen, effluenten van rwzi's en mest van landbouwhuisdieren aan de totale *Cryptosporidium*- en *Giardia*-belasting van het oppervlaktewater.
- 2) Bepalen van de gehalten *Cryptosporidium* en *Giardia* op de plaatsen waar de grote rivieren de Maas en Rijn Nederland binnenstromen (Lobith en Eijsden), om de relatieve bijdrage vanuit het buitenland aan de totale emissie en verspreiding van protozoa in Nederland te schatten.
- 3) Bepalen van de verwijderingsefficiëntie van *Cryptosporidium* en *Giardia* in communale rwzi's.
- 4) Bepalen van de gehalten *Cryptosporidium* en *Giardia* in oppervlaktewater met als functie drinkwatervoorziening en zwemwater.
- 5) Vaststellen van de correlatie tussen *Cryptosporidium*- en *Giardia*-dichtheden en overige waterkwaliteitsparameters.

2 Methoden

2.1 Isolatie en detectie van *Cryptosporidium* en *Giardia*

2.1.1 Water

De bepaling van het aantal *Cryptosporidium*-oöcysten en het aantal *Giardia*-cysten in rioolwater, effluent, kalvermestverwerkings- en slachthuisafvalwater en oppervlaktewater is uitgevoerd volgens de methode zoals beschreven in Medema *et al.* (1996). Deze is geënt op de methode van LeChevallier (1991b) en is beschreven in ASTM (1991). In het kort was de werkwijze als volgt:

Het benodigde volume water (effluent circa 10 liter, oppervlaktewater circa 100 liter) is gefiltreerd over een gewonden polypropyleen kaarsfilter (Filterite, Amafilter, Alkmaar). Het gewonden polypropyleen van het kaarsfilter is opengesneden en met behulp van een stomacher gewassen in een gebufferde wasoplossing. De wasoplossing is vervolgens afgecentrifugeerd (10 minuten bij 1080 x g), waarna een deel (1 ml) van de verkregen pellet is gesonificeerd en gezuiverd door opbrengen van het monster op een Percoll-sucrose oplossing (specifieke dichtheid 1,10) en centrifugerend (10 minuten bij 1080 x g). De bovenstaande vloeistof (30 ml) inclusief de grenslaag is afgezogen en aangevuld met wasvloeistof tot 50 ml, waarna opnieuw is afgecentrifugeerd (10 minuten bij 1080 x g).

De resterende pellet is door opmengen met 50 ml wasvloeistof en opnieuw centrifugerend nogmaals gewassen, waarna de verkregen pellet (circa 1 ml totaalvolume) is afgefiltreerd over een 1,2 µm polycarbonaat membraanfilter, diameter 25 mm. Vervolgens is het preparaat aangekleurd door opbrengen van een mengsel van monoklonale antilichamen, specifiek voor *Cryptosporidium* en *Giardia* die zijn gelabeld met een fluoro-chroom (Cellabs *Cryptosporidium* and *Giardia* staining reagent, Cellabs Diagnostics, Brookvale, Australia) en incubatie bij 37 °C gedurende 30-45 minuten. Na wassen van het filter is dit overgebracht op een objectglas met DABCO-glycerol. Na opbrengen van het dekglas, is het preparaat ingeseald en microscopisch beoordeeld met behulp van een epifluorescentie-microscoop.

Rioolwater en afvalwater (1 l) zijn niet gefiltreerd, maar werden gelijk gecentrifugeerd (figuur 2.1, stap 7).

1. Snij kaarsfilter in lengte open.
2. Verdeel in 3 porties (binnen, midden, buiten).
3. Breng binnenste portie in 1 liter wasoplossing (PBS¹ + 0,1% SDS² + 0,1% Tween 80).
4. Homogeniseer 3 x 5 minuten in Stomacher.
5. Was in 1 liter schone wasoplossing, knijp gewassen filtermateriaal uit en gooi weg.
6. Herhaal stap 3 t/m 5 voor andere porties in zelfde oplossing, resulterend in 2 liter eluaat per monster.
7. Centrifugeer/was 2 x 10 minuten (1040 x g), weeg pellet.
8. Neem (gewogen) fracties van 1 ml, vul aan met PBS tot 20 ml.
9. Sonificeer 10 minuten in sonificatiebad.
10. Breng monster op 30 ml Percoll-sucrose (Y = 1,100) flotatiemedium.
11. Centrifugeer 10 minuten (1083 x g, zonder rem).
12. Pipetteer 30 ml supernatant af, gooi pellet weg.
13. Vul aan met PBS tot 50 ml en centrifugeer 10 minuten (1083 x g).
14. Zuig bovenste 40 ml af, resuspendeer pellet, herhaal stap 13.
15. Zuig bovenste 48 ml af, resuspendeer pellet.
16. Filtreer door 1,2 µm 25 mm filter.
17. Breng gelabelde monoklonalen (Shield, Cellabs) op filter, incubeer 30-45 minuten bij 37°C, donker.
18. Was met PBS, breng filter op objectglas, mount met DABCO³-glycerol.

Figuur 2.1 Isolatieprocedure voor *Cryptosporidium* en *Giardia* uit water (volgens LeChevallier *et al.*, 1991b). ¹: phosphate buffered saline, ²: sodium dodecyl sulfate, ³: 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane.

In de monsters die werden onderzocht door Kiwa (alle innamepunten in oppervlaktewater) en RIVM (Kralingseveer, rioolwater België) is gebruik gemaakt van de FACSsort flowcytometer. Hierbij werd de pellet na de Percoll-sucrose flotatiestap niet over een filter gehaald, maar werd aan de pellet monoklonaal antilichaam met FITC toegevoegd en bij 4 °C overnacht gekleurd. Deze aangekleurde pellet werd over een 35 µm filter gefiltreerd om verstopping van de flowcel te voorkomen. Het filtraat werd door de FACSsort gehaald. De instellingen van de FACSsort zijn in eerder onderzoek geoptimaliseerd voor de detectie van protozoa (Medema *et al.*, 1998). De deeltjes die door de FACSsort werden gesorteerd vanuit het monster zijn op een 1,2 µm, 25 mm polycarbonaat filter gebracht en van dit filter is een microscopisch preparaat gemaakt volgens de bovenbeschreven werkwijze.

Om de gevoeligheid van de bepaling zo ver mogelijk te vergroten, werd een zo groot mogelijk deel van de pellet opgewerkt met flotatie (1 ml pellet per flotatiebuis). De geflooteerde pellets zijn samengevoegd, gekleurd en door de FACSsort gezuiverd, zodat per monster 1 preparaat ontstond. Ondanks het grotere monstervolume resulteerde de zuivering in de FACSsort in schone preparaten, waarin het voorkomen van (oö)cysten goed te beoordelen was.

Bij monsters die zowel direct als via de flowcytometer zijn onderzocht is het gehalte aan protozoa berekend door het gemeten aantal (oö)cysten in het directe monster en in het monster dat is opgewerkt met de flowcytometer op te tellen en te delen door het totaal onderzochte volume.

2.1.2 Mest

Aan de monsters mest werd een zelfde volume 2,5% kaliumbichromaat toegevoegd ter conservering. Van elke serie mengmonsters van mest van vleeskalveren, melkkoeien, vleeskuikens en legkippen werd 25 µl genomen en samengevoegd tot één mengmonster voor onderzoek op *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten. Indien in een dergelijk mengmonster *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten werden aangetoond, dan werden de afzonderlijke mengmonsters onderzocht.

Voor microscopisch onderzoek op *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten werd in een Eppendorf buisje aan 25 µl van deze geconserveerde mest 25 µl FITC Mab (Cellabs *Cryptosporidium* and *Giardia* staining reagent, Cellabs Diagnostics, Brookvale, Australia) toegevoegd. Het geheel werd 30 minuten geïncubeerd bij 37 °C. Hiervan werd 25 µl op een objectglaasje met 0,28 cm² uitsparingen (Detect IF *Cryptosporidium* specimen slides, Northumbria Biologicals Ltd, UK, nummer 1121) gedroogd aan de lucht. Daarna werd hierop een druppel Dabco/glycerol gepipetteerd en werd het preparaat afgedekt met een dekglasje. Dabco is 1,4-diazabicyclo(2,2,2)octaan (Aldrich-Sigma D2780-2), Dabco/glycerol medium is 2,0 g Dabco, 40 ml PBS, 60 ml glycerol. De randen om dit dekglasje werden dichtgeplakt met nagellak. Dit preparaat bevat dan 6 µl van het oorspronkelijke monster mest. De detectiegrens ligt dus op 1 per 6 µl (< 0,17 (oö)cysten per kg mest). *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten werden geteld onder een epi-fluorescentiemicroscoop (Zeiss axioskop), voorzien van een FITC-filtercombinatie, bij 250 maal vergroting. Een preparaat van 0,28 cm² heeft 50 beeldvelden. Deze werden alle geteld. Wanneer er echter meer dan 50 (oö)cysten per beeldveld aanwezig waren, werden maar vijf beeldvelden geteld en werd het totaal van deze vijf beeldvelden met tien vermenigvuldigd.

Monsters kalvergier en monsters ingedikte mest van het kalvermestverwerkingsbedrijf werden op dezelfde wijze onderzocht op *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten als hierboven omschreven voor de monsters mest van landbouwhuisdieren, echter zonder toevoeging van kaliumbichromaat, omdat ze direct werden onderzocht.

Het soortelijk gewicht van een aantal monsters mest per diersoort werd bepaald door volumemetingen en weging. De dichtheid van de mest van vleeskalveren, melkkoeien en vleeskuikens bedroeg 1 kg/l en die van legkippen 1,1 kg/l. In deze rapportage worden alle gehalten in mest als aantal per kg uitgedrukt.

Aanvullend zijn van 48 monsters verse mest van vleeskalveren (1-3 per leeftijdsweek) de gehalten aan droge stof bepaald door de monsters gedurende enkele dagen bij 105 °C te drogen en vervolgens het restgewicht te bepalen.

2.1.3 Microscopische beoordeling

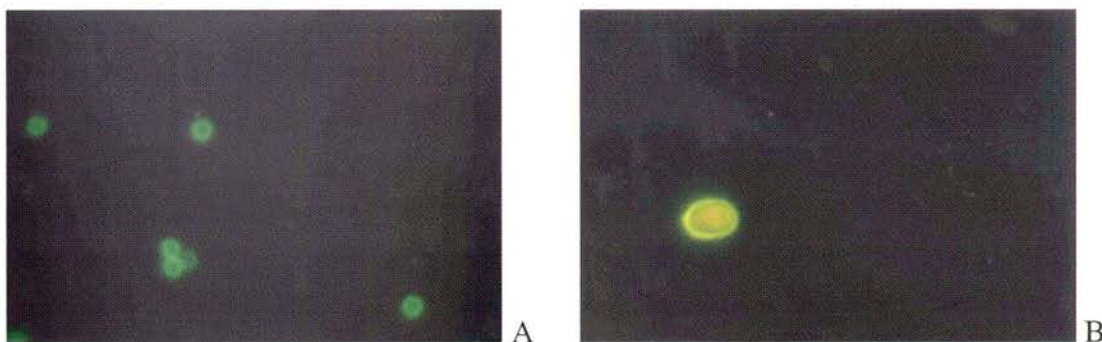
De volgende karakteristieke kenmerken voor (oö-)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn gehanteerd:

Cryptosporidium:

Ronde tot ovaalronde objecten met een doorsnede van 3-7 µm, met appelgroene fluorescentie en heldergroen fluorescerende rand.

Giardia:

Ovaalronde objecten met een lengte van 8-18 µm en een breedte van 5-15 µm, met appelgroene fluorescentie en heldergroen fluorescerende rand.



Figuur 2.2 *Cryptosporidium*-oöcysten (A) en *Giardia*-cyste (B).

Er is tevens gekeken naar het fluorescentiebeeld onder UV en groene belichting om te controleren op autofluorescentie en het fluorescentiebeeld met de achtergrondkleurstof van de monoklonale antilichamen (Evans' Blue). Als hier structuren of fluorescentiepatronen werden waargenomen die niet typisch waren voor (oö)cysten, werd het betreffende deeltje niet geteld.

2.2 Microbiologisch onderzoek

Thermotolerante bacteriën van de coligroep en *E. coli* zijn bepaald volgens NEN 6570, fecale streptococci volgens NEN 6274, sporen van sulfietreducerende clostridia volgens NEN 6567, sporen van *Clostridium perfringens* volgens Bisson & Cabelli (1979), met de wijziging van Armon & Payment (1988), F-specifieke RNA-fagen volgens ISO 10705-1 en reo- en enterovirussen werden bepaald door incubatie van de monsters op BGM-cellen volgens van Olphen *et al.* (1984).

2.3 Fysisch en chemisch onderzoek

Temperatuur is bepaald volgens NEN 6414, pH volgens NEN 6411, troebelheid volgens ISO 7027 of Kiwa 1-03-1, zwevende stof volgens NEN 6484 of NEN 6621, Kjeldahl-N volgens NEN 6481 of NEN 6646, ammonium volgens NEN 6472 of NEN 6646, nitraat volgens NEN-EN-ISO 10304-1 of NEN 6640 of NEN 6652, nitriet volgens NEN 6653, chlorofyl-a volgens NEN 6520, BZV volgens NEN 6634, CZV volgens NEN 6633 en chloride volgens NEN 6476. Debietgegevens werden verkregen uit Aqualarm (RIZA).

2.4 Kwaliteitsborging

2.4.1 Protozoa

Voor het bepalen van het rendement van de meetmethode voor protozoa zijn extra monsters kunstmatig besmet met een bekende hoeveelheid cysten en oöcysten. Het percentage dat van deze (oö)cysten is teruggevonden, gecorrigeerd voor het actuele niveau (oö)cysten in het monster, is het rendement van de meetmethode. De suspensies die zijn gebruikt om de monsters te besmetten zijn verdund vanuit de geconcentreerde suspensies van *Giardia intestinalis* CH3, een stam geïsoleerd uit de mens en aangehouden in woestijnratten (PRL Dynagenics, Phoenix, USA en Waterborne, New Orleans, USA) en *Cryptosporidium parvum*, geïsoleerd uit van nature besmette runderen (Nationaal Instituut voor Diergeneeskundig Onderzoek in België). De verdunningen werden centraal gemaakt (Kiwa) en de suspensies werden verdeeld over RIZA, RIVM en Kiwa. Vóór het rondsturen werd het gehalte (oö)cysten in deze suspensie driemaal bepaald door het uitvoeren van een telling van een klein deel (100 µl) van deze suspensie (volgens de methode beschreven in paragraaf 2.1.1). Gedurende het gebruik zijn meerdere tellingen van elke spike-suspensie uitgevoerd. De variatiecoëfficiënt voor deze tellingen was hoog voor zowel *Cryptosporidium* als voor *Giardia*, variërend van 72 tot 83%. Om de concentratie

van de spike-suspensie te bepalen, is gebruik gemaakt van het geometrisch gemiddelde van alle (Kiwa-) tellingen van die suspensie. Deze concentraties zijn gebruikt voor het berekenen van het rendement van de meetmethode bij RIVM en Kiwa en voor de spike-monsters waarbij RIZA de suspensie niet zelf heeft geteld.

Bij (een deel van) de monsters werd een extra monster genomen dat direct in het monster (ruw en bezonken rioolwater) of in de aanvoerslang naar het kaarsfilter kunstmatig werd besmet met een bekende hoeveelheid (ongeveer 1000) *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten (zgn. spike-monsters). Deze monsters werden vervolgens op dezelfde wijze behandeld als de normale monsters. Deze monsters kunnen worden beschouwd als positieve controles, terwijl hiermee tevens het rendement van de totale bepaling wordt gemeten. De gehanteerde werkwijze was als volgt:

Tegelijk met het gebruikelijke monster is een extra monster genomen waarbij gedurende de monsterneming, verspreid over de tijd (in vier porties), een suspensie met een bekende hoeveelheid (oö-)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia* is toegevoegd door injectie in de aanvoerslang tussen tappunt en kaarsfilter. De verdere verwerking en analyse was gelijk aan die voor de normale monsters. Het aantal toegevoegde (oö)cysten werd bepaald in de overgebleven suspensie na het spiken, door het te filtreren over een 1,2 µm membraanfilter en te kleuren en tellen volgens bovenstaande procedure.

Voor afvalwater van de slachthuizen en het kalvermestverwerkingsbedrijf, het rioolwater uit België en het ruwe en bezonken rioolwater en effluent van rwzi Kralingseveer werd bij elk monster een spike-monster meegenomen. Voor alle overige locaties (oppervlaktewater, rwzi Westpoort) was de spike-frequentie circa 1 op de 4 monsters.

Het rendement van *Cryptosporidium* en *Giardia* werd berekend met behulp van de volgende formule:

$$\frac{N_{\text{spike-monster}} - N_{\text{monster}}}{N_{\text{toegevoegd}}} \cdot \frac{1}{V_{\text{spike-monster}}}$$

Hierbij is N het aantal (oö)cysten en V het onderzochte monstervolume.

Uit eerder onderzoek en uit de literatuur is bekend dat de opbrengst van de meetmethode laag is (LeChevallier *et al.*, 1991c; Clancy *et al.*, 1994; Ketelaars *et al.*, 1995, in prep.; Rose *et al.*, 1997). Ook is de methode niet specifiek voor menspathogene soorten *Cryptosporidium* en *Giardia* en levert zij geen informatie over de levensvatbaarheid van de (oö)cysten (Rose *et al.*, 1997).

Als extra punt van kwaliteitsborging is de werking van het fluorescerend label gecontroleerd door bij iedere meetserie een extra preparaat mee te nemen als positieve controle. Hiertoe is een hoeveelheid stockoplossing van (oö)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia* afgefiltreerd over een 1,2 µm membraanfilter en op dezelfde wijze geïncubeerd met het label als de overige preparaten. Vervolgens is van dit preparaat de mate van fluorescentie van de (oö)cysten beoordeeld. Dit is tevens een controle van de instellingen van de fluorescentiemicroscopie.

Naast de interne kwaliteitsborging participeren Kiwa, RIZA en RIVM in een internationaal ringonderzoek, dat wordt georganiseerd door de Public Health Laboratory Services in Engeland. Daarbij worden waterconcentraten met een bekende hoeveelheid *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten rondgezonden aan circa 35 laboratoria in Europa. De resultaten van de ringonderzoeken in de onderzoeksperiode (mei 1997-juni 1998) zijn in het databoek opgenomen. Daaruit blijkt dat de Nederlandse laboratoria in de meeste gevallen goed bij de target scoorden. Daar waar de target nul is, werd in de meeste gevallen ook nul aangetroffen; in een aantal gevallen is daarin een lage telling (1 à 2) gerapporteerd. Dit is in dit ringonderzoek zeker geen uitzondering; het percentage laboratoria dat bij een monster waaraan geen (oö)cysten zijn toegevoegd een positieve telling rapporteert, ligt op 5-20%.

2.4.2 *Clostridium perfringens*

Omdat de bepaling van *Clostridium perfringens* voor de analyserende laboratoria (behalve RIVM) een nieuwe analyse was, is tweemaal een ringonderzoek georganiseerd. Algemene conclusie van deze ringonderzoeken is dat de laboratoria in de meeste gevallen vergelijkbare resultaten rapporteerden. Kritische punten in de analyse zijn de samenstelling en kwaliteit van het mCP-medium, de manier van anaëroob kweken en de incubatietemperatuur.

Als gevolg van afwijkende resultaten in de ringonderzoeken zijn enkele resultaten niet gebruikt.

2.4.3 Virussen

Bij de analyse werd een onbeënte BGM-kweek en een BGM-kweek met alleen verdunningsmedium (HBSP) meegenomen. Als positieve controle voor de reovirussen werd reovirus 3 gebruikt, voor enterovirussen Coxsackie B4. Vier- tot zesmaal per jaar werd aan de PHLS-ringonderzoeken deelgenomen, met goede resultaten.

2.4.4 Overige parameters

Alle deelnemende laboratoria zijn Sterlab-geaccrediteerd. Hierdoor is de kwaliteitsborging verzekerd.

2.5 Statistische analyse

2.5.1 Beschrijvende statistiek meetgegevens

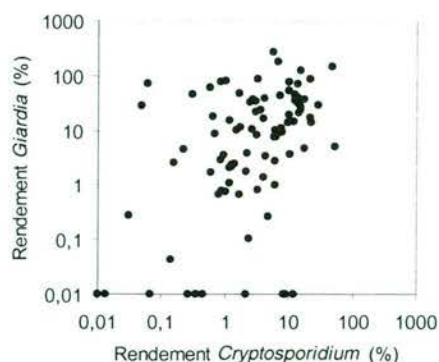
Van elk monsterpunt is beschrijvende statistiek uitgevoerd met Microsoft Excel97. Berekend zijn daarbij het aantal waarnemingen, het rekenkundig gemiddelde en de standaardafwijking, het geometrisch gemiddelde, het minimum en maximum en de 10-, 50- en 90-percentielen. Voor de berekening van de geometrisch gemiddelden zijn nulwaarden vervangen door de onderste analysegrens van de meetmethode voor het betreffende monster.

2.5.2 Rendement meetmethode protozoa in rioolwater, effluent en oppervlaktewater

De individuele gegevens van de rendementsmetingen zijn opgenomen in het databoek. Er bestond een significante correlatie tussen het rendement voor beide protozoa, maar met een grote bandbreedte (figuur 2.2). Deze correlatie is een indicatie dat de variatie in het rendement van de meetmethode niet primair afhankelijk is van de protozoa, maar van andere factoren.

Er is een aantal factoren aan te geven dat mogelijk van invloed kan zijn op het rendement van de meetmethode:

- matrix grof (rioolwater, effluent, oppervlaktewater);
- matrix fijn (troebeling, chlorofyl-a, oppervlaktewaterlocatie);
- laboratorium-effecten.



Figuur 2.2 Relatie tussen het rendement van de detectiemethode van *Cryptosporidium* vs. *Giardia*.

De rendementsgegevens zijn geclusterd naar laboratorium en matrix in tabel 2.1. Daarin is het geometrisch gemiddelde van de rendementsgegevens weergegeven. De verschillen die gevonden zijn tussen de laboratoria en matrices zijn getoetst in een serie van eenvoudige variantie-analyses ($\alpha = 0,95$) met behulp van Microsoft Excel97, vanwege het ongelijke aantal waarnemingen per serie. De rendementsgegevens zijn daarvoor log-getransformeerd om een normale verdeling te benaderen.

Tabel 2.1 Rendementsgegevens van de analyserende laboratoria per laboratorium en matrix.

deelverzameling		<i>Cryptosporidium</i>		<i>Giardia</i>	
		aantal rendements- metingen	geometrisch gemiddelde rendement (%)	aantal rendements- metingen	geometrisch gemiddelde rendement (%)
RIZA		19	1,9	18	18
RIVM		56	6,0	47	10
RIVM*		44	3,6	22	14
Kiwa		24	1,9	24	16
oppervlaktewater	Kiwa	24	1,9	24	16
	RIZA	9	2,1	9	13
	totaal	33	1,9	33	15
rioolwater	RIZA	6	1,8	6	25
	RIVM	29	5,0	22	14
	totaal	35		28	
effluent	RIVM	15	2,0	14	1,0
	RIZA	4	1,0	3	23
	totaal	19	1,9	17	2,0
slachthuisafvalwater	RIVM	12	38	11	68
totaal		99	3,6	89	12,6
totaal*		87	2,6	64	15,6

* Zonder slachthuisafvalwater en effluent *Giardia* RIVM.

Uit deze variantie-analyse (tabel 2.2) blijkt, dat voor het *Cryptosporidium*-rendement geen significante verschillen tussen laboratoria en monstermatrices aantoonbaar waren. Ook het *Cryptosporidium*-rendement op de verschillende oppervlaktewaterlocaties vertoonde geen verschillen. Het aantal replica's dat hier beschikbaar was, was echter gering (2-4). Voor het *Giardia*-rendement werden voor de matrices rioolwater en oppervlaktewater geen verschillen tussen laboratoria, matrices of oppervlaktewaterlocaties gevonden. Voor het effluent werden wel verschillen gevonden tussen de laboratoria, waarbij het rendement van RIZA beduidend hoger was dan van RIVM (tabel 2.2).

Tabel 2.2 Variantie-analyse ter toetsing van overeenkomst rendement tussen laboratoria en matrices.

factor	hypothese	getoetst met	p-waarde		hypothese aangenomen		conclusie
			<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	
parasiet	geen verschil in rendement tussen:						
	<i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i>	alle monsters	0,00015	0,00015	nee	nee	rendement <i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i> afzonderlijk beschrijven
lab	RIZA en Kiwa	monsters opp.water	0,82	0,76	ja	ja	rendementen opp.water RIZA en Kiwa samenvoegen
	RIZA en RIVM	monsters rioolwater	0,22	0,43	ja	ja	rendementen rioolwater RIZA en RIVM samenvoegen
	RIZA en RIVM	monsters effluent	0,96	0,013	ja	nee	rendement <i>Giardia</i> effluent RIVM en RIZA apart beschrijven, <i>Cryptosporidium</i> samenvoegen
	RIZA, RIVM en Kiwa	alle monsters, m.u.v. slachthuisafvalwater en effluent <i>Giardia</i>	0,19	0,89	ja	ja	rendement alle monsters, m.u.v. slachthuisafvalwater en effluent <i>Giardia</i> samenvoegen
matrix	rioolwater en slachthuisafvalwater	RIVM-monsters	0,0022	0,0073	nee	nee	rendement slachthuisafvalwater en rioolwater afzonderlijk beschrijven
	opp.water en effluent	alle monsters opp.water en effluent	0,96	0,00019	ja	nee	rendement <i>Giardia</i> in effluent apart beschrijven
	opp.water en effluent	alle monsters opp.water en monster effluent <i>Giardia</i> RIVM	0,96	0,000006	ja	nee	rendementen RIVM van <i>Giardia</i> in effluent apart beschrijven van opp.water
	opp.water en effluent	alle monsters opp.water en monster effluent <i>Giardia</i> RIZA	0,96	0,65	ja	ja	rendementen effluent RIZA en opp.water samenvoegen
	opp.water en rioolwater	alle monsters opp.water en rioolwater	0,057	0,98	ja	ja	rendementen opp.water en rioolwater samenvoegen
	rioolwater en effluent	alle monsters rioolwater en effluent	0,12	0,00058	ja	nee	rendement <i>Giardia</i> in effluent apart beschrijven
	rioolwater en effluent	alle monsters rioolwater en monsters effluent RIVM	0,12	0,000039	ja	nee	rendementen RIVM van <i>Giardia</i> in effluent apart beschrijven van rioolwater
	rioolwater en effluent	alle monsters rioolwater en monsters effluent RIZA	0,12	0,67	ja	ja	rendementen effluent RIZA en rioolwater samenvoegen
	opp.waterlocaties	Kiwa-monsters (alle innamepunten)	0,58	0,81	ja	ja	rendementen opp.water Kiwa samenvoegen
	opp.waterlocaties	RIZA-monsters (Lobith vs Eijsden)	0,83	0,65	ja	ja	rendementen opp.water RIZA samenvoegen
locatie	rioolwaterlocaties	RIVM-monsters (Kralingseveer vs Luik)	0,7	0,43	ja	ja	rendementen rioolwater RIVM samenvoegen
	slachthuisafvalwaterlocaties	RIVM-monsters (alle slachthuizen)	0,92	0,51	ja	ja	rendementen slachthuisafvalwaters samenvoegen

Dit lage *Giardia*-rendement werkt door in de aangetoonde verschillen tussen het rendement in de matrices effluent en rioolwater, effluent en oppervlaktewater en effluent, rioolwater en oppervlaktewater en het *Giardia*-rendement van de laboratoria voor rioolwater en effluent samen. Er was hier sprake van een koppeling tussen laboratorium- en

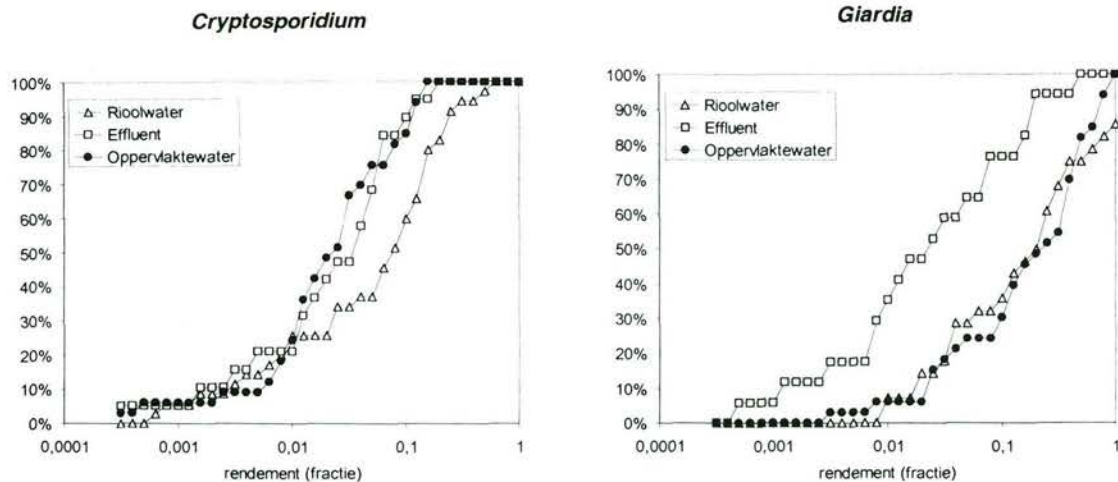
matrix-effecten, maar er is niet duidelijk aan te geven wat het relatief lage *Giardia*-rendement in de effluenten bij RIVM heeft veroorzaakt. Opvallend is dat de rendementen voor *Cryptosporidium* in de effluenten geen verschillen tussen de laboratoria of met de andere matrices lieten zien.

Hoewel de rendementsverschillen tussen de verschillende innamepunten in oppervlaktewater niet significant waren (mogelijk mede door het lage aantal replica's), was het rendement voor beide protozoa relatief hoog in het water van het Albertkanaal, Lekkanaal en van de Afgedamde Maas en relatief laag in de monsters van het IJsselmeer, het Twentekanaal en van het Lateraal kanaal (tabel 2.3).

Tabel 2.3 Rendement (%) van de detectiemethode voor *Cryptosporidium* en *Giardia* bij innamepunten voor de drinkwaterbereiding.

locatie	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
Twentekanaal	0,40	9,6
IJsselmeer	0,83	6,2
Lateraal kanaal	0,93	6,5
Keizersveer	2,1	20
Tailfer	2,1	15
Amsterdam-Rijnkanaal	2,8	36
Afgedamde Maas	4,7	33
Lekkanaal	4,7	32
Albertkanaal	4,9	22

Om een indruk te krijgen van de invloed van de matrix op de verdeling van het rendement zijn cumulatieve frequentieverdelingen gemaakt van de (log-getransformeerde) rendementsgegevens voor oppervlaktewater, voor rwzi's (rioolwater en effluent) en voor het totaal aan rendementsgegevens (figuur 2.3). Uit deze figuur blijkt dat de verdeling van de rendementen voor zowel *Cryptosporidium* als voor *Giardia* voor de afzonderlijke matrices en voor het totaal sterk overeenkomen, behalve voor *Giardia* in effluent. Uit deze figuur blijkt ook dat de verdeling scheef is, de 'staart' naar de lage rendementen is duidelijk langer dan naar de hoge rendementen. Dat komt ook tot uitdrukking in het verschil tussen de mediaan en de 10- en 90-percentielen: het verschil tussen mediaan en p90 is een factor 2,9-7,3, terwijl het verschil tussen mediaan en p10 een factor 4,1-25 is. Dat betekent dat de onzekerheid van de concentraties die gecorrigeerd zijn voor het rendement, groter is naar de hogere gehalten dan naar de lagere gehalten.



Figuur 2.3 Cumulatieve frequentieverdeling van de rendementen (als fractie) voor *Cryptosporidium* en *Giardia* in verschillende matrices.

Uitgezonderd de rendementen die RIVM gevonden heeft voor beide protozoa in slachthuisafvalwater en voor *Giardia* in effluent (zie paragraaf 3.6 voor de uiteindelijke keuze van het rendement voor effluent), waren er geen duidelijke laboratorium- of matrix-effecten aantoonbaar. Daarom zijn alle rendementsgegevens beschouwd als behorend tot één populatie, met uitzondering van de genoemde rendementen van RIVM. Voor de correctie van de gemeten gehalten in rioolwater, effluent en oppervlaktewater is dan ook uitgegaan van een geometrisch gemiddelde rendement in die monsters voor *Cryptosporidium* van 2,6% en voor *Giardia* van 15,6%.

Voor slachthuisafvalwater is uitgegaan van het geometrisch gemiddelde rendement van 38% voor *Cryptosporidium* en 68% voor *Giardia* (tabel 2.4).

Tabel 2.4 De toegepaste rendementen (%) in dit rapport.

	rioolwater, effluent, oppervlaktewater	slachthuisafvalwater
<i>Cryptosporidium</i>	2,6	38
<i>Giardia</i>	15,6	68

3 *Cryptosporidium* en *Giardia* in rioolwater

3.1 Inleiding

In een aantal binnen- en buitenlandse onderzoeken zijn *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten in al dan niet gezuiverd stedelijk rioolwater aangetroffen.

In ruw rioolwater worden *Giardia*-cysten bijna altijd aangetroffen, terwijl *Cryptosporidium*-oöcysten niet in alle effluentmonsters aantoonbaar zijn. Het aantal cysten is in ruw rioolwater altijd hoger dan het aantal oöcysten. De aantallen van beide protozoa kunnen tussen de locaties, maar ook in de tijd sterk verschillen.

In een onderzoek aan 11 rioolwaterzuiveringsinrichtingen (rwzi's) in de Verenigde Staten (Jakubowski *et al.*, 1991; Sykora *et al.*, 1991) werden in ruw rioolwater bij 9 van de 11 rwzi's *Giardia*-cysten in de range van 4-4400 per liter aangetroffen. Bij de twee andere rwzi's was deze range met 1600-14000 cysten/l aanzienlijk hoger. Een verklaring voor dit verschil is niet gegeven. Ook werd er een seizoenseffect waargenomen. Het aantal *Giardia*-cysten was in de maanden september-januari meer dan verdubbeld (2500 cysten/l) ten opzichte van de overige maanden (1000 cysten/l). In het effluent van deze 11 rwzi's werden in ongeveer de helft van het aantal monsters *Giardia*-cysten aangetoond tot maximaal 16 per liter.

Door Rose *et al.* (1986) en Madore *et al.* (1987) wordt een gemiddeld aantal van 5300 *Cryptosporidium*-oöcysten per liter in ruw rioolwater gerapporteerd en een bereik van 850-14000 oöcysten per liter. Het aantal monsters ($n = 4$) was echter gering. In een onderzoek door Rose *et al.* (1996) zijn op de rwzi St. Petersburg Florida - d.i. een geavanceerde rwzi voor hergebruik van het gezuiverde rioolwater - gedurende 1 jaar maandelijks monsters genomen van het onbehandelde influent en het biologisch gezuiverde effluent. Naast de bepaling van beide protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia* is ook gekeken naar fysische en chemische parameters en andere micro-organismen (humane enterovirussen, thermotolerante bacteriën van de coligroep, colifagen). De meetresultaten uit dit onderzoek zijn weergegeven in tabel 3.1. Het verwijderingsrendement bedroeg voor *Cryptosporidium* 91% (1,0 log) en voor *Giardia* 98% (1,6 log). Ook voor de overige micro-organismen en voor de aanvullende zuiveringstechnieken zandfiltratie en desinfectie door middel van chloorbleekloog zijn meetresultaten en verwijderingsrendementen gegeven.

Tabel 3.1 Aantallen *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten (aantal/100 l) en de zuiveringsefficiëntie in de rwzi St. Petersburg Florida (naar Rose *et al.*, 1996).

	<i>Cryptosporidium</i>		<i>Giardia</i>	
	influent	effluent	influent	effluent
% positief	67	42	100	83
rekenkundig gemiddelde	$1,5 \pm 1,8 \times 10^3$	$1,4 \pm 1,7 \times 10^2$	$6,9 \pm 3,7 \times 10^3$	$4,4 \pm 4,7 \times 10^2$
geometrisch gemiddelde	$3,7 \times 10^2$	$3,5 \times 10^1$	$3,9 \times 10^3$	$8,8 \times 10^1$
maximum	$1,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$
minimum	$< 6,1 \times 10^1$	$2,5 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	$1,4 \times 10^1$

Recent zijn door Nasser & Molgen (1998) voor Israël en door Chauret *et al.* (1999) voor Canada aantallen *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten in stedelijk rioolwater en rwzi's bepaald. In Israël werden maandelijks op één rwzi gedurende één jaar de hoeveelheden *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten gemeten. Het aantal *Cryptosporidium*-oöcysten varieerde van 300-7700 per liter en de *Giardia*-cysten van 18000-28000 per liter. Dit is aanzienlijk hoger dan de aantallen vermeld in tabel 3.1. Het zuiveringsrendement van 93 en 99% voor respectievelijk *Cryptosporidium* en *Giardia* resulteerden in het effluent tot aantallen van 50 oöcysten/l en 150 cysten/l. Bij eenmalige metingen in 11 andere steden in Israël werden vergelijkbare aantallen protozoa aangetroffen met een enkele hoge waarde voor *Giardia*.

In het Canadese onderzoek van Chauret *et al.* (1999) wordt aan de hand van 4 monsters een vergelijking gemaakt tussen de verwijdering van *Cryptosporidium* en *Giardia* in een rwzi met andere microbiologische parameters. Dit onderzoek is uitgevoerd op de rwzi Ottawa-Carleton die bestaat uit een voorbezinking, een actief-slib-gedeelte en nabezinking, gevolgd door desinfectie met behulp van chloorbleekloog. Onduidelijk in deze referentie is wat wordt bedoeld met 'behandeld afvalwater'. De aantallen *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten in het behandelde afvalwater waren met respectievelijk 50 en 80 in dezelfde orde van grootte als de vermelde waarden in tabel 3.1.

Ook in Nederland is eerder onderzoek verricht naar de aanwezigheid van *Cryptosporidium* en *Giardia* in stedelijk afvalwater of rwzi's (Medema *et al.*, 2000). In de jaren 1994/1995 zijn metingen uitgevoerd naar het voorkomen van deze protozoa in influent en effluent van een vijftal rwzi's. Er zijn per rwzi 6-7 bemonsteringen uitgevoerd. De gehalten *Cryptosporidium* in het bezonken rioolwater waren laag en verschillende malen werden geen oöcysten aangetoond. In de maand september werden op drie van de vijf rwzi's zeer hoge aantallen van $1,7 \times 10^3$ - $5,4 \times 10^3$ gemeten. De mediane waarde van de

aantallen *Cryptosporidium* in het influent bedroeg 17 oöcysten/l en in het gezuiverde effluent 0,04 oöcysten/l.

De aantallen *Giardia*-cysten waren hoger. De mediane waarde bedroeg 200 cysten/l in het bezonken rioolwater en in het gezuiverde effluent 250 cysten/l. Het verschil in het rendement van de *Giardia*-bepaling werd verantwoordelijk gehouden voor deze onwaarschijnlijke getallen. Ook de volgens Jakubowski *et al.* (1991) en Sykora *et al.* (1991) te verwachten seizoensvariatie van twee keer zoveel *Giardia*-cysten in stedelijk rioolwater in de periode september tot en met januari ten opzichte van de rest van het jaar, kon niet worden bevestigd. Integendeel; het tegenovergestelde werd geconstateerd.

De decimale reductie van *Cryptosporidium* en *Giardia* door de rwzi werd berekend op grond van het totale aantal oöcysten, respectievelijk cysten dat werd gemeten in het bezonken influent en gezuiverde effluent. Dit bedroeg 0,59 log voor *Cryptosporidium*, wat overeenkomt met een zuiveringsefficiëntie van 75%. Voor *Giardia* kon op basis van literatuurgegevens een verwijdering van 2,4 log (99,6%) worden afgeleid.

Uitgangspunt voor de berekening van de emissie van *Cryptosporidium* en *Giardia* via stedelijk rioolwater naar het oppervlaktewater waren de concentratiegegevens van deze protozoa. De emissie van deze pathogenen via rioolwater naar het oppervlaktewater is met behulp van bovenstaande meetgegevens en het emissiemodel PROMISE (Laan *et al.*, 1996) gemodelleerd (Schijven *et al.*, 1996, Medema *et al.*, 2000). Hieruit bleek dat de emissie van *Cryptosporidium* grotendeels (84%) afkomstig was van gezuiverde lozingen. Het lage verwijderingsrendement in een rwzi lag aan dit percentage ten grondslag. De *Giardia*-cysten werden efficiënter verwijderd in een rwzi. Dit betekende dat 82% van de *Giardia*-cysten afkomstig was uit ongezuiverde lozingen.

Deze schatting van de emissies van *Cryptosporidium* en *Giardia* in Nederland is afgeleid van een beperkt aantal meetgegevens, die met behulp van steekbemonstering op verschillende rwzi's binnen een beperkte tijdsperiode waren verkregen. Verder werden voor de berekening de gebruikte emissiefactoren - d.i. het aantal oöcysten/cysten per inwoner per jaar - als constant verondersteld. Bij *Cryptosporidium* werd een seizoensvariatie waargenomen met hoge gehalten in augustus en september en in februari. Bij *Giardia* was er minder variatie, maar dit was nog steeds circa 1 log-eenheid. Ook werd verondersteld dat verwijdering tijdens zuivering van het rioolwater altijd hetzelfde was, maar bij *Cryptosporidium* varieerde het verwijderingspercentage sterk.

Een van de aanbevelingen uit dit onderzoek was dan ook frequenter, maar met name ten minste een heel jaar lang, bij een aantal rwzi's te gaan meten, zodat de emissie en verspreiding van *Cryptosporidium* en *Giardia* via gezuiverd en ongezuiverd rioolwater betrouwbaarder zijn in te schatten.

3.2 Doelen van het onderzoek

De doelen van het onderzoek zijn het kwantificeren van de relatieve bijdrage van ongezuiverd rioolwater en effluënten van rwzi's aan de totale *Cryptosporidium*- en *Giardia*-belasting van het oppervlaktewater, en het kwantificeren van de verwijderingsefficiëntie van de rwzi's.

3.3 Selectie locaties

In totaal zijn in dit onderzoek 3 locaties geselecteerd voor bemonstering van al dan niet gezuiverd rioolwater, te weten de rwzi's 'Kralingseveer' te Rotterdam (KRAL) en 'Amsterdam Westpoort huishoudelijk' (WEST) te Amsterdam, alsmede een ongezuiverde lozing van rioolwater uit de stad Luik in België.

De keuze van de rwzi's is gebaseerd op basis van het type rwzi, de huidige effectieve zuiveringscapaciteit, het huishoudelijk/industriële vervuilingaandeel en het type riooleringstelsel. Verder zijn enkele specifieke kenmerken, zoals het ontbreken van slachthuizen en kalvermestverwerkingsbedrijven in het afwaterend gebied, bij de keuze betrokken. Ook hebben een aantal logistieke redenen en beschikbare informatie uit voorgaand onderzoek een rol gespeeld. Beide rwzi's kunnen als representatief worden beschouwd voor het zuiveren van stedelijk afvalwater in Nederland.

In tabel 3.2 worden enkele karakteristieke gegevens over de twee geselecteerde rwzi's gegeven. In bijlage 2 zijn de lay-outs, de specifieke kentallen en de zuiveringsrendementen van deze rwzi's weergegeven.

Tabel 3.2 Karakteristieken van de bemonsterde rwzi's.

	type riolering	type rwzi	ontwerp- belasting (i.e.)	gemiddelde belasting (%)	aandeel huishoudelijk (%)	slibbelasting (kg BZV/kg ds.dag)
KRAL	gemengd	carrousel	301500	97	80	0,06
WEST	gescheiden	aëratietank	390000	80	95	0,05

3.3.1 Rwzi Kralingseveer (KRAL)

De rwzi Kralingseveer (KRAL) is een laagbelast actief-slib-systeem van het type 'carousel'. Het rioolwater wordt aangevoerd via een gemengd rioolstelsel, waarin het huishoudelijk en industrieel afvalwater bij neerslag wordt gemengd met van verhard oppervlak afstromend regenwater. De rwzi heeft een ontwerpcapaciteit van 301.500 i.e., die momenteel bijna volledig benut wordt met een gemiddelde aanvoer van 80.000 m³ per dag. Ongeveer 20% van het aangevoerde rioolwater is van industriële oorsprong. Het overige deel is van huishoudelijke aard.

De waterlijn bestaat uit vier voorbezinkings-, twee contact-, twee aëratie- en zes nabezinkingstanks. De gemiddelde verblijftijd in de rwzi bij (droogweer)-aanvoer is iets minder dan een dag; bij (regenweer)-omstandigheden kan deze verblijftijd teruglopen tot minimaal zes uur. De slibbelasting in de aëratietanks bedraagt doorgaans 0,06 kg BZV/kg ds.dag. Het bij de zuivering van rioolwater vrijkomende primaire en secundaire zuiveringsslib wordt op de rwzi zelf ontwaterd.

3.3.2 Rwzi Amsterdam Westpoort huishoudelijk (WEST)

De rwzi Amsterdam Westpoort (WEST) is onderverdeeld in twee zuiveringstraten voor stedelijk afvalwater, dat voornamelijk van huishoudelijke herkomst (95%) is, en één separate straat voor de behandeling van industrieel afvalwater. Het rioolstelsel in het stedelijk afwateringsgebied bestaat voornamelijk uit een gescheiden stelsel, waarbij enerzijds het huishoudelijk en industrieel afvalwater en anderzijds het afstromende regenwater separaat wordt afgevoerd. Het huishoudelijk deel van de rwzi is een laag belast actief-slib-systeem met een ontwerpcapaciteit van 390.000 i.e. Momenteel wordt hiervan circa 80% benut.

De waterlijn bestaat uit vier voorbezinkings-, twee contact-, twee aëratie- en zes nabezinkingstanks. De slibbelasting in de aëratietanks bedraagt doorgaans 0,05 kg BZV/kg ds.dag. De gemiddelde verblijftijd in de rwzi is circa 1,2 dag. Het bij de zuivering van rioolwater vrijkomende primaire en secundaire zuiveringsslib wordt op een aparte slib-behandelingslocatie elders ontwaterd.

3.3.3 Ruw rioolwater België

De bemonsteringslocatie in België wordt getypeerd door ongezuiverd stedelijk afvalwater van de stad Luik. Onbekend is hoeveel inwoners en wat voor bedrijfstakken zijn aangesloten op de riolering en in welke mate verdunning met regenwater kan optreden.

3.4 Bemonstering

Bemonstering van het influent en effluent van beide rwzi's KRAL en WEST en het ongezuiverde rioolwater nabij Luik heeft gedurende de periode juni 1997 tot en met mei 1998 13-15 keer plaatsgevonden. Omdat in de maanden augustus en september hogere aantallen aan *Cryptosporidium* en *Giardia* werden verwacht, is de bemonsteringsfrequentie in deze periode verhoogd tot tweewekelijks in plaats van maandelijks.

Het voorbezonken influent van de rwzi's is alleen gedurende het eerste kwartaal van de onderzoeksperiode (juni-augustus) meegenomen. Reden hiervoor was dat nog weinig ervaring was opgedaan met de bepaling van protozoa in ruw rioolwater en een laag rendement was te verwachten. Uiteindelijk bleek het (eveneens lage) rendement van de protozoabepaling in het ruwe rioolwater niet veel te verschillen met dat van voorbezonken rioolwater en is verder alleen ruw rioolwater onderzocht.

Bij de rwzi's zijn de monsters ruw influent, voorbezonken influent en effluent volume-proportioneel bemonsterd gedurende 1 dag met behulp van de op de rwzi aanwezige meet- en bemonsteringsapparatuur. De monstervolumes bedroegen 1 liter voor ruw of voorbezonken influent en 10 liter voor het effluent.

De Belgische afvalwatermonsters zijn verkregen door middel van een steekmonster van 10 liter uit de riolering, voordat dit afvalwater werd geloosd in het ontvangende oppervlaktewater van de Maas.

Tijdens de monsterneming en het transport werden de monsters gekoeld bij 5 °C.

3.5 Onderzoek

Op het afvalwater van de drie bemonsteringslocaties zijn de volgende analyses door RIVM (rwzi KRAL, ongezuiverd rioolwater Luik) en RIZA (rwzi WEST) verricht:

- oöcysten van *Cryptosporidium* en cysten van *Giardia*;
- thermotolerante bacteriën van de coligroep;
- fecale streptococci;
- F-specifieke RNA-fagen;
- sporen van sulfietreducerende clostridia;
- sporen van *Clostridium perfringens*.

Door RIVM zijn in een aantal monsters ruw influent (10 liter) en effluent (10 liter) van beide rwzi's ook de gehalten enterovirussen en reovirussen bepaald. De klassieke para-

meters BZV, CZV, zwevende stof, NKj, NH₄, NO₃, Cl, temperatuur en het debiet zijn bepaald om een indruk te krijgen van de representativiteit van het bemonsterde afvalwater en om een ruwe indicatie te geven van de zuiverende werking van de rwzi. De bepalingsmethoden zijn weergegeven in hoofdstuk 2.

3.6 Data-evaluatie

Uit de statistische analyse in paragraaf 2.8 is gebleken dat voor het rendement bij de *Cryptosporidium*-bepaling er geen significante verschillen bestaan tussen laboratoria en monstermatrices. Voor het *Giardia*-rendement werd voor de matrix rioolwater geen verschil tussen de laboratoria en locaties gevonden; voor de effluenten van rwzi's daarentegen wel (tabel 2.2). Het rendement van RIZA in het effluent was beduidend hoger dan van RIVM. Het is niet duidelijk wat de oorzaak is geweest van het lage *Giardia*-rendement in het effluent bij RIVM. Statistisch gezien was hier duidelijk sprake van een koppeling tussen het laboratorium en de matrix.

Op basis van deze statistische analyse is vastgesteld dat voor de correctie van de gemeten gehalten in rioolwater (ruw of voorbezonden influent) en effluent uitgegaan wordt van een geometrisch gemiddelde rendement in de monsters voor *Cryptosporidium* van 2,6% en voor *Giardia* van 15,6%. Het effluent van de rwzi KRAL met een rendement van 1,3% voor *Giardia* zou eigenlijk hierop een uitzondering moeten zijn. Bij het stringent doorvoeren van deze correctie voor *Giardia* voor uitsluitend het effluent van de rwzi KRAL, resulteert dit evenwel in afwijkende zuiveringsrendementen in de rwzi. Deze afwijkingen zijn zuiveringstechnisch niet logisch te verklaren. De zuiveringsefficiëntie van beide rwzi's is vergelijkbaar met als resultaat een goede effluentkwaliteit voor wat betreft de zuiveringstechnische parameters (BZV, CZV, zwevende stof, NKj, NO₃ en NH₄) en de microbiologische parameters (THCOL, FSTREP, FRNAPH, SSRC en SCP). De concentratieratio's van de diverse parameters in influent/effluent tussen beide rwzi's KRAL en WEST liggen in de te verwachten bandbreedte (tot maximaal 5) behorende bij het type rioolstelsel. Alleen de aantallen *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten wijken met een ratio van 10-20 sterk af.

Om deze reden en vanwege het feit dat er geen verklaring kan worden gegeven voor dit lage rendement voor uitsluitend het effluent van de rwzi KRAL, is besloten ook voor deze watermatrix een correctiefactor van 100/15,6 te gebruiken voor *Giardia*.

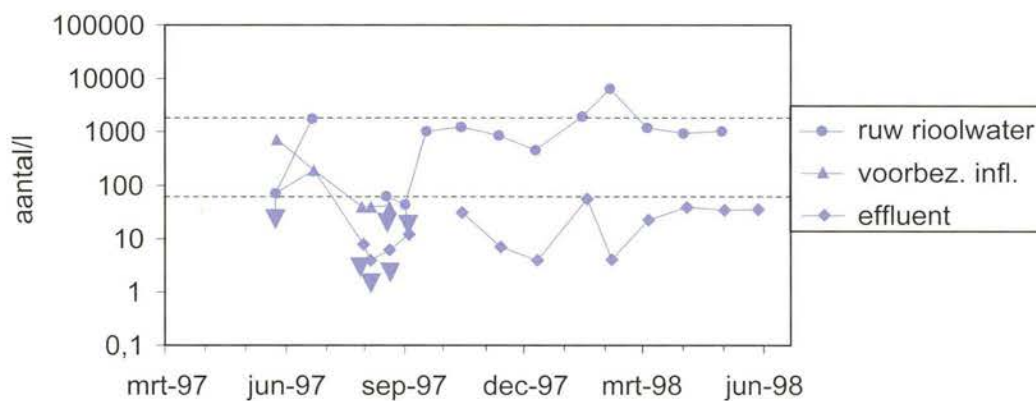
3.7 Resultaten en discussie

3.7.1 *Cryptosporidium*- en *Giardia*-gehalten

Cryptosporidium-oöcysten

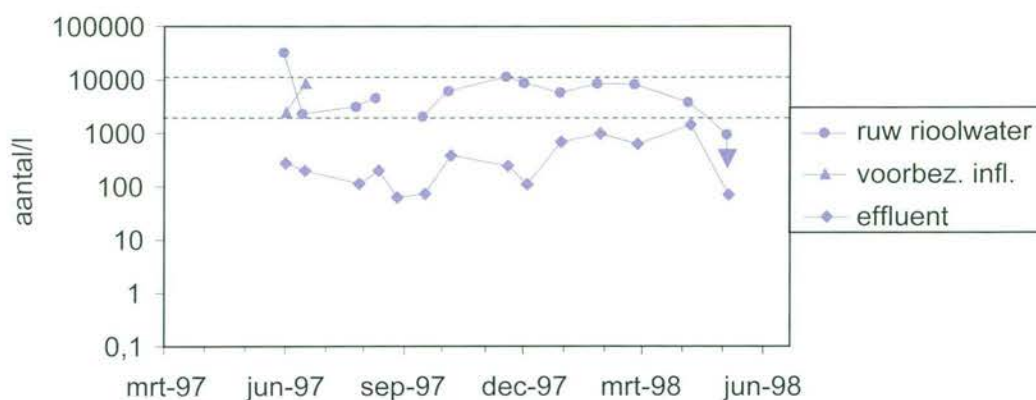
In figuur 3.1 en 3.2 is het verloop van de aantallen *Cryptosporidium*-oöcysten in de rwzi's Kralingseveer (KRAL) en Amsterdam Westpoort (WEST) gedurende de periode juni 1997-juni 1998 gegeven.

Het aantal oöcysten in ruw rioolwater van de rwzi KRAL lag doorgaans in de range 700-1600 per liter met een enkele uitschieter naar boven gedurende de maanden januari/februari (tot 6000 per liter) en naar beneden gedurende augustus-september (geen oöcysten aangetroffen (< 50 per liter)). In het effluent werden doorgaans geen tot enkele tientallen oöcysten/l aangetroffen. De geometrisch gemiddelde waarde voor het aantal oöcysten in rioolwater voor en na zuivering in een rwzi bedroeg respectievelijk 540 en 17 oöcysten/l. De decimale reductie, berekend op basis van de geometrisch gemiddelde waarden, was 1,5 log. Dit komt overeen met een zuiveringsefficiëntie van 97%.



Figuur 3.1 Verloop van aantallen *Cryptosporidium*-oöcysten per liter in rwzi Kralingseveer (↓: geen oöcyst aantoonbaar, - -: P10 en P90 van ruw rioolwater).

De aantallen *Cryptosporidium*-oöcysten waren zowel in ruw rioolwater als in het effluent van rwzi WEST beduidend hoger dan bij de rwzi KRAL. Het aantal oöcysten in ruw rioolwater lag doorgaans in de range van 2000-10.000 per liter met een eenmalige maximale waarde van 29.000 in juni 1997. In mei 1998 werd geen oöcyst in het influent aangetroffen. In het effluent lag het aantal oöcysten tussen 70-1350 per liter. De geometrisch gemiddelde waarde van de aantallen in het ongezuiverde en gezuiverde rioolwater bedroeg 4650 en 250 oöcysten/l. De decimale reductie, berekend op basis van deze geometrisch gemiddelde waarden, was 1,3 log. Dit komt overeen met een zuiveringsefficiëntie van 95%.



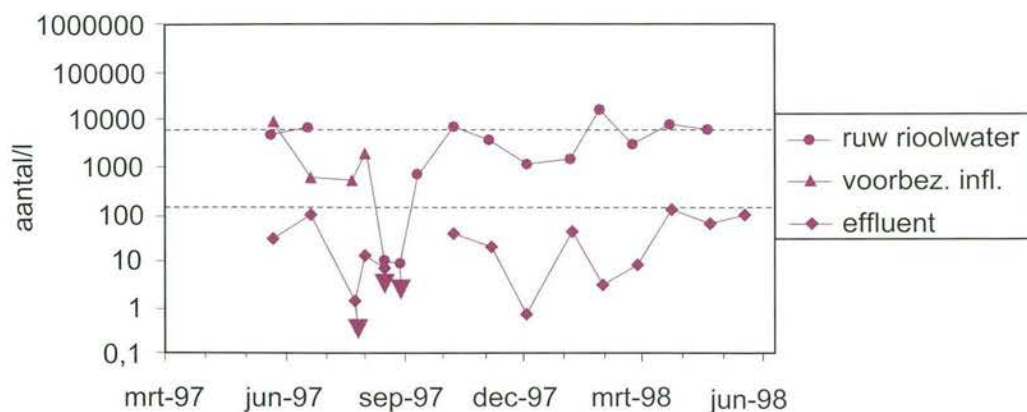
Figuur 3.2 Verloop van aantallen *Cryptosporidium*-oöcysten per liter in rwzi Amsterdam Westpoort huishoudelijk (↓: geen oöcyst aantoonbaar, - - : P10 en P90 van ruw rioolwater).

De aantallen *Cryptosporidium*-oöcysten in de rwzi's KRAL en WEST vallen binnen het zeer grote bereik van de gerapporteerde waarden in de buitenlandse literatuur; d.i. van niet aantoonbaar tot 14.000 oöcysten per liter (Rose *et al.*, 1986; Madore *et al.* 1987; Mayer *et al.*, 1996; Rose *et al.*, 1996; Nasser & Molgen, 1998; Chauret *et al.*, 1999; Medema *et al.*, 1999). In buitenlands onderzoek werden evenals bij de rwzi's KRAL (77% positief) en WEST (92% positief) niet in alle gevallen oöcysten in het ruw rioolwater aangetoond. Er lijkt geen sprake te zijn van seizoensvariatie.

Bij vergelijking van de in dit onderzoek verkregen meetwaarden met het in 1995 verrichte onderzoek op de rwzi's Amsterdam-Oost, Den Bosch, Huizen, Elburg en Waalwijk (Schijven *et al.*, 1996) blijkt dat de aantallen oöcysten in het ruwe rioolwater van KRAL en WEST een factor 10-100 hoger zijn. In beide onderzoeken is gecorrigeerd voor de rendementen van de *Cryptosporidium*-bepaling; 0,36% voor 1995 en 2,6% voor dit onderzoek.

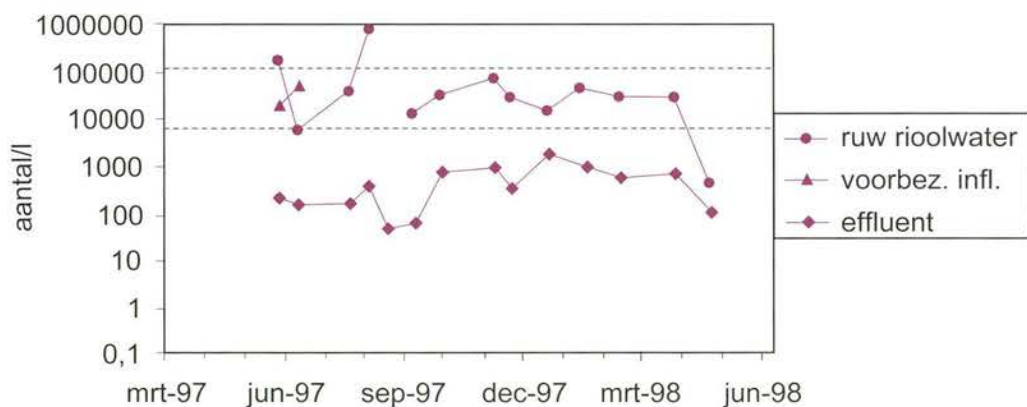
Giardia-cysten

In figuur 3.3 en 3.4 is het verloop van de aantallen *Giardia*-cysten in de rwzi's KRAL en WEST gedurende één jaar weergegeven. Er is een grote mate van overeenkomst tussen het verloop van de aantallen oöcysten en cysten door het jaar per afzonderlijke rwzi. Bij rwzi KRAL ligt het geometrisch gemiddelde van de aangetroffen *Giardia*-cysten in het ruwe rioolwater op 1220/l en varieert door het jaar van niet aantoonbaar tot 13.000 cysten/l. Er is geen duidelijk patroon van seizoensinvloed waarneembaar. De aantallen *Giardia*-cysten in het gezuiverde effluent lagen tussen niet aantoonbaar tot 110 cysten/l; het geometrisch gemiddelde bedroeg 13/l.



Figuur 3.3 Verloop van aantallen *Giardia*-cysten per liter in rwzi Kralingseveer (↓: geen cyst aantoonbaar, - -: P10 en P90 van ruw rioolwater).

Evenals bij de *Cryptosporidium*-gegevens zijn de aantallen *Giardia*-cysten in het ruwe rioolwater bij rwzi WEST aanzienlijk hoger dan bij rwzi KRAL. De maximale waarde van $6,8 \times 10^5$ /l is gemeten in augustus 1997. Het geometrisch gemiddelde lag bij 21300 cysten/l bij aantallen doorgaans liggend in de range van 4000-60000 cysten/l. Deze resulteerden ook in hogere aantallen *Giardia*-cysten in het effluent van rwzi WEST in vergelijking tot die bij KRAL. Het geometrisch gemiddelde in het gezuiverde effluent bedroeg 250 cysten/l in een range van 40-700 cysten/l en één maximale waarde van 1560 cysten/l.



Figuur 3.4 Verloop van aantallen *Giardia*-cysten per liter in rwzi Amsterdam Westpoort huishoudelijk (↓: geen cyst aantoonbaar, - -: P10 en P90 van ruw rioolwater).

De zuiveringsefficiëntie is voor beide rwzi's vergelijkbaar (99% (1,9-2,0 log)) en komt goed overeen met de in de buitenlandse literatuur vermelde percentages van meer dan 98% (Jakubowski *et al.*, 1991; Sykora *et al.*, 1991; Mayer *et al.*, 1996; Rose *et al.*, 1996; Nasser & Molgen, 1998). In buitenlands onderzoek werden evenals bij de rwzi's KRAL

(85% positief) en WEST (100% positief) in bijna alle monsters ruw rioolwater *Giardia*-cysten aangetoond. In tegenstelling tot de bevindingen van Sykora *et al.* (1991) kon seizoensvariatie in dit onderzoek niet worden aangetoond. De andere buitenlandse referenties deden geen meldingen hierover of konden eveneens dit seizoenseffect niet bevestigen (Nasser & Molgen, 1998). Bij vergelijking van de onderzoeksresultaten in Nederland en het buitenland blijkt dat de aantallen *Giardia*-cysten per bemonsteringslocatie voor ruw stedelijk rioolwater sterk van elkaar kunnen verschillen. In Nederland wordt dit geïllustreerd door de rwzi's KRAL en WEST. In de buitenlandse literatuur geeft het onderzoek van Sykora *et al.* (1991) dit goed weer. Hierbij zijn de aantallen cysten in het ruw rioolwater van 2 van de 11 onderzochte rwzi's structureel in het jaar aanzienlijk meer (1600-14000 cysten/l) dan in de overige rwzi's (4-4400 cysten/l). Grote aantallen cysten werden ook aangetroffen in het ruwe rioolwater van de 12 steden in Israël (10000-130000 cysten/l) en in de Verenigde Staten (13000 cysten/l) (Mayer *et al.*, 1996). Rose *et al.* (1996) bepaalden zeer lage aantallen *Giardia*-cysten in ruw rioolwater (1-130 cysten/l).

Ook de aantallen *Giardia*-cysten in het influent van de Nederlandse rwzi's in Schijven *et al.* (1996) lagen bijna allemaal lager dan 600 cysten/l. Destijds is gecorrigeerd voor een rendement van de *Giardia*-bepaling van 10% (in dit onderzoek 15,6%).

In tabel 3.3 zijn de meetgegevens, inclusief het rekenkundig gemiddelde, de mediaan en het geometrisch gemiddelde van de aantallen *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten in de rwzi's KRAL en WEST weergegeven. Door het geringe aantal gegevens van voorbezonken influent zijn deze niet in de tabel opgenomen.

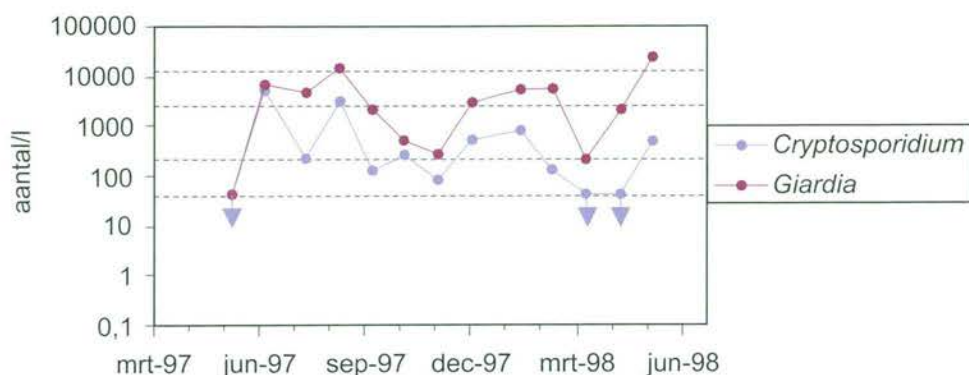
Het verloop van de aantallen *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten in het ongezuiverde rioolwater van de stad Luik op de Maas wordt weergegeven in figuur 3.5. De geaggregeerde meetgegevens staan vermeld in tabel 3.4. De gemeten aantallen (oö)cysten liggen beduidend lager dan in het ruwe rioolwater van de rwzi's KRAL en WEST. Vermenging van het afvalwater met regenwater en oppervlaktewater voordat monsterneming heeft plaatsgevonden, is hiervoor een mogelijke verklaring. Ook de slechte staat van de riolering kan een rol spelen. Hierdoor infiltreert grondwater in het rioolstelsel, waardoor verdunning optreedt.

Tabel 3.3 Aantallen *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten per liter en de zuiveringsefficiëntie in de rwzi's KRAL en WEST gedurende juni 1997-juni 1998.

	Kralingseveer			Amsterdam Westpoort huishoudelijk		
	ruw rioolwater (aantal/l)	effluent rwzi (aantal/l)	zuiverings- efficiëntie	ruw rioolwater (aantal/l)	effluent rwzi (aantal/l)	zuiverings- efficiëntie
<i>Cryptosporidium</i>						
aantal waarnemingen	13	15		13	14	
% positief	77	80		92	100	
rekenkundig gem.	1140	33	1,6 log (97%)	6720	380	1,2 log (94%)
geometrisch gem.	540	17	1,5 log (97%)	4650	250	1,3 log (95%)
standaardafwijking	1530	42		7220	390	
minimum	<38	<4		<860	66	
P10	54	<4		1930	72	
mediaan	850	23	1,6 log (97%)	5410	230	1,4 log (96%)
P90	1560	61		9330	880	
maximum	5960	170		28800	1350	
<i>Giardia</i>						
aantal waarnemingen	13	15		13	14	
% positief	85	93		100	100	
rekenkundig gem.	3670	32	2,1 log (99%)	80800	410	2,3 log (99%)
geometrisch gem.	1220	13	2,0 log (99%)	21300	250	1,9 log (99%)
standaardafwijking	3640	36		184000	410	
minimum	<6	0,6		290	38	
P10	120	1,8		5440	55	
mediaan	2850	17	2,2 log (99%)	22400	290	1,9 log (99%)
P90	6320	83		120000	720	
maximum	13100	110		681000	1560	

Tabel 3.4 Aantallen *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten per liter in ongezuiverd rioolwater bij monsterlocatie Luik in België gedurende juni 1997-juni 1998.

	<i>Cryptosporidium</i> (aantal/l)	<i>Giardia</i> (aantal/l)
aantal waarnemingen	13	13
rekenkundig gemiddelde	790	4470
geometrisch gemiddelde	230	1660
standaardafwijking	1450	5660
minimum	<38	38
P10	<38	190
mediaan	190	2470
P90	2520	10900
maximum	4860	19800

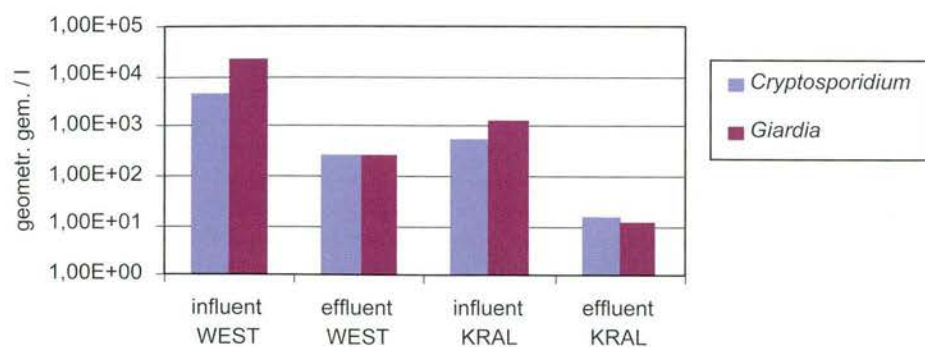


Figuur 3.5 Verloop van aantallen *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten in ruw rioolwater België (↓: geen (oö)cyst aantoonbaar, - -: P10 en P90 van ruw rioolwater).

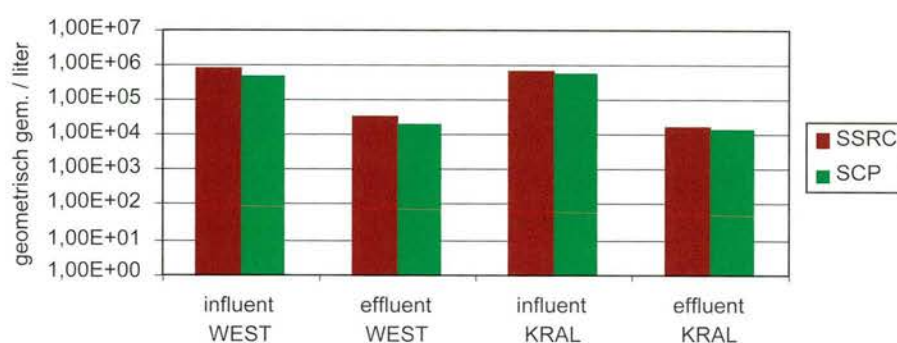
3.7.2 Geometrisch gemiddelde waarden

De geometrisch gemiddelde waarden van de aantallen *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten en de overige bacteriologische/chemische parameters worden voor het influent en effluent van de rwzi's KRAL en WEST weergegeven in de figuren 3.6 tot en met 3.10, alsmede in tabel 3.5. Het verloop van deze parameters in de tijd wordt weergegeven in bijlage 1.

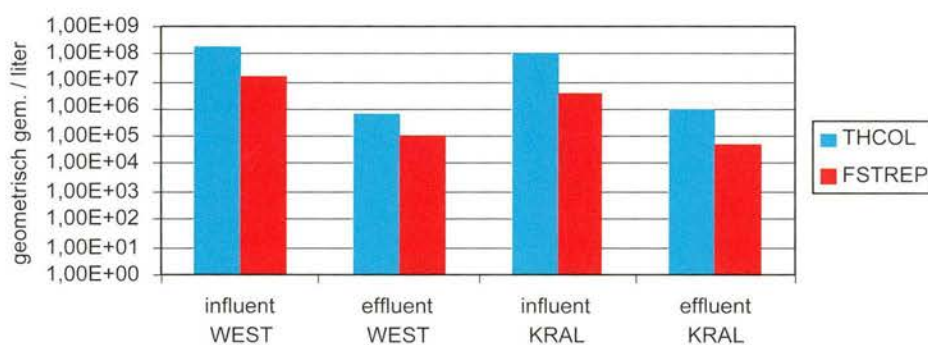
Overeenkomstig de verschillende typen rioolstelsels is de concentratie aan stoffen in het influent van de rwzi WEST (gescheiden rioolstelsel) hoger dan in het aangevoerde rioolwater op de rwzi KRAL (gemengd). In het gemengde rioolstelsel naar de rwzi KRAL kan verdunning met afstromend regenwater optreden. Op slechts enkele bemonsteringsdagen van de rwzi KRAL is er echter neerslag gevallen. Deze mogelijke verdunning kan echter niet verantwoordelijk zijn voor de geconstateerde grote verschillen in ratio's tussen de aantallen *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten en de diverse andere parameters in het influent van de rwzi WEST en KRAL. De ratio WEST/KRAL van het influent bedraagt voor *Cryptosporidium* een factor 9 en voor *Giardia* een factor 17, terwijl voor de overige parameters de concentraties gemiddeld gelijk zijn of tot een factor 5 van elkaar verschillen. Een mogelijke verklaring voor dit onderscheid kan op basis van de momenteel beschikbare informatie niet worden gegeven. De aanwezigheid van emissiebronnen van beide protozoa door de aanwezigheid van slachthuizen, kalvermestverwerkingsbedrijven of mest van landbouwhuisdieren in zijn algemeenheid in het afwateringsgebied is bij de selectie van de rwzi's uitgesloten. Mogelijk zijn er nog andere potentiële bronnen; te denken valt aan ziekenhuizen. In de afwateringsgebieden van beide rwzi's liggen echter ziekenhuizen met vergelijkbare capaciteit. Een andere mogelijkheid zou kunnen zijn dat grondwater in het rioolstelsel infiltreert.



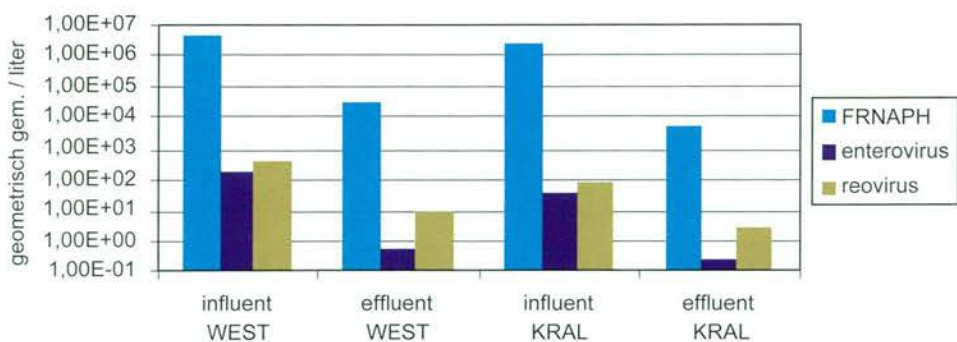
Figuur 3.6 Geometrisch gemiddelde waarde van aantallen *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten in rwzi's KRAL en WEST.



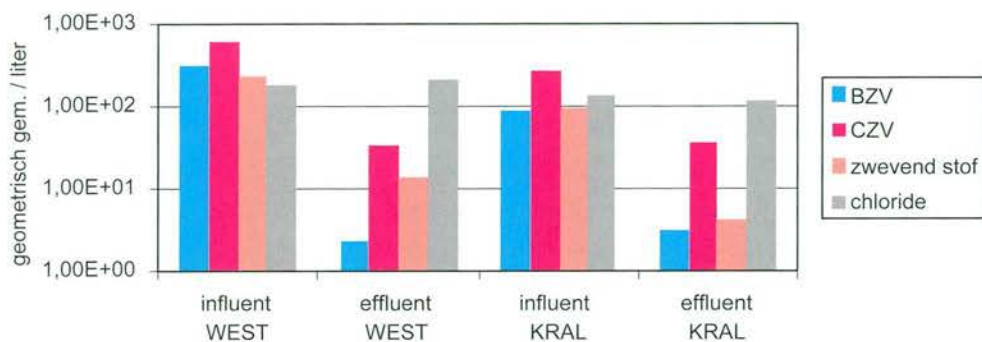
Figuur 3.7 Geometrisch gemiddelde waarde van aantallen sporen van sulfietreducerende clostridia (SSRC) en sporen van *C. perfringens* (SCP) in rwzi's KRAL en WEST.



Figuur 3.8 Geometrisch gemiddelde waarde van aantallen thermotolerante bacteriën van de coligroep (THCOL) en fecale streptococci (FSTREP) in rwzi's KRAL en WEST.



Figuur 3.9 Geometrisch gemiddelde waarde van aantallen F-specifieke RNA-fagen (FRNAPH), enterovirussen en reovirussen in rwzi's KRAL en WEST.



Figuur 3.10 Geometrisch gemiddelde waarden van BZV, CZV, zwevende stof en chloride in rwzi's KRAL en WEST.

Tabel 3.5 Geometrisch gemiddelde waarden van (oö)cysten en overige parameters in het influent en effluent van de rwzi's KRAL en WEST en de bijbehorende zuiveringsefficiëntie gedurende juni 1997-juni 1998.

geometrisch gemiddelde	rwzi Kralingseveer			rwzi Amsterdam Westpoort		
	ruw rioolwater	effluent rwzi	zuiverings-efficiëntie	ruw rioolwater	effluent rwzi	zuiverings-efficiëntie
micro-organismen (aantal/l)						
<i>Cryptosporidium</i>	540	17	1,5 log (96,8%)	4650	250	1,3 log (94,7%)
<i>Giardia</i>	1220	13	2,0 log (99,0%)	21300	250	1,9 log (98,8%)
SSRC	6,2 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁴	1,6 log (97,2%)	7,9 x 10 ⁵	3,8 x 10 ⁴	1,3 log (95,1%)
SCP	6,0 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁴	1,6 log (97,4%)	5,4 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁴	1,4 log (96,2%)
THCOL	9,4 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁶	1,9 log (98,8%)	1,6 x 10 ⁸	6,9 x 10 ⁵	2,4 log (99,6%)
FSTREP	3,6 x 10 ⁶	5,7 x 10 ⁴	1,8 log (98,4%)	1,6 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁵	2,1 log (99,3%)
FRNAPH	2,2 x 10 ⁶	5,7 x 10 ³	2,6 log (99,7%)	4,3 x 10 ⁶	3,1 x 10 ⁴	2,1 log (99,3%)
enterovirus	34	0,27	2,1 log (99,2%)	190	0,53	2,6 log (99,7%)
reovirus	69	2,7	1,4 log (96,1%)	370	8,4	1,6 log (97,7%)
algemene parameters (mg/l)						
BZV	87	3,1	96%	310	2,3	99%
CZV	270	37	86%	570	33	94%
zwevende stof	96	< 10	> 90%	230	14	94%
chloride	140	120	14%	190	210	0%

3.7.3 Emissie via stedelijk afvalwater

Voor het afleiden van de emissiefactoren voor *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn de geometrisch gemiddelde waarden van de (oö)cysten vermenigvuldigd met de dagelijkse aan- of afvoer van ruw rioolwater en vervolgens gedeeld door het aantal inwoners, dat op de desbetreffende rwzi is aangesloten.

Voor de rwzi KRAL bedraagt de huishoudelijke vervuilingswaarde circa 235000 i.e. en de jaarlijkse aanvoer 29,2 miljoen m³. Het geometrisch gemiddelde aantal *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten in ruw rioolwater is berekend op 540 oöcysten/l, respectievelijk 1220 cysten/l. Hieruit kan een emissiefactor worden berekend van $6,7 \times 10^7$ oöcysten/(inw.jaar) voor *Cryptosporidium* en $1,5 \times 10^8$ cysten voor *Giardia*. Deze emissiefactoren zijn een aantal malen hoger dan de door Schijven *et al.* (1996) berekende emissiefactoren.

Op analoge wijze kunnen voor de rwzi WEST dergelijke emissiefactoren worden berekend. De meest recente gegevens voor het aantal aangesloten inwoners op de rwzi WEST dateren van 1993 (183500 inwoners). De gemiddelde aanvoer bedroeg destijds bijna 41000 m³ per dag. Aangenomen mag worden dat het aantal inwoners door nieuwbouw is toegenomen. De berekende emissiefactoren zijn $3,8 \times 10^8$ oöcysten/(inw.jaar) voor *Cryptosporidium* en $1,7 \times 10^9$ cysten voor *Giardia*. Deze waarden zijn een factor honderd hoger dan de door Schijven *et al.* (1996) berekende emissiefactoren.

Zoals hiervoor is vermeld, kan geen verklaring worden gegeven voor de verschillende meetresultaten in aantallen (oö)cysten in het ruw rioolwater van rwzi KRAL en WEST, en dus evenmin voor de hiervan afgeleide emissiefactoren. In het geval dat grondwater een rol speelt, kunnen de emissiefactoren wel juist zijn.

Voor de totale emissieberekeningen vanuit huishoudens naar het oppervlaktewater is gebruik gemaakt van de in tabel 3.6 vermelde kengetallen uit PROMISE (Elzenga *et al.*, 1998).

Tabel 3.6 Kentallen voor afvoersituatie van huishoudelijk afvalwater in Nederland voor 1997.

afvoer	kental
totaal aantal inwoners	15567100
% bodemlozers	0,8
% lozers oppervlaktewater, waarvan:	99,2
% indirect via rioolstelsel	98,9
% gemengd (% overstort)	85,0 (1)
% gescheiden	10,1
% verbeterd gescheiden	3,8
% direct	1,1

In tabel 3.7 zijn de geschatte totale emissies van *Cryptosporidium* en *Giardia* in Nederland in 1997 weergegeven. Voor deze berekening wordt het percentage verbeterd gescheiden rioolstelsel gerekend tot het gemengde riool. Bij de directe lozing van afvalwater van verspreide bebouwing is aangenomen dat dit huishoudelijk afvalwater niet biologisch wordt gezuiverd. Hierin zal binnen enkele jaren een verbetering optreden doordat zogenaamde 'IBA-systemen' (Individuele Behandeling van Afvalwater) voor het biologisch zuiveren van dit huishoudelijk afvalwater geïnstalleerd zullen worden. De geometrisch gemiddelde emissiefactoren voor *Cryptosporidium* en *Giardia* verkregen uit de meetgegevens van rwzi KRAL en WEST, wordt beschouwd als een redelijk goede schatting om de emissie van beide (oö)cysten naar het oppervlaktewater in Nederland te berekenen. Er is geen aanleiding om aan te nemen dat een van beide emissiefactoren (op basis van KRAL of WEST) de voorkeur verdient. Ook bij het uitsluitend doorrekenen met de emissiefactor van KRAL voor de gemengde (incl. verbeterd gescheiden) rioolstelsels (88,8%) in Nederland en die van WEST voor de gescheiden rioleringen (10,1%), zouden de meetresultaten van de rwzi KRAL bij voorbaat al te veel worden bevoordeeld.

Tabel 3.7 Geschatte totale emissie van *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten naar het oppervlaktewater in Nederland in 1997.

		<i>Cryptosporidium</i> -oöcysten		<i>Giardia</i> -cysten	
emissiefactor		1,60 x 10 ⁸		5,0 x 10 ⁸	
bruto emissie		2,49 x 10 ¹⁵		7,78 x 10 ¹⁵	
influent		2,44 x 10 ¹⁵		7,64 x 10 ¹⁵	
verwijdering in rwzi					
	gemengd	gescheiden	gemengd	gescheiden.	
	96,8%	94,7%	99,0%	98,8%	
indirect oppervlaktewater					
effluent rwzi	7,0 x 10 ¹³ (52%)	1,3 x 10 ¹³ (10%)	6,9 x 10 ¹³ (30%)	9,4 x 10 ¹² (4%)	
overstort rioolstelsel	2,5 x 10 ¹³ (18%)		6,9 x 10 ¹³ (30%)		
direct		2,7 x 10 ¹³ (20%)		8,5 x 10 ¹³ (36%)	
netto totaal		13,5 x 10 ¹³		23,2 x 10 ¹³	

Uit tabel 3.7 blijkt dat 5% van de totale bruto emissie aan *Cryptosporidium*-oöcysten uit huishoudens terechtkomt in het Nederlandse oppervlaktewater. Hiervan wordt 62% geloosd via het effluent van de rwzi's; 18% komt via een overstort van de riolering in het oppervlaktewater terecht en 20% wordt via verspreide bebouwing rechtstreeks geloosd. Circa 38% van de totale huishoudelijke emissie van *Cryptosporidium*-oöcysten komt voor rekening van ongezuiverd afvalwater.

Voor de *Giardia*-cysten is deze bijdrage van het ongezuiverd afvalwater met een aandeel van meer dan de helft aanzienlijk groter. Circa 36% wordt rechtstreeks geloosd door verspreide bebouwing, terwijl overstorten van het rioolstelsel circa 30% van de totale huishoudelijke emissie naar oppervlaktewater voor haar rekening nemen. Effluenten van rwzi's dragen 34% bij. Van de totale bruto huishoudelijke emissie wordt daadwerkelijk circa 3% naar het Nederlandse oppervlaktewater geëmitteerd.

3.7.4 Correlatie van de gehalten aan *Cryptosporidium* en *Giardia* met de microbiologische en chemische parameters

Voor het vaststellen van mogelijke correlaties tussen de aantallen *Cryptosporidium* en *Giardia* met de microbiologische, fysische en chemische parameters zijn de microbiologische data van beide rwzi's log-getransformeerd. Daarna is de correlatiecoëfficiënt bepaald. De mogelijke relatie is bekeken voor zowel ruw rioolwater als voor de gezuiverde effluenten. Het aantal bruikbare meetgegevens ligt tussen de 20-25 voor de oöcysten en overige parameters met uitzondering van die voor de enterovirussen en virussen.

Tabel 3.8 Correlatie tussen *Cryptosporidium*-oöcysten, *Giardia*-cysten met microbiologische en chemische parameters in ruw rioolwater en effluenten van de rwzi's KRAL en WEST.

	<i>Cryptosporidium</i> -oöcysten		<i>Giardia</i> -cysten	
	ruw rioolwater	effluent	ruw rioolwater	effluent
microbiologisch				
<i>Cryptosporidium</i>	-	-	0,77***	0,91***
<i>Giardia</i>	0,77***	0,91***	-	-
SSRC	n.s.	0,78***	n.s.	0,61**
SCP	0,60**	0,43*	0,57**	0,54**
enterovirus	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
reovirus	0,45*	n.s.	n.s.	n.s.
FRNAPH	0,65**	n.s.	0,43*	n.s.
THCOL	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
FSTREP	0,76***	n.s.	0,59**	n.s.
fysisch, chemisch				
BZV	0,59**	n.s.	0,44*	n.s.
CZV	0,53*	n.s.	n.s.	n.s.
zwevende stof	0,57**	n.s.	0,55**	n.s.
chloride	0,50*	0,45*	n.s.	n.s.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; n.s.: niet significant.

Cryptosporidium en *Giardia* correleren onderling goed in zowel ruw rioolwater als in gezuiverd effluent. Verder correleren beide protozoa in ruw rioolwater met een groot aantal bacteriologische en fysische en chemische parameters. In gezuiverd effluent van een rwzi was alleen een positieve correlatie waarneembaar tussen *Cryptosporidium* en *Giardia* met zowel de sporen van sulfietreducerende clostridia als met die van *Clostridium perfringens*.

3.8 Conclusies

- De aanwezigheid van de *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten in ruw stedelijk rioolwater verschillen per locatie sterk zonder dat hiervoor duidelijke redenen zijn aan te wijzen. Seizoensinvloeden op de aantallen (oö)cysten in ongezuiverd stedelijk rioolwater konden niet worden aangetoond.
- Het rendement van de bepalingsmethode voor beide protozoa is laag; respectievelijk gemiddeld 2,6% voor *Cryptosporidium*-oöcysten en 15,6% voor *Giardia*-cysten. Voor het effluent van één van de bemonsterde rwzi's (KRAL) was het rendement voor de *Giardia*-bepaling met 1,3% beduidend slechter.
- De geometrisch gemiddelde waarden van de aantallen *Cryptosporidium* en *Giardia* (oö)cysten in het influent en effluent van de rwzi's Kralingseveer (KRAL) en Amsterdam Westpoort (WEST), en de zuiveringsefficiëntie zijn weergegeven in tabel 3.9. De *Giardia*-cysten komen in ongezuiverd stedelijk rioolwater in grotere aantallen voor dan de *Cryptosporidium*-(oö)cysten. De *Giardia*-cysten worden in een rwzi beter verwijderd dan de oöcysten. Na biologische zuivering in een rwzi komen beide (oö)cysten in gelijke orde van grootte voor in het effluent.

Tabel 3.9 Geometrisch gemiddelde waarden van aantallen *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten per liter in influent en effluent van de rwzi's Kralingseveer (KRAL) en Amsterdam Westpoort (WEST) en de bijbehorende zuiveringsefficiëntie gedurende juni 1997-juni 1998.

meetgegeven	KRAL			WEST		
	ruw rioolwater (aantal/l)	effluent rwzi (aantal/l)	zuiverings- efficiëntie	ruw rioolwater (aantal/l)	effluent rwzi (aantal/l)	zuiverings- efficiëntie
<i>Cryptosporidium</i>						
n (aantal metingen)	13	15		13	14	
geometrisch gem.	540	17	1,5 log (97%)	4650	250	1,3 log (95%)
<i>Giardia</i>						
n (aantal metingen)	13	15		13	14	
geometrisch gem.	1220	13	2,0 log (99%)	21300	250	1,9 log (99%)

- De in Nederland gemeten aantallen (oö)cysten in al dan niet gezuiverd stedelijk rioolwater liggen binnen de (zeer ruime) bandbreedte van de in de buitenlandse literatuur vermelde aantallen *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten in het rioolwater van de Verenigde Staten, Canada, Israël en Duitsland.
- Op basis van de verkregen meetgegevens van de rwzi's KRAL en WEST zijn voor beide bemonsteringslocaties emissiefactoren voor het aantal *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten per inwoner per jaar berekend. Deze verschillen sterk van elkaar (zie tabel 3.10).

Tabel 3.10 Berekende emissiefactoren op basis van meetgegevens rwzi's KRAL en WEST voor *Cryptosporidium*- en *Giardia*-(oö)cysten per inwoner per jaar.

	emissiefactor	
	<i>Cryptosporidium</i> -oöcysten (per inwoner per jaar)	<i>Giardia</i> -cysten (per inwoner per jaar)
KRAL	$6,7 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$
WEST	$3,8 \times 10^8$	$1,7 \times 10^9$
geometrisch gemiddelde	$1,6 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$

- Van de totale bruto emissie aan *Cryptosporidium*-oöcysten uit huishoudens komt 5% in het Nederlandse oppervlaktewater terecht. Circa 62% van de netto emissie afkomstig van huishoudens naar oppervlaktewater wordt veroorzaakt door gezuiverde effluentlozingen van de rwzi's. De overige 38% is het gevolg van riooloverstorten en de directe lozingen vanuit verspreide bebouwing.
De gezuiverde effluentlozingen van de rwzi's leveren 34% van de *Giardia*-emissie. De ongezuiverde directe lozingen of de riooloverstorten dragen voor het grootste deel bij (66%) aan de netto emissie van *Giardia*-cysten uit huishoudens naar het Nederlandse oppervlaktewater. Dit is ongeveer 3% van de bruto emissie uit huishoudens.
- *Cryptosporidium* en *Giardia* correleren onderling positief in zowel ruw rioolwater als in gezuiverd effluent van een rwzi. In ruw rioolwater correleren beide protozoa met een groot aantal andere bacteriologische parameters (SCP, FRNAPH, FSTREP) en chemische parameters (BZV, zwevende stof). In het gezuiverde effluent is een positieve correlatie waarneembaar tussen beide protozoa met de sporen van sulfietreducerende clostridia en die van *Clostridium perfringens*.

4 *Cryptosporidium* en *Giardia* in mest van landbouwhuisdieren

4.1 Inleiding

Cryptosporidium en *Giardia* komen beide voor in mest van landbouwhuisdieren. *Cryptosporidium* is met name aangetroffen bij koeien, schapen, paarden, varkens en bij pluimvee, maar ook andere landbouwhuisdieren kunnen besmet zijn (Casemore *et al.*, 1997). In Nederland is *Cryptosporidium* tot dusver aangetroffen in runderen (De Leeuw *et al.*, 1984), paarden (Medema ongepubl. geg.) en bij pluimvee (pers. meded. Gezondheidsdienst voor Dieren). *Cryptosporidium* is in de diergeneeskunde een bekende pathogeen bij pasgeboren kalveren met ernstige diarree. Over het voorkomen van *Giardia* bij landbouwhuisdieren in Nederland zijn geen gegevens bekend.

Ook bij de natuurlijke fauna wordt *Cryptosporidium* aangetroffen, zowel in watervogels en knaagdieren (Medema *et al.*, 1999) als in grote grazers (Nobel *et al.*, 1999). *Giardia* is in watervogels en muskusratten aangetroffen (Medema *et al.*, 1999).

Het in dit hoofdstuk beschreven onderzoek is uitgebreid apart gerapporteerd door Schijven *et al.* (1999b).

4.1.1 Overdracht van dier naar mens

De taxonomie en gastheerspecificiteit van *Cryptosporidium* zijn nog onderwerp van intensief onderzoek (Morgan *et al.*, 1999). *C. parvum* wordt gezien als de soort die zowel bij de mens als bij andere zoogdieren voorkomt, en dus van dier op mens wordt overgedragen. Het lijkt er echter steeds meer op dat binnen deze soort een aantal subtypen bestaan, waarvan sommige (genotype 1 en 2) voorkomen bij de mens, bij runderen en andere landbouwhuisdieren (genotype 2), terwijl een aantal (> 5 genotypen) andere subtypen specifiek(er) lijkt voor een specifieke zoogdiergastheer (kat, hond, fret), zodanig zelfs dat zij een aparte soort zouden kunnen zijn en niet van dier op mens worden overgedragen, behalve naar aidspatiënten met weinig tot geen afweer. De *C. parvum*-oöcysten die bij landbouwhuisdieren voorkomen, kunnen dus ook de mens infecteren. Dit in tegenstelling tot oöcysten die van nature bij vogels (pluimvee) voorkomen, die niet infectieus zijn voor de mens. Vogels kunnen wel drager en uitscheider zijn van menspathogene *Cryptosporidium*-oöcysten die zij bij het foerageren op bijvoorbeeld rioolslib hebben opgepikt (Grazcyk *et al.*, 1998).

Voor *Giardia* is het nog steeds een onderwerp van discussie of overdracht van dier op mens plaatsvindt (Erlandsen, 1994). *Giardia* is taxonomisch zeer heterogeen en komt in veel diersoorten voor (Kulda & Nohynkova, 1987; Erlandsen *et al.*, 1991a; Erlandsen, 1994) en is vaak morfologisch niet te onderscheiden van *Giardia*-isolaten uit de mens (Healy, 1990). Dit heeft geleid tot het impliceren van dieren als bron voor *Giardia*-infecties bij de mens (Dykes *et al.*, 1980; Jakubowski, 1988; Erlandsen, 1994). Daarenboven werden 'waterborne outbreaks' van giardiasis gemeld, waarvan een deel plaats had in water dat niet verontreinigd was met humane fecaliën, maar mogelijk wel door bevers waarin ook *Giardia* was aangetroffen (Dykes *et al.*, 1980). De cysten die werden geïsoleerd uit de bevers waren infectieus voor 'specific pathogen-free' beagle puppies. Bevers en muskusratten zijn frequente dragers van *Giardia* (resp. 10-18% en 33-95%) (Healy, 1990; Erlandsen, 1994). De *Giardia*-cysten uit bevers lijken de mens te kunnen infecteren (Davies & Hibler, 1979) en vice versa (Erlandsen *et al.*, 1988).

Hoewel *Giardia* vrij algemeen voorkomt bij gezelschapsdieren en landbouwhuisdieren, zijn er top op heden geen meldingen gemaakt van *Giardia*-infecties bij mensen als gevolg van diercontact (Healy, 1990; Erlandsen, 1994).

Giardia komt ook voor in vogels en ook hier is weer op basis van morfologische gelijkenis gesuggereerd dat de cysten uit vogels de mens zouden kunnen infecteren (Georgi *et al.*, 1986; Box, 1981). Erlandsen *et al.* (1991b) geven echter aan dat dit onwaarschijnlijk is, omdat de *Giardia* uit de vogels juist andere soorten zijn die niet bij de mens worden aangetroffen.

Op basis van deze gegevens is het aannemelijk dat de *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten die in mest van landbouwhuisdieren worden aangetroffen, overgedragen kunnen worden op de mens.

4.2 Doelen van het onderzoek

De doelstelling van dit onderzoek was:

- Het vaststellen van het voorkomen van *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten in mest van landbouwhuisdieren.
- Het vaststellen van het voorkomen van *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten in afvalwater van slachthuizen en kalvermestverwerking.

Door deze meetgegevens aan te vullen met de totale hoeveelheden geproduceerde mest en afvalwater in Nederland, kon een schatting worden verkregen van de totale emissie van *Cryptosporidium* en *Giardia* via deze routes in Nederland.

4.3 Bemonstering

Monsters mest werden genomen bij koppels vleeskalveren, melkkoeien, vleeskuikens en legkippen. In het complete bemonsteringsprogramma waren ook koppels vleesvarkens opgenomen. Deze zijn echter ten tijde van dit onderzoek niet bemonsterd, vanwege de problematiek rond de varkenspest-epidemie. Monsters mest werden genomen door medewerkers van de Veterinaire Inspectie, zoals beschreven in het protocol 'Surveillance van zoönosenverwekkers bij landbouwhuisdieren', d.d. 8 mei 1998, onder MAP-project 285859/003 en gerapporteerd in Heuvelink *et al.* (1999). Selectie van bedrijven was ad random, rekeninghoudend met geografische spreiding van de verschillende veehouderijen over heel Nederland. Per geselecteerd bedrijf werd ad random één van de aanwezige koppels bemonsterd op basis van de volgende definitie van koppel: dieren van een zelfde productieleeftijd, gehuisvest in dezelfde stal. Het onderzoek van mest op aanwezigheid van *Cryptosporidium* en *Giardia* omvatte de periode van 9 juni 1997 tot en met 27 januari 1998. In aanvulling hierop zijn ook enkele monsters mest genomen van pasgeboren kalveren, lammeren, kuikens en biggen (neonaten, minder dan 1 week oud).

De monsterneming staat per categorie dier uitgewerkt. De monsters werden genomen met behulp van plastic zakken. Alle individuele, binnen een koppel genomen monsters werden evenredig samengevoegd tot maximaal vijf mengmonsters van elk circa 25 gram in aparte zakken. Het aantal mengmonsters per koppel hing af van de koppelgrootte (tabel 4.1). De zakken met mengmonsters van één koppel werden vervolgens in één grote zak gestopt en voorzien van een sticker met VHI-identificatie. Deze zak werd gekoeld getransporteerd naar RIVM.

Tabel 4.1 Aantal mest- en mengmonsters, afhankelijk van het aantal dieren per koppel.

aantal dieren per koppel	aantal mestmonsters	aantal mengmonsters
	gelijk aan het aantal dieren tot een maximum van 20	
1 - 24		2
25 - 29	20	2
30 - 39	25	2
40 - 49	30	3
50 - 59	35	3
60 - 89	40	3
90 -199	50	4
200 -499	55	5
≥ 500	60	5

4.3.1 Vleeskalveren

Op elk vleeskalverbedrijf werd één koppel bemonsterd. Het koppel werd door loting geselecteerd. Een koppel vleeskalveren is hier gedefinieerd als een groep vleeskalveren van dezelfde productie-leeftijd (in weken), gehuisvest in één ruimte (stal). Per koppel werd verspreid over de betreffende stal een aantal monsters verse mest genomen volgens tabel 4.1.

4.3.2 Melkkoeien

Op elk melkveebedrijf is het totaal aantal aanwezige melkkoeien één koppel. Per koppel werd om en nabij de melkstal, bij voorkeur kort na het melken, een aantal monsters verse mest genomen volgens tabel 4.1.

4.3.3 Vleeskuikens

Op elk vleeskuikenbedrijf werd aan de hand van loting één koppel vleeskuikens bemonsterd. Een koppel bestaat uit vleeskuikens van dezelfde leeftijd (in weken), die in dezelfde ruimte (stal) zijn ondergebracht. Per koppel werden verspreid over de ruimte 60 verse fecale droppings genomen, die samengevoegd werden tot vijf mengmonsters van elk 12 monsters mest.

4.3.4 Legkippen

Op elk legkippenbedrijf werd aan de hand van loting één koppel legkippen bemonsterd. Een koppel bestaat uit legkippen, die in dezelfde ruimte (stal) zijn gehuisvest. Per koppel werden verspreid 60 monsters mest genomen, die werden samengevoegd tot vijf mengmonsters.

4.3.5 Monsterneming kalvermestverwerkingsbedrijf

De bewerking van kalvergier in kalvermestverwerkingsbedrijven vindt continu plaats in een actief-slib-proces van opgestelde tankstraten. De kalvergier wordt gedurende werkdagen aangevoerd met gesloten tankwagens. De kalvergier wordt via een gesloten leiding in een stortput gebracht. Na verwijdering van de grove bestanddelen door een harkrooster, wordt de kalvergier in een opslagtank gepompt. De opslag heeft een buffer voor enkele dagen. De feitelijke bewerking vindt plaats in nitrificatie- en denitrificatietanks. Tijdens nitrificatie wordt het organisch gebonden stikstof in aanwezigheid van zuur omgezet in

nitriet en in de denitrificatietanks tot nitraat. Vervolgens vindt in de denitrificatieruimte onder anaërobe omstandigheden verder afbraak plaats. Door toevoeging van kalkmelk wordt het aanwezige fosfaat neergeslagen. In de nabezinkingstank wordt het actief slib bezonken. Een deel wordt teruggevoerd in de installatie en een deel wordt afgevoerd als spuislib. Het effluent wordt geloosd op het riool. Het spuislib wordt ingedikt in de slib-indikker en vervolgens opgeslagen en daarna afgevoerd.

Monsters werden genomen door een medewerker van het kalvermestverwerkingsbedrijf. Per monsterdatum werd van de inkomende kalvergier (drijfmest bestaande uit mest en urine, het gehalte aan droge stof bedroeg 2%) een monster van 250 ml uit de mengkelder genomen. Het eindproduct van kalvermestverwerking is ingedikte mest (gehalte aan droge stof 5-8%). Hiervan werd eveneens een monster genomen van 250 ml. Van het effluent werd, vóór lozing op het riool, een 20-liter monster genomen in een kunststof vaatje. De monsters werden gekoeld naar RIVM getransporteerd.

4.3.6 Monsterneming slachthuisafvalwater

Gedurende een periode van 4 maanden werden maandelijks monsters afvalwater genomen bij een runderslachthuis, een varkensslachthuis en een pluimveeslachterij. De monsters werden genomen door medewerkers van de betreffende bedrijven.

Voordat slachthuisafvalwater via de riolering wordt afgevoerd naar een rioolwaterzuivering, vindt een voorzuivering plaats door de slachthuizen. Het runderslachthuis en de pluimveeslachterij, waarvan het afvalwater werd onderzocht, passen zeving, bezinking, flocculatie en beluchting toe. Dit geldt voor de meeste van dergelijke slachterijen. Het varkensslachthuis, waarvan het afvalwater werd onderzocht, past geen flocculatie toe. Er zijn varkensslachthuizen waar dit wel wordt toegepast. Het bemonsterde varkensslachthuis heeft een discontinu zuiveringssysteem. Dat wil zeggen dat overdag onbehandeld afvalwater wordt toegevoerd aan het systeem, maar 's nachts niet. Dit discontinue systeem is bij twee varkensslachthuizen in Nederland in gebruik. De overige hebben een continu systeem. Het hier onderzochte slachthuisafvalwater betreft dus het afvalwater van het bedrijf dat na zuivering binnen het slachthuis vervolgens op het riool wordt geloosd. Door werknemers van de betreffende bedrijven werden volume-proportionele monsters over een periode van 24 uur genomen. Volume-proportioneel houdt in dat het monstervolume wordt aangepast aan het debiet van het effluent. Het monster werd gekoeld opgeslagen bij circa 5 °C. Bij de pluimveeslachterij werd een volume-proportioneel monster samenge-

steld door 4 gelijke monsters samen te voegen, die de ene dag om 9.00, 13.00 en 17.00 uur waren genomen en de volgende dag om 9.00 uur. Van elk volume-proportioneel monster werd een monster van 20 liter voor onderzoek genomen. Deze monsters werden door RIVM opgehaald en gekoeld getransporteerd.

4.4 Onderzoek

De volgende microbiologische analyses werden van het afvalwater uitgevoerd: thermotolerante bacteriën van de coligroep, fecale streptococci, sporen van sulfietreducerende clostridia, sporen van *Clostridium perfringens* en F-specifieke RNA-fagen.

Het afvalwater van de slachthuizen en het kalvermestverwerkingsbedrijf werd onderzocht op het zwevend stofgehalte, het biochemisch zuurstofverbruik, het chemisch zuurstofverbruik, Kjeldahl-stikstof en ammonium.

4.5 Data-evaluatie

De kans dat een koppel besmet is met *Cryptosporidium* en *Giardia* is binomiaal verdeeld en waarschijnlijk varieert deze kans. Een handige aanname om deze variatie te beschrijven is met een Bèta-verdeling. Een Bèta-verdeling kan allerlei vormen aannemen, afhankelijk van de parameterwaarden. Als de kans (p) is om een positief koppel aan te treffen, het aantal positieve koppels (s) en het aantal onderzochte koppels (n), dan kan de verdeling van p worden beschreven als:

$$p = \text{Beta} [s + 1, n - s + 1] \quad (1)$$

Dit houdt ook in, dat in die gevallen waarbij $s = 0$, er toch een geschat percentage positieve koppels kan worden gevonden. Deze schatting is afhankelijk van n . Indien er geen positieve koppels worden gevonden, hoeft dat niet te betekenen dat er geen positieve koppels zijn.

Voor de berekening van jaaremissies van *Cryptosporidium* en *Giardia* per type landbouwhuisdier werd uitgegaan van de volgende aannames:

1. Alle leeftijdscategorieën van een bepaald type dier zijn even sterk vertegenwoordigd.
2. Bij vleeskalveren en legkippen is onderscheid gemaakt in mestproductie per leeftijdsklasse.
3. De concentraties *Cryptosporidium* en *Giardia* binnen een bepaalde leeftijdsklasse zijn onafhankelijk van de leeftijd.

Op basis van de tellingen in monsters mest van positieve koppels werden eerst concentraties in mest van besmette dieren geschat. Hierbij is aangenomen, dat oöcysten van *Cryptosporidium* en cysten van *Giardia* in monsters mest Negatief Binomiaal verdeeld zijn. Er wordt dus aangenomen dat ze niet homogeen verdeeld zijn, maar geclusterd kunnen zijn in plaats en/of tijd. Als tellingen (aantallen) Negatief Binomiaal verdeeld zijn, dan zijn de concentraties Gamma-verdeeld (Cox & Hinkley, 1974). Met behulp van de maximum likelihood methode (geïmplementeerd in Mathematica 3.0) werd vervolgens een Negatief Binomiale verdeling gefit aan de tellingen van alle mengmonsters van positieve koppels per leeftijdsklasse. De gevonden parameters werden gebruikt om de Gamma-verdeling van de concentraties in mest van positieve koppels uit te rekenen per leeftijdsklasse. Uit de som van de concentraties, de prevalentie van positieve koppels en een gemiddelde mestproductie per dier per duur van de leeftijdsklasse werd een emissie van een individueel dier gesimuleerd. Hierbij werden 1000 trekkingen uit de respectievelijke verdelingen voor concentratie (Gamma) en prevalentie (Bèta) per leeftijdsklasse genomen.

$$E = \sum_{i=1}^n (C_i \times N_i^+ \times F_i) \quad (2)$$

waarbij geldt:

E	is de emissie per dier van <i>Cryptosporidium</i> of <i>Giardia</i> (aantal (oö)cysten);
C_i	is de Gamma-verdeelde concentratie in mengmonsters van positieve koppels voor de i-de van n leeftijdsklassen (aantal (oö)cysten/kg mest);
N_i^+	is de Bèta-verdeelde kans op een positief koppel van de i-de leeftijdsklasse;
F_i	is de mestproductie per dier per duur van de leeftijdsklasse (kg).

Ten slotte is een jaaremissie per diersoort berekend door vermenigvuldiging met het aantal dieren in een jaar (Anonymus, 1997).

4.6 Resultaten

4.6.1 *Cryptosporidium* en *Giardia* in mest van landbouwhuisdieren

Neonaten:

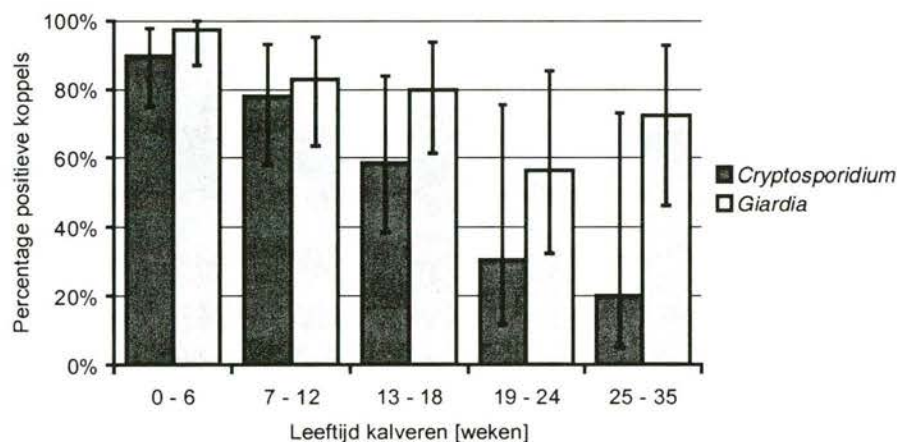
Tabel 4.2 toont de resultaten van het onderzoek op *Cryptosporidium* en *Giardia* in mest van neonate landbouwhuisdieren. Beide monsters van mest van pasgeboren kalveren waren positief voor zowel *Cryptosporidium* als *Giardia*, maar in mest van neonate lammeren, vleeskuikens en biggen werden beide protozoa niet aangetoond.

Tabel 4.2 Resultaten onderzoek van mest van pasgeboren landbouwhuisdieren (neonaten) op *Cryptosporidium* en *Giardia* (leeftijd < 1 week).

	vleeskalveren	lammeren	vleeskuikens	biggen
aantal monsters	2	3	3	3
aantal positieve monsters				
<i>Cryptosporidium</i>	2	0	0	0
<i>Giardia</i>	2	0	0	0

Vleeskalveren:

In tabel 4.3 zijn de resultaten van het onderzoek op *Cryptosporidium* en *Giardia* in mest van vleeskalveren samengevat. Het percentage koppels met vleeskalveren, dat positief werd bevonden voor de aanwezigheid van *Cryptosporidium* en *Giardia* is opvallend hoog. In alle gevallen waarin *Cryptosporidium* werd aangetoond in mest van vleeskalveren, werd ook *Giardia* aangetoond. Het percentage koppels positief voor *Cryptosporidium* en *Giardia* in mest van vleeskalveren is per leeftijdsklasse ook weergegeven in figuur 4.1.



Figuur 4.1 Geschat percentage koppels voor vleeskalveren positief voor *Cryptosporidium* en *Giardia* in mest verdeeld naar leeftijd, inclusief 95%-interval.

In de leeftijdsklasse van 0-6 weken waren alle onderzochte koppels positief voor *Giardia* en 90% daarvan was positief voor *Cryptosporidium*. Het aantal koppels, dat positief werd bevonden voor *Cryptosporidium* neemt af met de leeftijd van de kalveren tot 20%. Dit beeld stemt overeen met onderzoek uit Nieuw-Zeeland, waarbij de meeste monsters positief voor *Cryptosporidium* bij 4-7 dagen oude kalveren werden gevonden (Casemore *et al.*, 1997). Het aantal koppels positief voor *Giardia* blijft daarentegen vrij hoog in alle leeftijdsklassen.

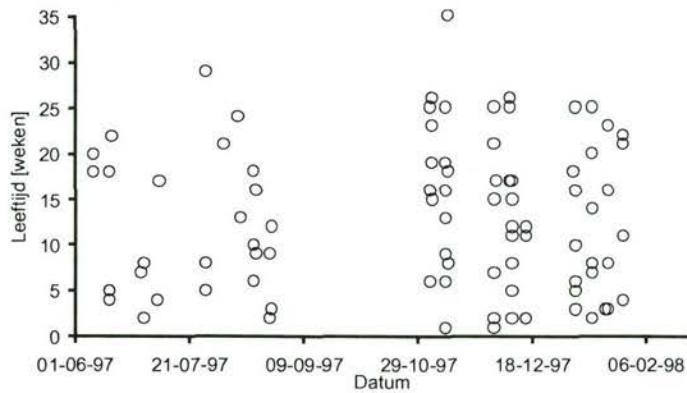
Tabel 4.3 Resultaten onderzoek mest van vleeskalveren.

leeftijdsklasse (weken)	1 tot 6	7 tot 12	13 tot 18	19 tot 24	25 tot 35
gem. leeftijd (weken)	3,4	9,4	16	21	26
koppelgrootte (aantal dieren)					
Gem.	305	386	219	297	224
Min.	38	60	34	84	55
Max.	930	979	509	600	674
aantal positieve koppels/ totaal aantal koppels					
<i>Cryptosporidium</i> *	23/25	16/20	13/22	4/14	2/12
<i>Giardia</i>	25/25	17/20	18/22	8/14	9/12
<i>Cryptosporidium</i> *					
geschat perc. positieve koppels	90%	78%	59%	30%	20%
95% interval	75%-98%	58%-93%	39%-84%	12%-76%	5%-73%
<i>Giardia</i>					
geschat perc. positieve koppels	97%	83%	80%	57%	72%
95% interval	87%-100%	64%-95%	61%-94%	32%-85%	46%-93%
<i>Cryptosporidium</i>					
gem. concentratie in positieve koppels (N/kg)	$5,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$	$5,3 \times 10^5$	$2,6 \times 10^6$
95% interval	$5,6 \times 10^3 - 4,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^2 - 8,9 \times 10^7$	$7,2 \times 10^2 - 7,6 \times 10^6$	$3,9 \times 10^{12} - 5,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^{11} - 2,4 \times 10^7$
<i>Giardia</i>					
gem. concentratie in positieve koppels (N/kg)	$3,2 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$7,8 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
95% interval	$4,7 \times 10^3 - 1,7 \times 10^8$	$4,2 \times 10^4 - 1,2 \times 10^8$	$3,3 \times 10^4 - 3,4 \times 10^7$	$2,6 \times 10^2 - 1,9 \times 10^7$	$4,9 \times 10^1 - 1,5 \times 10^7$
	gem. aanwezige aantal dieren/jaar**	kg mest (feces+urine) per dier per jaar***	jaaremissie (N/jaar)****		
			<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	
wit vlees*****	$6,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^{15}$	$1,8 \times 10^{15}$	
rose vlees*****	$1,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$			

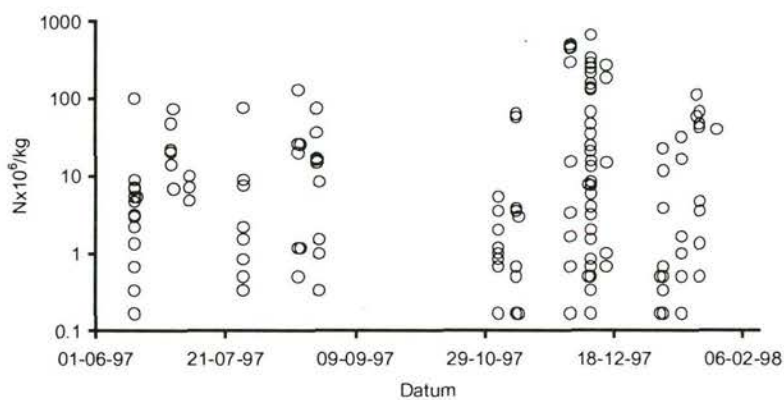
* Deze monsters waren alle positief voor *Giardia*; **CBS-Landbouwdatabank 1980-1997; ***Van Eerd (1998); ****Volgens vergelijking (2) voor wit + rose van 0-24 weken; *****Wit-vlees-kalveren (leeftijd 0-24 weken) en rose-vlees-kalveren (leeftijd 0-35 weken).

Figuur 4.2 toont de leeftijd van de onderzochte vleeskalveren naar monsterdatum. Er is geen significante correlatie tussen leeftijd en datum. Hieruit blijkt dat alle leeftijden het gehele jaar voorkomen. Figuur 4.3 en 4.4 laten de gehalten zien van *Cryptosporidium* en *Giardia* in mengmonsters mest van vleeskalveren op logaritmische schaal naar monsterdatum. Er is geen significante correlatie tussen gehalten en datum, maar figuur 4.3 laat wel zien dat in de eerste helft van december hoge gehalten *Cryptosporidium* van 10^8 - 10^9 oöcysten/kg mest voorkomen, terwijl op andere tijdstippen in het jaar gehalten lager zijn dan 10^8 oöcysten/kg mest. Deze hoge gehalten werden gevonden in monsters mest van een drietal bedrijven met kalveren in de leeftijd van 1 en 2 weken. Er werden ook geen significante correlaties gevonden tussen gehalten protozoa en koppelgrootte, en tussen datum en koppelgrootte.

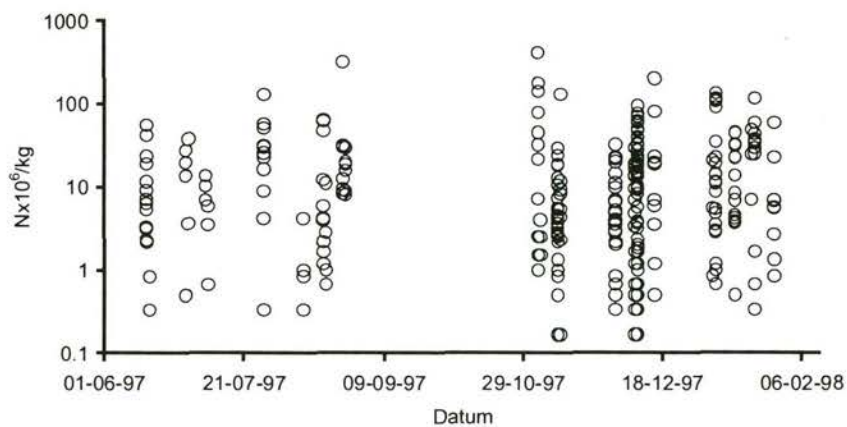
Uit tabel 4.3 blijkt dat de koppelgrootte per leeftijdsklasse ongeveer hetzelfde was en dat er geen grote verschillen waren in aantallen onderzochte koppels per leeftijdsklasse.



Figuur 4.2 Leeftijd van vleeskalveren per koppel naar monsterdatum.

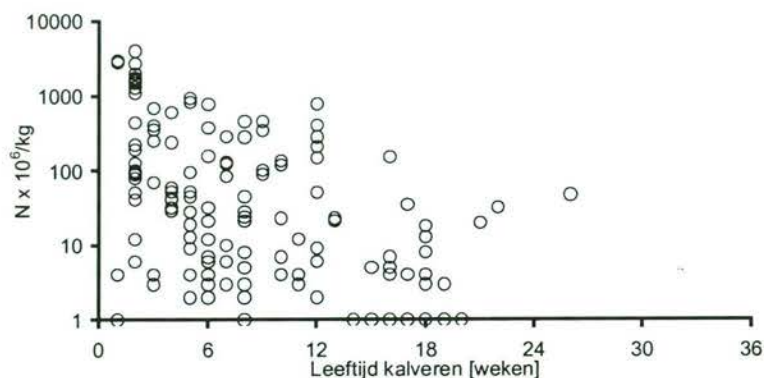


Figuur 4.3 Gehalte van *Cryptosporidium* ($N \times 10^6$ per kg) in positieve mengmonsters mest van vleeskalveren naar monsterdatum.

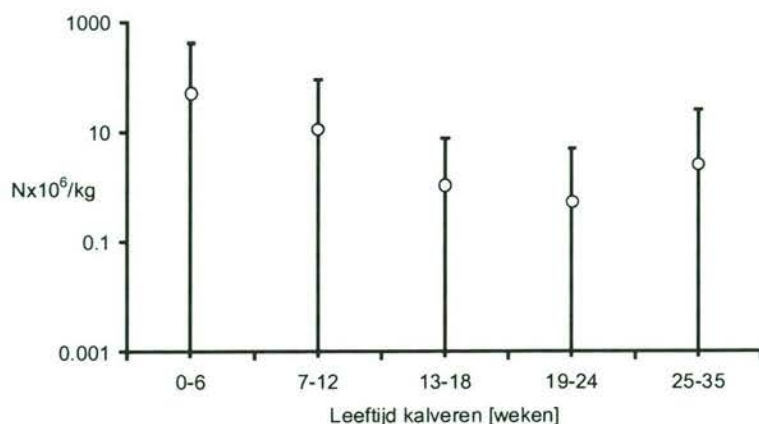


Figuur 4.4 Gehalte (log-schaal) van *Giardia* ($N \times 10^6$ per kg) in positieve mengmonsters mest van vleeskalveren naar monsterdatum.

Figuur 4.5 en 4.7 tonen de gehalten van respectievelijk *Cryptosporidium* en *Giardia* in positieve monsters mest van vleeskalveren naar leeftijdswEEK. In figuur 4.6 en 4.8 zijn de gehalten geaggregeerd tot gemiddelde gehalten, inclusief 95%-interval. Het blijkt dat de hoogste gehalten *Cryptosporidium* gemeten werden in mest van vleeskalveren in de leeftijd van 1 week. De gehalten *Cryptosporidium* dalen daarna snel met toenemende leeftijd van de kalveren, hoewel er sprake is van een zeer grote spreiding in gehalten. Het maximale gehalte dat werd gemeten in een monster bedroeg $1,9 \times 10^8$ per kg mest.

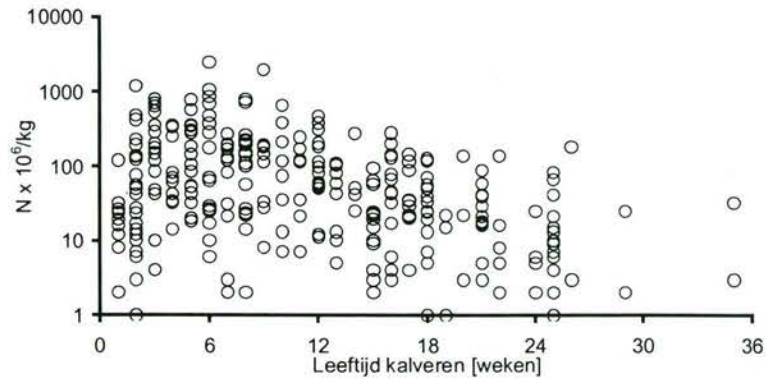


Figuur 4.5 Gehalten *Cryptosporidium* ($N \times 10^6$ per kg) in positieve mengmonsters mest van vleeskalveren naar leeftijd.

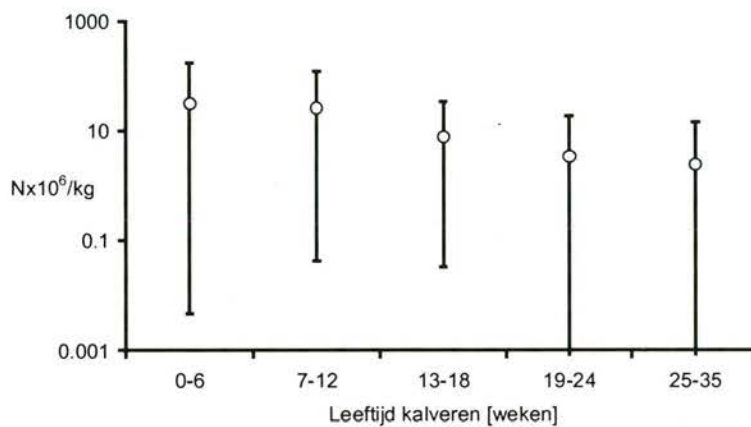


Figuur 4.6 Gemiddeld gehalte *Cryptosporidium* ($N \times 10^6/\text{kg}$) en 95%-interval in positieve monsters mest van vleeskalveren naar leeftijd.

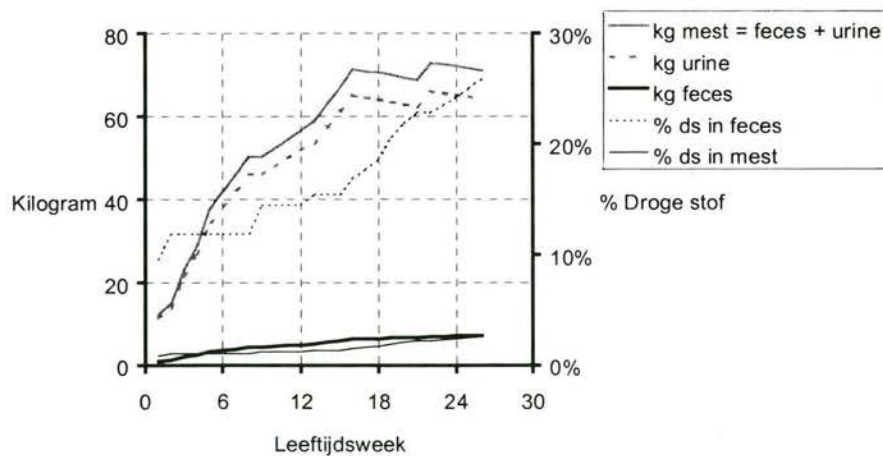
In de literatuur worden maximale gehalten van 10^9 - 10^{10} per kg feces bij kalveren gemeld (Casemore *et al.*, 1997). De gemiddelde gehalten *Giardia* in mest van vleeskalveren vertonen een maximum rond de leeftijd van 6 weken en nemen dan ook af met de leeftijd, zij het minder sterk dan de gemiddelde gehalten *Cryptosporidium*.



Figuur 4.7 Gehalten *Giardia* ($N \times 10^6$ per kg) in positieve mengmonsters mest van vleeskalveren naar leeftijd.



Figuur 4.8 Gemiddeld gehalte *Giardia* (N/ kg) en 95%-interval in positieve monsters mest van vleeskalveren naar leeftijd.



Figuur 4.9 Mestproductie bij wit-vlees-kalveren naar leeftijd (ILOB-TNO Wageningen). ds = droge stof.

In figuur 4.9 is de mestproductie van wit-vlees-kalveren naar leeftijd gegeven. Dit betreft gegevens afkomstig van onderzoek naar de mestproductie bij 20 wit-vlees-kalveren van het ILOB-TNO te Wageningen en bewerkt door het Informatie Kenniscentrum Landbouw (IKCLB). Hierin valt af te lezen, dat de mestproductie toeneemt met de leeftijd. Het gehalte aan droge stof van verse feces neemt toe met de leeftijd van 9,5 naar 26%. Het gehalte aan droge stof van de mest vermengd met urine ligt een factor 10 lager en loopt op met de leeftijd van 0,8 tot 2,5%. Ter vergelijking is het gehalte aan droge stof van 48 monsters mest van vleeskalveren in de leeftijd van 1 tot 35 weken (1-3 monsters per leeftijdsweek) bepaald door enkele dagen drogen bij 105 °C. Gemiddeld bedroeg dit gehalte aan droge stof 14% en varieerde tussen 5 en 28%. Dit laat zien dat inderdaad verse mest is onderzocht op protozoa. Er werd echter geen relatie gevonden tussen het gehalte aan droge stof en de leeftijd van de kalveren. In het onderzoek naar protozoa werd mest van zowel wit-vlees-kalveren als rose-vlees-kalveren bemonsterd. Er zijn in Nederland ongeveer 6 keer zoveel wit-vlees-kalveren als rose-vlees-kalveren (zie tabel 4.3). De voeding van rose-vlees-kalveren is anders dan die van wit-vlees-kalveren, bovendien worden rose-vlees-kalveren pas ongeveer 10 weken later geslacht. De berekening van de totale emissie aan protozoa is echter beperkt tot vleeskalveren tot de leeftijd van 24 weken, en er is geen onderscheid gemaakt tussen wit-vlees-kalveren en rose-vlees-kalveren. Hierin is dus de bijdrage van rose-vlees-kalveren in de leeftijd van 25-35 weken niet meegenomen.

De aldus berekende jaaremissie door vleeskalveren bedraagt $1,2 \times 10^{15}$ oöcysten van *Cryptosporidium* en $1,8 \times 10^{15}$ cysten van *Giardia* (tabel 4.3). Deze berekening is gebaseerd op metingen in verse mest, welke niet verdund was met urine. Uitgaande van de dusdanig berekende emissies en de jaarlijkse hoeveelheden kalvergier (verse feces + urine + spoelwater) kan een gemiddeld gehalte van $4,6 \times 10^5$ *Cryptosporidium*-oöcysten/kg en $6,9 \times 10^5$ *Giardia*-cysten/kg worden geschat.

Melkkoeien:

Cryptosporidium werd niet aangetoond in de mest van melkkoeien (tabel 4.4). Uit tabel 4.4 blijkt, dat bij slechts één van de 55 onderzochte koppels *Giardia* werd aangetoond in mest van melkkoeien. De tellingen van de 5 mengmonsters van dit positieve koppel waren heel laag (1, 1, 0, 1 en 3 cysten). Een jaaremissie van *Giardia* door melkkoeien is niet berekend, omdat deze schatting zeer onzeker zou zijn.

Tabel 4.4 Resultaten onderzoek mest van melkkoeien*.

koppelgrootte (aantal dieren)	gem. min. max.	64 7 150
<i>Cryptosporidium</i>	aantal positieve koppels/totaal aantal koppels geschat percentage positieve koppels 95% interval	0/55 1,2% 0,092%-58%
<i>Giardia</i>	aantal positieve koppels/totaal aantal koppels geschat percentage positieve koppels 95% interval	1/55 3,0% 0,64%-58%
gem. gehalte <i>Giardia</i> in positieve koppels (N/kg)		$2,0 \times 10^5$
gem. aanwezige aantal dieren per jaar**		$1,6 \times 10^6$
kg mest per dier per jaar***		$2,3 \times 10^4$

* Melkkoeien zijn 3 jaar en ouder; **CBS-Landbouwdatabank 1980-1997; ***Van Eerd (1998).

Niet inbegrepen zijn $1,6 \times 10^6$ stuks jongvee, met een mestproductie van $1,24 \times 10^4$ kg per dier per jaar.

Vleeskuikens en legkippen:

In de monsters mest van vleeskuikens (tabel 4.5) werden noch oöcysten van *Cryptosporidium*, noch cysten van *Giardia* aangetoond. Ook in de monsters mest van legkippen (tabel 4.6) werden geen cysten van *Giardia* gevonden, maar oöcysten van *Cryptosporidium* werden wel aangetoond bij 4 van 16 koppels met legkippen jonger dan 18 weken en bij 2 van 50 koppels met legkippen gelijk aan of ouder dan 18 weken. Dit zou *Cryptosporidium baileyi* kunnen zijn, maar nadere typering is nodig om hierover uitsluitel te kunnen geven.

Er werden geen significante correlaties gevonden tussen de combinaties leeftijd-monsterdatum, leeftijd-koppelgrootte, monsterdatum-koppelgrootte, **of** tussen gehalten *Cryptosporidium* en leeftijd, monsterdatum en koppelgrootte. Figuur 4.10 toont de leeftijdsverdeling van de bemonsterde legkippen. Ook dit geeft een random spreiding van de leeftijd te zien. Er werden echter 3 maal zoveel koppels met kippen ouder dan 18 weken onderzocht als koppels met legkippen jonger dan 18 weken. Bij de berekening van jaaremissies bij legkippen is onderscheid gemaakt naar mestproductie van legkippen jonger, respectievelijk ouder dan 18 weken. De jaaremissie door legkippen bedraagt $4,2 \times 10^{14}$ oöcysten van *Cryptosporidium* (tabel 4.6).

Tabel 4.5 Resultaten onderzoek mest van vleeskuikens.

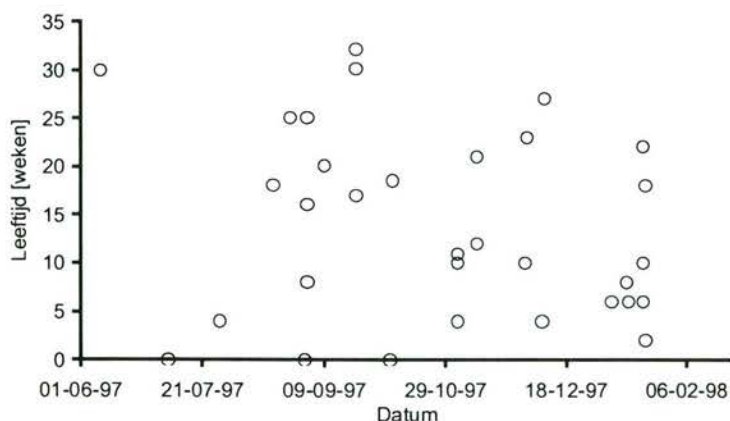
leeftijd (weken)		
	gem.	4,4
	min.	1
	max.	6
koppelgrootte (aantal dieren)		
	gem.	$2,3 \times 10^4$
	min.	$4,8 \times 10^3$
	max.	$7,5 \times 10^4$
<i>Cryptosporidium</i>		
aantal positieve koppels/totaal aantal koppels		0/42
geschat percentage positieve koppels		1,6%
95% interval		0,12%-59%
<i>Giardia</i>		
aantal positieve koppels/totaal aantal koppels		0/42
geschat percentage positieve koppels		1,6%
95% interval		0,12%-59%
gem. aanwezige aantal dieren per jaar*		$4,5 \times 10^7$
kg mest per dier per jaar**		11

*CBS-Landbouwdatabank 1980-1997; **Van Eerd (1998).

Tabel 4.6 Resultaten onderzoek mest van legkippen.

		< 18 weken	≥ 18 weken
leeftijd (weken)			
	gem.	8,4	50
	min.	2	18
	max.	17	104
koppelgrootte (aantal dieren)			
	gem.	$2,2 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$
	min.	$1,1 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$
	max.	$9,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$
<i>Cryptosporidium</i>			
aantal positieve koppels/totaal aantal koppels		4/16	2/50
geschat percentage positieve koppels		27%	5,0%
95% interval		10%-749%	1,0%-61%
<i>Giardia</i>			
aantal positieve koppels/totaal aantal koppels		0/16	0/50
geschat percentage positieve koppels		4,0%	1,3%
95% interval		0,30%-64%	0,10%-58%
gem. gehalte <i>Cryptosporidium</i> in positieve monsters (N/kg)		$7,8 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
aantal dieren per jaar*		$1,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
kg mest per dier per jaar**		16	32
jaaremissie <i>Cryptosporidium</i> (N/jaar)		$4,2 \times 10^{14}$	

*CBS-Landbouwdatabank 1980 - 1997; **Van Eerd (1998).



Figuur 4.10 Leeftijd van legkippen per koppel naar monsterdatum.

4.6.2 *Cryptosporidium* en *Giardia* in kalvergier, ingedikte mest en effluent van een kalvermestverwerkingsbedrijf

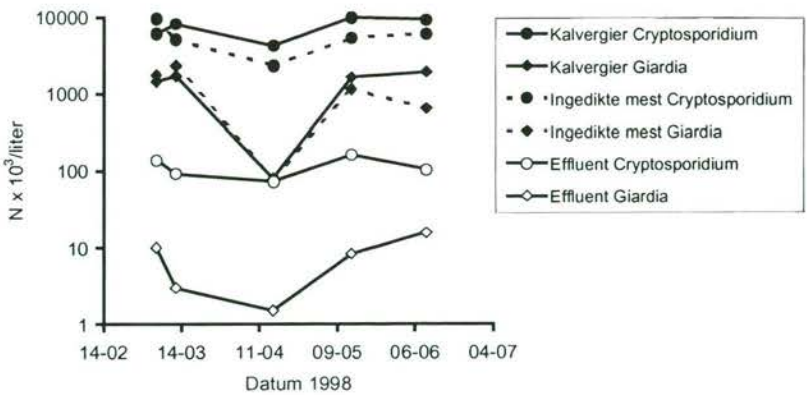
In tabel 4.7 zijn de resultaten samengevat naar het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* bij een kalvermestverwerkingsbedrijf. De gemeten gehalten gedurende de meetperiode zijn uitgezet in figuur 4.11. Gedurende de vier maanden van onderzoek is in kalvergier het gehalte *Cryptosporidium* vrij constant ($4,2 \times 10^6$ - $9,8 \times 10^6$ oöcysten/l). In de ingedikte mest zijn deze gehalten nagenoeg hetzelfde ($2,3 \times 10^6$ - $9,5 \times 10^6$ oöcysten/l). Het gehalte *Cryptosporidium* in het effluent varieert tussen $7,3 \times 10^4$ en $1,6 \times 10^5$ oöcysten/l. De laagste gehalten werden in april gemeten. De gehalten cysten van *Giardia* variëren in kalvergier tussen $8,0 \times 10^4$ en $1,9 \times 10^6$ cysten/l en in ingedikte mest tussen $8,0 \times 10^4$ en $1,8 \times 10^6$ cysten/l. In het effluent variëren de gehalten *Giardia* tussen $1,5 \times 10^3$ en $1,0 \times 10^4$ cysten/l. De kalvergier die in een mestverwerkingsbedrijf wordt verwerkt, kan worden beschouwd als een goed gemengd monster van kalvergier van verschillende bedrijven.

Van de monsters kalvergier zijn er vier na 1 jaar bewaring bij 5 ± 3 °C opnieuw geanalyseerd op *Cryptosporidium* (zie tabel 4.8). Gemiddeld is het gehalte ongeveer een factor twee afgenomen. Dit laat zien dat *Cryptosporidium* in monsters kalvergier, mits koel bewaard, voor lange tijd stabiel is. Met stabiel wordt bedoeld dat de (oö)cysten nog even goed telbaar zijn.

Tabel 4.7 Gehalten en geschatte jaaremissie van *Cryptosporidium* en *Giardia* in kalvergier, ingedikte mest en effluent van een kalvermestverwerkingsbedrijf.

datum	kalvergier*		ingedikte mest*		effluent	
	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
	N × 10 ⁴ /kg	N × 10 ⁴ /kg	N × 10 ⁴ /kg (%)***	N × 10 ⁴ /kg (%)***	N × 10 ³ /liter (%)***	N × 10 ³ /liter (%)***
05-03-98	610 (520)****	140	950 (34%)	180 (27%)	140 (1,8%)	10 (0,54%)
12-03-98	820 (310)****	170	510 (14%)	230 (30%)	93 (0,89%)	3,0 (0,14%)
16-04-98	420	8,0	230 (12%)	8,0 (22%)	73 (1,3%)	1,5 (1,5%)
14-05-98	980 (500)****	160	530 (12%)	110 (15%)	160 (1,3%)	8,3 (0,40%)
10-06-98	920 (430)****	190	600 (14%)	64 (7,3%)	100 (0,88%)	16 (0,64%)
gemiddeld	750	140	570 (17%)	120 (19%)	110 (1,2%)	7,7 (0,44%)
N/jaar**	4,8 × 10 ¹⁵	8,7 × 10 ¹⁴	7,9 × 10 ¹⁴	1,7 × 10 ¹⁴	5,7 × 10 ¹³	3,9 × 10 ¹²

*Kalvergier bevat 2% droge stof en ingedikte mest 5-8%; het soortelijk gewicht van beide is ongeveer 1 kg/liter; **Verwerking van $6,4 \times 10^8$ kg kalvergier per jaar, $1,4 \times 10^8$ kg ingedikte mest per jaar en $5,0 \times 10^8$ liter effluent per jaar door vier grote kalvermestverwerkingsbedrijven; ***Percentages van het aantal protozoa in kalvergier; ****Tussen haakjes is het resultaat van de herhaling van de analyse van *Cryptosporidium* na 1 jaar opslag bij 5 ± 3 °C gegeven.



Figuur 4.11 Gehalten *Cryptosporidium* en *Giardia* ($N \times 10^6$ per liter) in kalvergier, ingedikte mest en effluent van een groot kalvermestverwerkingsbedrijf.

Op basis van de onderzochte monsters verse mest kon een gemiddeld gehalte in kalvergier van $4,6 \times 10^5$ *Cryptosporidium*-oöcysten/kg en $6,9 \times 10^5$ *Giardia*-cysten/kg worden afgeleid. In de voor verwerking aangevoerde kalvergier werd echter een 16 keer hoger gemiddeld gehalte van *Cryptosporidium* en een twee keer hoger gemiddeld gehalte van *Giardia* gevonden dan in verse mest van vleeskalveren. Dit suggereert dat het rendement van de bepaling van *Cryptosporidium* en *Giardia* in verse monsters mest lager was dan in kalvergier. Dit was aanleiding voor nader onderzoek.

Een viertal monsters mest van vleeskalveren werd geselecteerd en opnieuw onderzocht (2^e meting). Deze monsters waren inmiddels 18 maanden bij 5 ± 3 °C opgeslagen en reeds 1:1 verdund met bewaarmedium (kaliumbichromaat). Tevens werd een deel van deze monsters 5 maal verdund met PBS (phosphate buffered saline) om kalvergier te simuleren. De resultaten van dit aanvullende onderzoek zijn weergegeven in tabel 4.8.

Tabel 4.8 Aanvullend onderzoek naar de gehalten van *Cryptosporidium* en *Giardia* in verse mest van vleeskalveren.

RIVM-nr	<i>Cryptosporidium</i> [N/μl]			<i>Giardia</i> [N/μl]		
	1 ^e meting	2 ^e meting	10 × verdund*	1 ^e meting	2 ^e meting	10 × verdund*
105KA456	670	1600	3900	0,17	0	0
105KA457	330	140	310	1,7	63**	15
114KA501	270	460 ^c	2000	80	60***	160
114KA502	180	190 ^d	410	200	37****	160

*2 keer verdund met kaliumbichromaat en 5 keer verdund met PBS; De berekende concentratie in onverdund monster is gegeven;

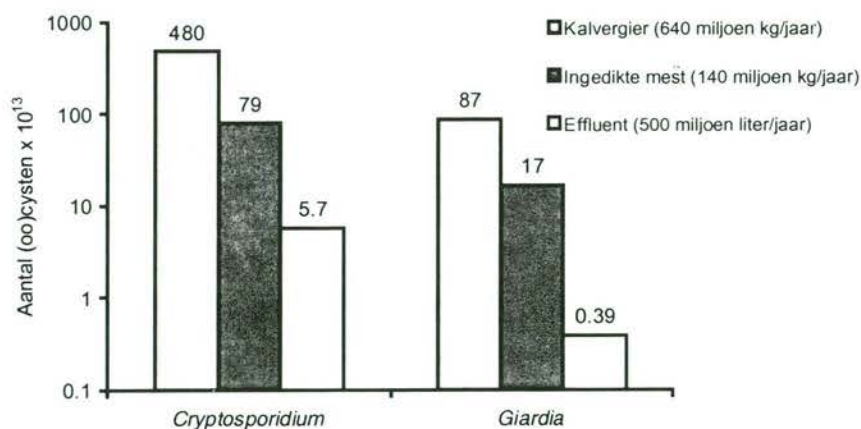
'Rafelige' *Giardia*-cysten; *Zwakke fluorescentie; ****Zeer hoge groene achtergrondfluorescentie.

Hieruit blijkt dat na 18 maanden opslag er geen significante afname heeft plaatsgevonden van de gehalten *Cryptosporidium* en *Giardia*. Uit de spreiding tussen de 1^e en de 2^e meting blijkt dat er een grote mate van heterogeniteit bestaat binnen een monster. De bepaling van het gehalte in de met PBS verdunde mest laat een tot 4 keer hogere concentratie aan oöcysten van *Cryptosporidium* en cysten van *Giardia* zien. Dit toont aan dat het rendement van *Cryptosporidium* en in mindere mate van *Giardia* in verse monsters mest lager is dan in 10 keer verdunde verse mest. Het rendement is bovendien variabel. Het lagere rendement in verse mest wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een combinatie van maskering door vaste deeltjes (de dikte van het preparaat was circa 0,8 mm) en door een hoge achtergrond-fluorescentie. Het gehalte *Cryptosporidium* en *Giardia* in verse mest van vleeskalveren kan derhalve enkele malen onderschat zijn.

Na verwerking van kalvergier tot ingedikte mest zijn 12-34% van de *Cryptosporidium*-oöcysten en 7,3-30% van de *Giardia*-cysten nog aanwezig in de ingedikte mest. In het effluent komen 0,88-1,8% en 0,40-1,5% van respectievelijk *Cryptosporidium* en *Giardia* terecht en worden getransporteerd naar een rioolwaterzuivering. Dit zou kunnen betekenen dat tijdens verwerking van de kalvergier ongeveer 80% van beide protozoa verdwijnt door afbraak. Deze percentages zijn in de tijd redelijk constant. Dit betekent dat het verwerkingsproces constant is. Gezien de lagere rendementen in monsters verse mest is het echter ook mogelijk dat gehalten in de ingedikte mest zijn onderschat.

Op basis van de metingen bij dit kalvermestverwerkingsbedrijf is een schatting gemaakt van de jaaremissie van *Cryptosporidium* en *Giardia* door vier grote kalvermestverwerkingsbedrijven samen (tabel 4.7 en figuur 4.12).

Vrijwel alle kalvergier die verwerkt wordt, komt terecht bij vier grote kalvermestverwerkingsbedrijven. Uit tabel 4.3 en 4.7 valt af te leiden dat ongeveer 25% ($6,4 \times 10^8 / 2,6 \times 10^9 * 100\%$) van alle kalvergier door deze bedrijven wordt verwerkt. Dit houdt in dat 75% van de kalvermest, al dan niet na een bepaalde tijd te zijn opgeslagen, op het land wordt gebracht. Deze hoeveelheid mest bevat op grond van de gemiddelde gehalten gemeten in kalvergier dan nog $1,5 \times 10^{16}$ oöcysten van *Cryptosporidium* en $2,8 \times 10^{15}$ cysten van *Giardia*. Hierbij is nog geen rekening gehouden met effecten van mestopslag en verdere handelingen.



Figuur 4.12 Geschat aantal oöcysten van *Cryptosporidium* en cysten van *Giardia* per jaar in kalvergier, ingedikte mest en effluent van vier grote kalvermestverwerkingsbedrijven.

4.6.3 *Cryptosporidium* en *Giardia* in slachthuisafvalwater

Tabel 4.9 geeft de resultaten weer van het onderzoek van slachthuisafvalwater op *Cryptosporidium* en *Giardia*. *Cryptosporidium* werd bij alle drie de typen slachtbedrijven aangetoond. Dit bevestigt dat *Cryptosporidium* voorkomt bij runderen, varkens en pluimvee. *Giardia* werd zowel in het slachthuisafvalwater van het runderslachthuis, als dat van het varkensslachthuis aangetoond, maar niet in dat van de pluimveeslachterij. Ook dit bevestigt dat *Giardia* ten minste voorkomt bij runderen en varkens. Dit beeld is kwalitatief in overeenstemming met dat van het mestonderzoek voor wat betreft kalveren en pluimvee. Ook daar werden *Cryptosporidium* en *Giardia* beide in mest van vleeskalveren aangetoond, maar in mest van legkippen werd alleen maar *Cryptosporidium* gevonden.

De in tabel 4.9 gegeven gehalten zijn gecorrigeerd voor het gemiddelde rendement van de bepaling. Het rendement van *Cryptosporidium* in deze monsters bedroeg 38% en dat van *Giardia* 68%. De concentraties protozoa in het slachthuisafvalwater komen in orde van grootte overeen met die van oppervlaktewater (Medema *et al.*, 1996; Schijven *et al.*, 1996).

Tabel 4.9 Resultaten onderzoek op *Cryptosporidium* en *Giardia* in slachthuisafvalwater.

	datum	<i>Cryptosporidium</i> * N/liter	<i>Giardia</i> ** N/liter
<i>effluent van runderslachthuis</i>			
	12-03-98	2,5	< 0,11
9,6 × 10 ⁷ liter effluent/jaar	16-04-98	< 0,17	4,0
1,1 × 10 ⁵ runderen/jaar	15-05-98	< 0,13	2,4
	10-06-98	< 0,18	0,87
<i>effluent van varkensslachthuis</i>			
	12-03-98	< 0,17	< 0,17
7,5 × 10 ⁷ liter effluent/jaar	16-04-98	< 0,20	< 0,20
4,3 × 10 ⁵ varkens/jaar	15-05-98	10	14
	10-06-98	2,6	4,4
<i>effluent van pluimveeslachterij</i>			
	12-03-98	< 0,20	< 0,20
4,6 × 10 ⁷ liter effluent/jaar	16-04-98	< 0,11	< 0,11
2,5 × 10 ⁶ stuks pluimvee/jaar	15-05-98	0,66	< 0,13
	10-06-98	< 0,14	< 0,14

*Gecorrigeerd voor het gemiddelde rendement 38%; **gecorrigeerd voor het gemiddelde rendement 68%.

4.6.4 Bacteriologisch en chemisch onderzoek van slachthuisafvalwater en van het effluent van kalvermestverwerking

De resultaten van het chemisch onderzoek van dit water zijn samengevat in tabel 4.10.

Tabel 4.10 Resultaten chemisch onderzoek afvalwater.

afvalwater	datum	zwevende stof (mg/l)	BZV (mg O ₂ /l)	CZV (mg O ₂ /l)	N _{Kj} (mg/l)	NH ₄ (mg/l)
runderslachthuis	16-04-98	100	190	360	29	15
	10-06-98	60	430	721	96	95
varkensslachthuis	16-04-98	80	16	149	7,0	0,50
	10-06-98	30	16	143	11	4,3
pluimveeslachterij	16-04-98	< 10	70	163	46	29
	10-06-98	< 10	27	127	22	16
kalvermestverwerking	16-04-98	140	83	632	42	4,8
	10-06-98	110	26	839	53	7,1

Tabel 4.11 Resultaten bacteriologisch onderzoek in slachthuisafvalwater en effluent van kalvermestverwerking, en geschatte jaaremissies (1997).

	datum	THCOL (kvd/liter)	FSTREP (kvd/liter)	SSRC (kvd/liter)	SCP (kvd/liter)	FRNAPH (pve/liter)
<i>effluent van runderslachthuis</i>						
	12-03-98	$6,2 \times 10^4$	$7,8 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	$4,7 \times 10^2$	$<3,8 \times 10^2$
$9,6 \times 10^7$ liter effluent/jaar	16-04-98	$1,2 \times 10^6$	$4,1 \times 10^4$	$5,7 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$	$3,5 \times 10^4$
$1,1 \times 10^5$ runderen/jaar	15-05-98	$1,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	$3,4 \times 10^2$	$8,4 \times 10^4$
	10-06-98	$6,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	$5,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$9,5 \times 10^3$
gemiddeld gehalte		$7,7 \times 10^5$	$6,3 \times 10^4$	$7,7 \times 10^3$	$6,4 \times 10^2$	$4,3 \times 10^4$
<i>effluent van varkensslachthuis</i>						
	12-03-98	$>6,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$>6,4 \times 10^4$	$6,1 \times 10^2$	$2,5 \times 10^5$
$7,5 \times 10^7$ liter effluent/jaar	16-04-98	$2,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$9,3 \times 10^3$	$3,2 \times 10^4$
$4,3 \times 10^5$ varkens/jaar	15-05-98	$2,7 \times 10^6$	$9,7 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$2,2 \times 10^3$	$>1,0 \times 10^7$
	10-06-98	$3,9 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$
gemiddeld gehalte		$1,8 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$	$8,4 \times 10^4$	$3,4 \times 10^3$	$1,0 \times 10^5$
<i>effluent van pluimveeslachterij</i>						
	12-03-98	$4,1 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	$5,7 \times 10^3$	$4,5 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$
$4,6 \times 10^7$ liter effluent/jaar	16-04-98	$5,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$4,6 \times 10^3$	$4,2 \times 10^3$	$<1,0 \times 10^3$
$2,5 \times 10^6$ stuks pluimvee/jaar	15-05-98	$7,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$4,1 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$1,3 \times 10^6$
	10-06-98	$1,7 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$	$3,3 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
gemiddeld gehalte		$3,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$4,4 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$3,2 \times 10^5$
<i>effluent van kalvermestverwerking</i>						
	12-03-98	$1,9 \times 10^5$	$>5 \times 10^6$	$>5 \times 10^6$	$>5 \times 10^6$	$<1,5 \times 10^3$
$5,0 \times 10^8$ liter effluent/jaar	16-04-98	$3,4 \times 10^4$	$2,7 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	$<1,5 \times 10^3$
	15-05-98	$1,7 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$6,6 \times 10^4$	$<1,5 \times 10^3$
	10-06-98	$1,2 \times 10^4$	$1,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	$<1,5 \times 10^3$
gemiddeld gehalte		$1,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	

Het gehalte aan zwevende stof is het laagst in het afvalwater van de pluimveeslachterij. BZV is vooral hoog in het afvalwater van het runderslachthuis en CZV is hoog in het afvalwater van het runderslachthuis en van de kalvermestverwerking. Kjeldahl-stikstof (N_{Kj}) is voor al het onderzochte afvalwater in dezelfde orde van grootte. NH_4 is het hoogst in het afvalwater van het runderslachthuis.

De resultaten van het bacteriologisch onderzoek van slachthuisafvalwater en van het effluent van kalvermestverwerking zijn samengevat in tabel 4.11. De gemiddelde gehalten van de onderzochte bacteriën in het afvalwater van het varkensslachthuis en de pluimveeslachterij liggen in dezelfde orde van grootte, die van het runderslachthuis liggen ongeveer een factor 10 lager. In het effluent van de kalvermestverwerking liggen

de gehalten THCOL lager dan die in slachthuisafvalwater, maar de gehalten FSTREP, SSRC en SCP zijn 10-100 keer hoger. FRNAPH werden niet aangetoond in het effluent van de kalvermestverwerking.

4.7 Discussie en conclusies

In dit onderzoek zijn gehalten (oö)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia* gemeten in een groot aantal monsters mest van landbouwhuisdieren. De spreiding in gehalten in mest was zeer groot, vooral van *Cryptosporidium*-oöcysten.

De emissie van cysten van *Giardia* via mest van melkkoeien is nog onzeker, daar deze geschat is op basis van slechts vier positieve monsters van één positief koppel. Daarbij werden lage aantallen (1-3) geteld. *Cryptosporidium* werd in mest van melkkoeien niet aangetoond. Er wordt echter een gemiddeld gehalte van 9×10^4 oöcysten per kg feces van volwassen runderen ($2,5 \times 10^4$ - $1,8 \times 10^7$) gemeld in de literatuur (Casemore *et al.*, 1997). Uitgaande van een detectiegrens van 4×10^4 oöcysten per kg feces en het feit dat mengmonsters van meerdere dieren onderzocht werden, zou kunnen betekenen dat de *Cryptosporidium*-gehalten in de mengmonsters mest van melkkoeien onder de detectiegrens lagen. Gezien de grote hoeveelheden mest van melkkoeien, kunnen ze toch nog een significante emissiebron vormen. Om bij melkkoeien toch *Cryptosporidium* aan te kunnen tonen, zou mest van individuele dieren onderzocht moeten worden.

Mest van vleeskalveren vormt een belangrijke emissiebron van beide protozoa. Uit het onderzoek van verse mest is gebleken, dat de gehalten protozoa in mest van vleeskalveren onderschat worden. De geschatte emissies op basis van de metingen in kalvergierveld geven een realistischer beeld.

De emissie van *Cryptosporidium* via mest van legkippen is minder van betekenis. Vermoedelijk betreft het hier *Cryptosporidium baileyi*, die geen zoönotische betekenis heeft (Fayer *et al.*, 1997).

Hoewel mest van met name vleeskalveren een grote emissiebron is van *Cryptosporidium* en *Giardia*, is de bijdrage aan de daadwerkelijke belasting van het oppervlaktewater onbekend. Voor wat betreft *Cryptosporidium* is de geschatte jaaremissie via lozing van gezuiverd effluent van kalvermestverwerking 25 keer kleiner dan de jaaremissie via (on)gezuiverd huishoudelijk afvalwater in Nederland en die van *Giardia* is verwaarloosbaar. Die jaaremissie vindt echter wel heel lokaal plaats en kan dus lokaal wel een grote invloed op de oppervlaktewaterkwaliteit hebben.

De gehalten *Cryptosporidium* en *Giardia* in slachthuisafvalwater zijn laag en zijn in orde van grootte hetzelfde als de gehalten in oppervlaktewater (Schijven *et al.*, 1996). Derhalve lijkt de bijdrage van slachthuisafvalwater aan de emissie van *Cryptosporidium* en *Giardia* naar het oppervlaktewater verwaarloosbaar. Uit het onderzoek van het slachthuisafvalwater blijkt wel, dat varkens besmet zijn met zowel *Cryptosporidium* als met *Giardia*. In de literatuur worden prevalenties van 5 tot 22% van *Cryptosporidium* bij biggen genoemd (Sanford, 1987; Tacal *et al.*, 1987; Quillez *et al.*, 1997). Uit onderzoek van Quillez *et al.* (1997) bleek de infectie in 90% van de gevallen asymptomatisch te verlopen en werden lage aantallen (0-1 per microscopisch beeldveld bij 200x vergroting) aangetroffen in monsters mest.

De volgende conclusies kunnen worden getrokken:

1. Vleeskalveren vormen een grote emissiebron van *Cryptosporidium* en *Giardia*. Het effluent van kalvermestverwerking levert een ondergeschikte bijdrage van *Cryptosporidium* aan het oppervlaktewater. Tijdens het indikken van kalvermest bij kalvermestverwerkingsbedrijven sterft 80% van de *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten in de aangevoerde mest af. Onbekend is nog in welke mate deze protozoa door uit- en afspoeling van op het land gebrachte mest in het oppervlaktewater terecht kunnen komen.
Effluent van kalvermestverwerking is in vergelijking met de totale emissie via huishoudelijk afvalwater slechts een geringe bron. Lokaal kan deze bron echter wel van grote betekenis zijn.
2. In mest van melkkoeien zijn ook *Giardia*-cysten aangetoond, maar deze emissiebron is onvoldoende gekwantificeerd.
3. Jong melkvee is een potentieel belangrijke emissiebron, die nog niet is onderzocht.
4. *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn niet in mest van vleeskuikens aangetoond, derhalve levert deze mest geen bijdrage van betekenis aan de emissie.
5. Legkippen vormen een belangrijke emissiebron voor *Cryptosporidium*. Dit zou echter *Cryptosporidium baileyi* kunnen zijn, welke niet pathogeen voor de mens is, maar de species is niet getypeerd.
6. Varkens blijken op grond van het onderzoek van het slachthuisafvalwater besmet te zijn met *Cryptosporidium* en *Giardia*. De emissie via hun mest is nog niet onderzocht.
7. Slachthuisafvalwater levert geen bijdrage van betekenis aan de lozing van *Cryptosporidium* en *Giardia* op het oppervlaktewater. Slachthuisafvalwater van vleeskalveren is echter nog niet onderzocht, derhalve is de bijdrage hiervan aan lozingen op het oppervlaktewater nog onbekend.

4.8 Aanbevelingen

Op basis van het onderzoek aan kalvergier werd een hoge emissie van *Cryptosporidium* en *Giardia* door vleeskalveren berekend. Ten gevolge van een lager rendement van de bepaling van de concentraties in verse monster mest van vleeskalveren werd de emissie van *Cryptosporidium* en *Giardia* onderschat. Het verdient aanbeveling onderzoek te doen naar het rendement van de concentraties in verse monsters mest om een emissieberekening op basis van deze monsters te kunnen maken.

Het ligt in de verwachting dat ook jong melkvee een belangrijke emissiebron vormt. Het verdient derhalve aanbeveling om mest van jong melkvee ook op deze protozoa te onderzoeken.

Gezien de besmettingsgraad in mest van vleeskalveren, verdient het aanbeveling om het afvalwater van slachthuizen voor vleeskalveren te onderzoeken.

Tevens verdient het aanbeveling om monsters mest van varkens te onderzoeken op *Cryptosporidium* en *Giardia*. Gezien het feit dat slachthuisafvalwater van varkens positief is voor deze protozoa en gezien de aanzienlijke mestproductie van varkens, vormen deze dieren eveneens een belangrijke potentiële emissiebron van *Cryptosporidium* en *Giardia*.

Vleeskalveren en kalvergier vormen een belangrijke potentiële emissiebron van *Cryptosporidium* en *Giardia* op het oppervlaktewater. Kalvermestverwerkingsbedrijven leveren lokaal waarschijnlijk een grote bijdrage aan de oppervlaktewaterverontreiniging. Aanbevolen wordt het ontvangende oppervlaktewater daarop te onderzoeken, met name waar het zwemgelegenheden of innamepunten voor drinkwatervoorziening kan beïnvloeden. Nader onderzoek naar de uit- en afspoeling van deze protozoa in de mest op het land is noodzakelijk om de werkelijke bijdrage aan de vracht te bepalen. Dit houdt zowel observationeel onderzoek van opslag en verwerking van mest en van mest op het land in, als ontwikkeling van rekenmodellen om de route van pathogene protozoa via mest naar oppervlaktewater op nationale schaal te berekenen. Dan pas kan de bijdrage van landbouwhuisdieren aan de concentraties *Cryptosporidium* en *Giardia* in oppervlaktewater worden vergeleken met die van de mens.

(Sub)Species-typering van *Cryptosporidium* dient te worden uitgevoerd, om met name tussen *Cryptosporidium baileyi* en *C. parvum* genotypen een onderscheid te kunnen maken. *C. baileyi* is niet van betekenis voor de volksgezondheid. Als bevestigd kan worden dat via mest van pluimvee alleen *C. baileyi* wordt geloosd, dan hoeft *Cryptosporidium* in de mest van pluimvee niet te worden meegerekend voor de belasting van het oppervlaktewater.

Verder moleculair-epidemiologische onderzoek is nodig in aanvulling op de hier verzamelde kwantitatieve gegevens om inzicht te verkrijgen in het belang van de verschillende transmissieroutes van de verschillende diersoorten naar de mens.

5 Oppervlaktewater

5.1 Inleiding

In veel binnen- en buitenlandse onderzoeken zijn *Giardia*-cysten en *Cryptosporidium*-oöcysten in het oppervlaktewater aangetroffen. De gemiddelde gehalten in Amerikaanse en Britse studies liggen rond de 0,1-1 (oö)cyst per liter met maxima van enkele honderden per liter (o.a. Rose *et al.*, 1991; Ongerth & Stibbs, 1987; LeChevallier *et al.*, 1991a; Payment & Franco, 1993). Het hoogste gehalte *Cryptosporidium* (5800/l) is aangetroffen in irrigatiekanalen van een gebied met intensieve veeteelt (Madore *et al.*, 1987). Op het vaste land van Europa zijn nog relatief weinig studies naar het voorkomen van de protozoa uitgevoerd. Exner & Gornik (1991) vonden in Noordrijn-Westfalen dat 7 van de 9 monsters positief (78%) waren voor *Cryptosporidium*. Het gehalte varieerde van 0,7 tot 41 oöcysten per liter. Karanis & Seitz (1996) vonden in het ruwe water van 6 waterleidingbedrijven gemiddelde gehalten van 0,5 cysten en 1 oöcyst per liter. Het percentage positieve monsters bedroeg respectievelijk 61 en 45%, terwijl maxima van 3,2 cysten en 8,3 oöcysten per liter bepaald werden. Bij een bisamrat-burcht werden 90 cysten per liter gevonden en na hoogwater 80 oöcysten per liter. Feuerpfeil & Bischoff (1998) onderzochten in de periode februari 1994 - april 1996 (135 monsters) de toestromen van het stuwmeer Dröda (Sachsen, Duitsland) en het stuwmeer zelf. 64% van de monsters was positief voor *Giardia* en 74% was positief voor *Cryptosporidium*. Maximale gehalten waren respectievelijk 0,26 cysten en 0,33 oöcysten per liter. In één van de toestromen werd als gevolg van een verontreiniging van de beek met huishoudelijk afvalwater van een dorpje een maximaal gehalte gemeten van 1,8 cysten per liter. 5 analyses van kalverfeces waren allemaal positief voor *Cryptosporidium* en ook op de bodem van het stuwmeer werden positieve monsters gevonden (tot 4 oöcysten per 60 ml sediment).

5.1.1 Voorkomen in Nederlands oppervlaktewater

In Nederland is het voorkomen van *Giardia* in het oppervlaktewater voor het eerst aangetoond door Medema (1992). Te Andijk (IJsselmeer) werden 2 cysten per liter aangetroffen en te Keizersveer (Maas) 4 cysten per liter. *Cryptosporidium*-oöcysten in Nederlands oppervlaktewater werden voor het eerst aangetoond in 1993 in de Maas bij Keizersveer (Ketelaars *et al.*, 1995). Maximaal werden 0,02 cysten per liter gevonden en slechts 11,5% van de monsters was positief voor *Cryptosporidium*. Voor *Giardia* waren deze

waarden respectievelijk 0,78 cysten per liter en 59,6%. In 1994 bedroegen de rekenkundig gemiddelde (jaar)gehalten in de Maas te Keizersveer 0,06 oöcysten en 0,1 cysten per liter, terwijl in het voorjaar van 1995 deze waarden respectievelijk 0,12 en 4,9 bedroegen (Ketelaars *et al.*, in prep.). De resultaten van het RIWA/RIVM-onderzoek van Rijn en Maas in het najaar van 1995 zijn weergegeven in tabel 5.1.

Tabel 5.1 Resultaten van het onderzoek naar *Cryptosporidium* en *Giardia* in Rijn en Maas in week 40-48, 1995.

<i>Cryptosporidium</i>					
	n monsters	n positief	gehalte (n/l)*		
			rek. gem.	min.	max.
Maas					
Tailfer	4	4	34	1,3	100
Eijsden	4	4	5,3	1,9	13
Keizersveer	4	4	4,1	0,6	10
Rijn					
Lobith	5	5	4,5	0,6	9,4
Zwolle	5	3	4,3	<0,1	19
Nieuwegein	5	3	12	<0,1	32

<i>Giardia</i>					
	n monsters	n positief	gehalte (n/l)*		
			rek. gem.	min.	max.
Maas					
Tailfer	4	4	94	29	180
Eijsden	4	4	95	38	210
Keizersveer	4	4	19	0,8	35
Rijn					
Lobith	5	5	22	7,5	33
Zwolle	5	5	24	12	57
Nieuwegein	5	5	13	0,8	19

* Gecorrigeerd voor het rendement: *Cryptosporidium*: 16%, *Giardia*: 12%.

In het Twentekanaal (inamepunt WMO) waren in het voorjaar van 1995 alle 13 wekelijks genomen monsters positief voor zowel *Giardia* als *Cryptosporidium* (Kruidenier & Medema, 1996). De range varieerde respectievelijk van 0,24-1,29 en 0,13-1,59 (oö)cysten per liter. In een onderzoek van Nobel en Hoogenboezem (1998) naar protozoa in het IJsselmeer bij Andijk (inamepunt PWN en WRK3) over de periode september 1996 - september 1997 varieerden de aantallen in de maandelijkse monsters van < 0,05-2,6 oöcysten per liter en van < 0,1-5,2 cysten per liter.

Ook bij andere waterleidingbedrijven (DELTA, DZH, GWA, WG, WML, WMN en WRK) is onderzoek uitgevoerd naar het voorkomen van beide parasieten. Bij al deze bedrijven zijn zowel *Cryptosporidium* als *Giardia* aangetroffen, zowel in water dat ver-

ontreinigd is door huishoudelijk afvalwater als in water dat voornamelijk verontreinigd is door (extensieve) veehouderij en in water dat verontreinigd is door watervogels en andere natuurlijke fauna. De grootte-orde van de gehalten van de parasieten was afhankelijk van de mate van fecale besmetting van het water.

5.1.2 Voorkomen in Belgisch oppervlaktewater

In België werd de aanwezigheid van *Giardia* en *Cryptosporidium* in water tot nu toe niet routinematig gevolgd. Momenteel zijn alleen de laboratoria van de SWDE (Société Wallonne de Distribution d' Eau) en de AWW in staat de aanwezigheid in water te bepalen.

In het RIWA-onderzoek van 1995 zijn van de locatie Tailfer resultaten beschikbaar gekomen (Medema *et al.*, 1996; zie tabel 5.1).

Door het Studie- en Samenwerkingsverband Vlaams Water (SVW) wordt momenteel een project uitgevoerd waarbij gedurende 1 jaar maandelijks op 5 locaties de aanwezigheid van *Giardia* en *Cryptosporidium* wordt nagegaan. De locaties omvatten zowel oppervlaktewater als water uit zuiveringsprocessen uit verschillende gebieden in Vlaanderen.

Wat betreft drinkwater werden ook op initiatief van enkele drinkwaterbedrijven analyses uitgevoerd. AWW heeft in de loop van 1998 de aanwezigheid van *Giardia* en *Cryptosporidium* in twee drinkwatermonsters laten onderzoeken. De resultaten waren negatief: er werden geen (oö)cysten in het drinkwater aangetroffen.

5.2 Doelen van het onderzoek

In deze studie is het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in oppervlaktewater dat wordt gebruikt voor de productie van drinkwater onderzocht. Het monitoringsprogramma is zo gekozen, dat het mogelijk is seizoensvariaties en pieken in de gehalten aan *Cryptosporidium* en *Giardia* waar te nemen, om een indruk te krijgen van de variatie in de gehalten.

Op basis van de gemeten gehalten bij de innamepunten is een inschatting gemaakt van de benodigde verwijderingscapaciteit van de zuiveringen.

Daarnaast is de 'import' van beide parasieten via de Rijn en de Maas onderzocht door de aantallen te meten in de Rijn bij Lobith en de Maas bij Eijsden. Op deze locaties zijn tevens de aantallen enterovirussen gemeten, om ook van deze pathogenen een kwantitatieve maat te krijgen van de 'import' via Rijn en Maas.

Naast de metingen van protozoa en virussen is een aantal andere waterkwaliteitsparameters gemeten, om te kunnen vaststellen of deze waterkwaliteitsparameters een verband hebben met het gehalte van de ziekteverwekker. Dat geeft informatie over de oorsprong van de verontreinigingen en het vermogen van waterkwaliteitsparameters om het voorkomen van (pieken van) *Cryptosporidium*, *Giardia* en enterovirussen te voorspellen.

5.3 Selectie locaties

Er is een aantal locaties geselecteerd waarin het Belgische en Nederlandse deel van het stroomgebied van de Maas oppervlaktewater wordt gewonnen voor drinkwater. Ook is op de grensovergang van de Maas tussen België en Nederland gemeten om voor Nederland de buitenlandse aanvoer te kunnen bepalen.

- Maas bij Tailfer, een innamepunt van BIWM.
- Albertkanaal bij Broechem, een innamepunt van AWW.
- Maas bij Eijsden. Grensovergang.
- Lateraal kanaal bij Heel, een innamepunt van WML.
- Maas bij Keizersveer, 7 km voor het innamepunt van WBB.
- Afgedamde Maas bij Brakel, het innamepunt van DZH.

Aanvullend is onderzoek gedaan naar de bijdrage van het polderwater dat vlak voor het innamepunt van DZH op de afgedamde Maas wordt uitgeslagen.

In het Rijnstroomgebied zijn alleen in het Nederlandse deel locaties geselecteerd. Ook hier is bij de grensovergang Duitsland-Nederland gemeten, om de buitenlandse aanvoer te kunnen bepalen.

- Rijn bij Lobith. Grensovergang.
- Lekkanaal bij Nieuwegein, het innamepunt van WRK1 en 2.
- Amsterdam-Rijnkanaal bij Loenen, een innamepunt van GWA.
- IJsselmeer bij Andijk, het innamepunt voor PWN en WRK3.
- Twentekanaal bij Enschede, een innamepunt van de WMO. Deze locatie wordt in de praktijk niet door de Rijn beïnvloed, omdat dit kanaal afwatert op de IJssel. De terugstroom naar het bovenpand in Enschede wordt voorkomen door een stuw. Het water op deze locatie is vooral afstromend water van het agrarische gebied ten zuiden van Enschede. Er vindt geen lozing van een rwzi plaats op het bovenpand (gegevens WMO).

5.4 Bemonstering

De bemonstering van de oppervlaktewateren is uitgevoerd van mei 1997 tot mei 1998. De locaties werden maandelijks bemonsterd. De monsters zijn genomen door RIZA (Lobith en Eijsden), WBB (Tailfer, Albertkanaal, Keizersveer, Afgedamde Maas, Polderwater), PWN (Twentekanaal, Amsterdam-Rijnkanaal en IJsselmeer) en Kiwa (Lateraal kanaal en Lekkanaal).

Voor het onderzoek naar *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn monsters van circa 200 l genomen. Voor onderzoek naar entero- en reovirussen zijn circa 100 l monsters genomen. Voor de bacteriologische parameters en de F-specifieke RNA-fagen is 1 l bemonsterd. De bemonstering voor chlorofyl-a was eveneens 1 l. De monsters zijn gekoeld naar het laboratorium getransporteerd. De bemonsteringsmethoden zijn weergegeven in hoofdstuk 2.

5.5 Onderzoek

De volgende analyses zijn verricht:

- *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten. Op elk van de locaties is driemaal een extra monster genomen dat ter plekke kunstmatig is besmet met een bekende hoeveelheid (oö)cysten, om het rendement van de meetmethode vast te stellen.
- Enterovirussen en reovirussen (alleen voor Lobith en Eijsden).
- Bacteriologische parameters:
 - thermotolerante bacteriën van de coligroep
 - fecale streptococci
 - sporen van sulfietreducerende clostridia
 - sporen van *Clostridium perfringens*
- F-specifieke RNA-fagen
- Troebelheid
- pH
- Temperatuur
- Debiet
- Chlorofyl-a

De gebruikte analysemethoden zijn weergegeven in hoofdstuk 2.

5.6 Data-evaluatie

Per locatie zijn de resultaten van het protozoa-onderzoek (gecorrigeerd voor het rendement van de meetmethode) uitgedrukt middels beschrijvende statistiek. Datzelfde is gedaan voor de overige microbiologische parameters.

Om vast te stellen of er correlaties bestaan tussen waterkwaliteitsparameters en de protozoa en enterovirussen, is de product-moment correlatiecoëfficiënt berekend. Alle gemeten gehalten micro-organismen zijn middels een 10 log-transformatie genormaliseerd, voordat de correlatiecoëfficiënt werd berekend. De correlatiecoëfficiënt is berekend voor alle onderzochte oppervlaktewateren gezamenlijk, voor het Maas- en Rijnstroomgebied afzonderlijk en voor elke individuele locatie. Hiermee werd bepaald hoe sterk de correlatie was.

Daarnaast zijn de gemeten gehalten bij de innamepunten gebruikt voor het berekenen van de benodigde verwijderingscapaciteit om de protozoa zodanig te verwijderen, dat de veiligheid van drinkwater kan worden gegarandeerd. Uitgangspunt daarbij waren de maximale toelaatbare aantallen *Cryptosporidium* en *Giardia* in drinkwater, zoals opgenomen in het concept-beleidsstandpunt van VROM over het omgaan met infectierisico's van drinkwater (VROM, 1995). Deze aantallen zijn respectievelijk $2,2 \times 10^{-5}$ per liter en $5,5 \times 10^{-6}$ per liter.

5.7 Resultaten

5.7.1 Voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia*

Cryptosporidium en *Giardia* zijn op alle onderzochte locaties aangetroffen. Beide parasieten komen op deze locaties dus algemeen voor in het oppervlaktewater. In tabel 5.2 en 5.3 wordt een overzicht gegeven van de kentallen in het Maas- en het Rijnstroomgebied.

In vergelijking met het RIWA/RIVM-onderzoek uit 1995 liggen de gehalten uit dit onderzoek in dezelfde ordegrootte. Alleen voor *Cryptosporidium* in de Maas bij Eijsden en de Rijn bij Lobith zijn in deze studie beduidend (10-20x) hoger dan in de eerdere studie. Het *Giardia*-gehalte was in 1997-1998 vooral in het Lekkanaal hoger dan in 1995. Dit is vooral toe te schrijven aan een eenmalige zeer hoge meting.

Tabel 5.2 Kentallen over het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in het Maasstroomgebied in de periode mei 1997 - mei 1998. De getallen zijn gecorrigeerd voor het rendement en afgerond op twee significante cijfers.

<i>Cryptosporidium</i>						
locatie	Tailfer	Albertkanaal	Eijsden	Lateraal kanaal	Keizersveer	Afgedamde Maas
aantal waarnemingen	12	12	14	12	12	12
% positieve monsters	67	50	93	75	75	33
rekenkundig gemiddelde (n/l)	19	13	57	5,8	4,2	1,4
geometrisch gemiddelde (n/l)	8,6	7,4	28	6,9	3,2	1,6
standaardafwijking	30	27	60	7,2	4,8	2,6
minimum (n/l)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
P10 (n/l)	0,0	0,0	9,0	0,0	0,0	0,0
mediaan (n/l)	12	3,6	34	4,0	2,8	0,0
P90 (n/l)	32	23	110	12	8,2	4,7
maximum (n/l)	110	96	220	25	16	8,1

<i>Giardia</i>						
aantal waarnemingen	12	12	14	12	12	12
% positieve monsters	100	67	100	100	92	75
rekenkundig gemiddelde (n/l)	39	4,0	74	21	10	1,5
geometrisch gemiddelde (n/l)	23	2,2	47	16	5,3	0,69
standaardafwijking	38	4,5	46	16	11	1,9
minimum (n/l)	1,2	0,0	2,5	3,5	0,0	0,0
P10 (n/l)	12	0,0	11	7,8	0,66	0,0
mediaan (n/l)	25	2,6	81	15	8,1	0,65
P90 (n/l)	95	11	120	44	21	3,4
maximum (n/l)	120	12	150	53	40	6,4

Tabel 5.3 Kentallen over het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in het Nederlandse deel van het Rijnstroomgebied in de periode mei 1997 – mei 1998. De getallen zijn gecorrigeerd voor het rendement en afgerond op twee significante cijfers.

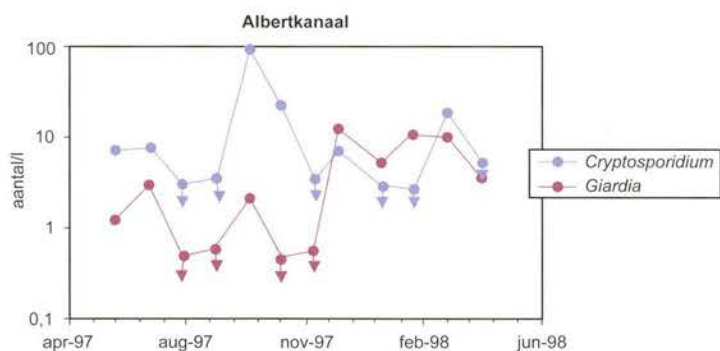
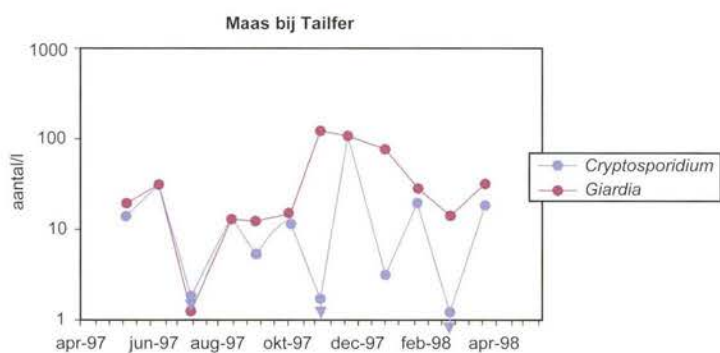
<i>Cryptosporidium</i>					
locatie	Lobith	Lekkanaal	ARK	IJsselmeer	Twentekanaal
aantal waarnemingen	14	12	12	12	12
% positieve monsters	100	33	50	58	50
rekenkundig gemiddelde (n/l)	87	8,2	22	10	3,2
geometrisch gemiddelde (n/l)	25	5,8	6,1	5,9	3,2
standaardafwijking	160	13	52	16	4,1
minimum (n/l)	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0
P10 (n/l)	6,4	0,0	0,0	0,0	0,0
mediaan (n/l)	24	0,0	0,63	2,0	0,80
P90 (n/l)	170	28	61	32	8,6
maximum (n/l)	600	35	180	49	10

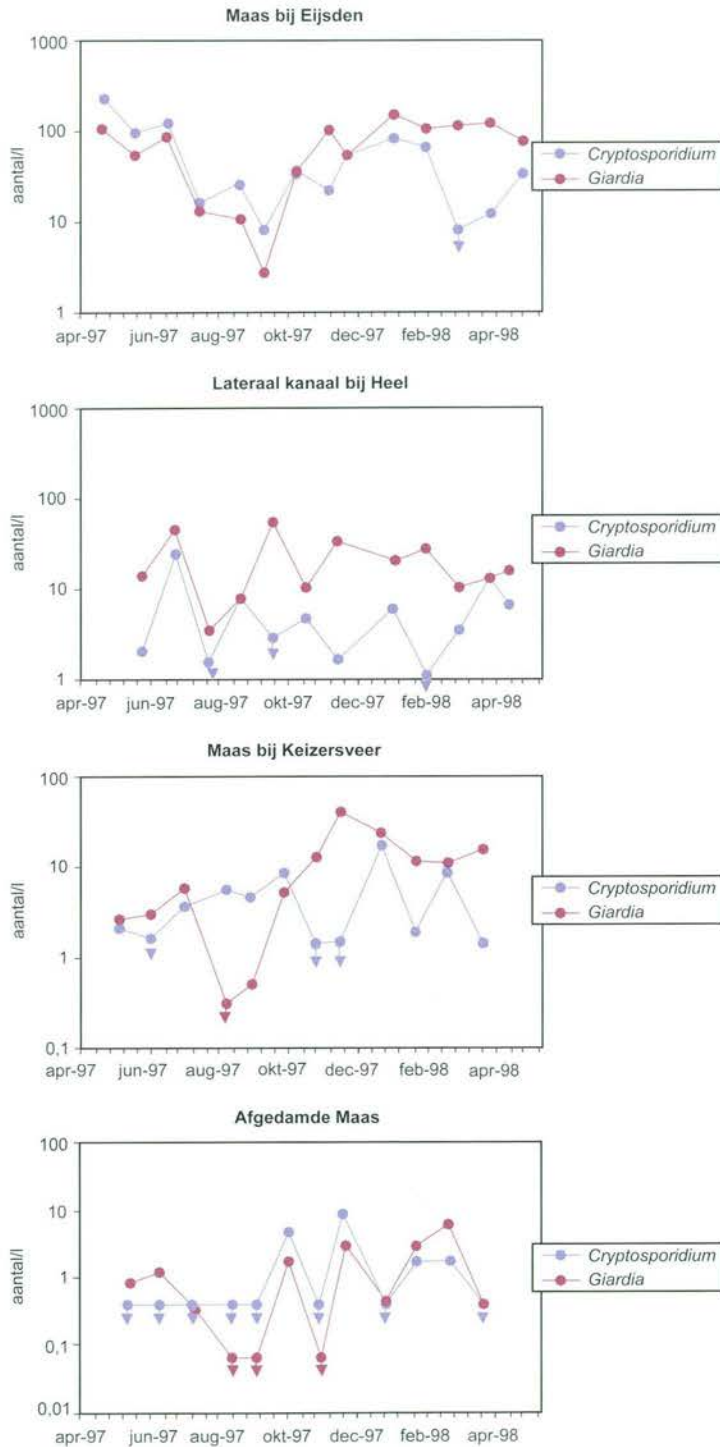
<i>Giardia</i>					
aantal waarnemingen	14	12	12	12	12
% positieve monsters	100	83	92	92	83
rekenkundig gemiddelde (n/l)	43	95	38	10	4,7
geometrisch gemiddelde (n/l)	21	9,9	11	4,6	1,7
standaardafwijking	42	270	76	13	6,9
minimum (n/l)	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0
P10 (n/l)	4,8	0,07	1,7	1,5	0,0
mediaan (n/l)	31	17	7,7	3,7	1,5
P90 (n/l)	100	56	81	29	12
maximum (n/l)	130	950	260	42	22

5.7.2 Seizoensvariaties

Het verloop van de gehalten aan *Cryptosporidium* en *Giardia* op de verschillende oppervlaktewaterlocaties staat weergegeven in figuur 5.1 en 5.2. Daaruit blijkt dat het verloop op de verschillende locaties verschillend is en vrij grillig kan zijn met kortdurende pieken in de gehalten. Ook de locaties die in hetzelfde stroomgebied liggen (zoals bijvoorbeeld Lobith, Lekkanaal en Amsterdam-Rijnkanaal of Tailfer, Eijsden, Lateraal kanaal en Keizersveer) vertonen een verschillend beeld. Dit geeft aan dat lokale invloeden van belang zijn voor de gehalten. Bij veel locaties is een stijging in de gehalten van beide parasieten (en de indicatororganismen en regelmatig ook de troebelheid) waarneembaar in de periode december 1997 met hoge concentraties tot in februari 1998. De resultaten van de bacteriologische, chemische en fysische analyses zijn te vinden in het databoek.

Maasstroomgebied





Figuur 5.1 Verloop van de gehalten aan *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten in het Maas-stroomgebied op de onderzochte locaties in de periode mei 1997 - mei 1998. Bij monsters waarin geen (oö)cysten zijn aangetroffen is het datapunt op de detectiegrens gezet. Dit is aangegeven met een datapunt met een pijl naar beneden.

Bij Tailfer is op 25 november 1997 een stijging te zien in het *Giardia*-gehalte in het Maaswater. Ook het debiet van de rivier en het THCOL-gehalte stijgen in deze periode duidelijk en in mindere mate het SCP- en SSRC-gehalte. Op 16 december 1997 is een stijging in het *Cryptosporidium*-gehalte waar te nemen. Deze stijging is ook te zien in het debiet en in de SSRC-, SCP- en FSTREP-gehalten en in mindere mate in het THCOL-gehalte.

In het Albertkanaal zijn voor *Cryptosporidium* twee pieken zichtbaar in september 1997 en in maart 1998. De piek in september is ook te zien in het gehalte aan SSRC en SCP, terwijl in maart geen verhoging van de indicatorparameter (of van andere parameters) te zien is. Het *Giardia*-gehalte stijgt in december 1997 en is in de periode december 1997 - april 1998 relatief hoog. De piek in het *Giardia*-gehalte in december 1997 is bij andere parameters niet terug te zien.

Bij Eijsden was het gehalte aan beide parasieten hoog in mei 1997 en laag in de periode augustus-september 1997. In oktober stegen de gehalten *Giardia* sterk. Ook de gehalten aan fagen stegen op dat moment. Pas in december steeg het debiet en het gehalte aan zwevende stof van het Maaswater op deze locatie. Op dat moment zijn ook pieken in het gehalte aan *Giardia*, *Cryptosporidium*, THCOL, SSRC, SCP en FSTREP zichtbaar.

In het Lateraal kanaal was het *Cryptosporidium*- en *Giardia*-gehalte in augustus ook laag, evenals het gehalte aan indicatorbacteriën. De piek in het *Giardia*-gehalte in oktober 1997 en in het *Cryptosporidium*-gehalte in april 1998 zijn beide ook te zien bij THCOL en FSTREP; de *Giardia*-piek is ook te zien in het gehalte aan chlorofyl-a.

Bij Keizersveer werd in september een laag *Giardia*-gehalte aangetroffen, net als voor de sporen. *Cryptosporidium* werd in december in lage aantallen aangetroffen, terwijl op datzelfde moment de gehalten aan indicatororganismen, het debiet en de troebelheid juist stegen. Een duidelijke stijging in het *Giardia*-gehalte is te zien van oktober-december 1997, net als in het gehalte THCOL, FSTREP, SSRC, SCP, debiet en troebelheid. Voor *Cryptosporidium* zijn pieken te zien in januari en maart 1998; beide zijn ook (in mindere mate) zichtbaar in een stijging van het debiet van de Maas.

In de Afgedamde Maas werden pieken in het gehalte van beide parasieten gemeten in december 1997 en voor *Giardia* weer in februari 1998. De decemberpiek is ook terug te vinden in het SCP-gehalte en in de troebelheid.

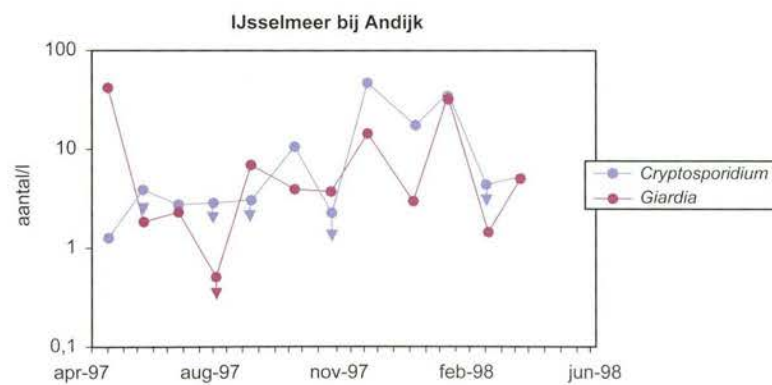
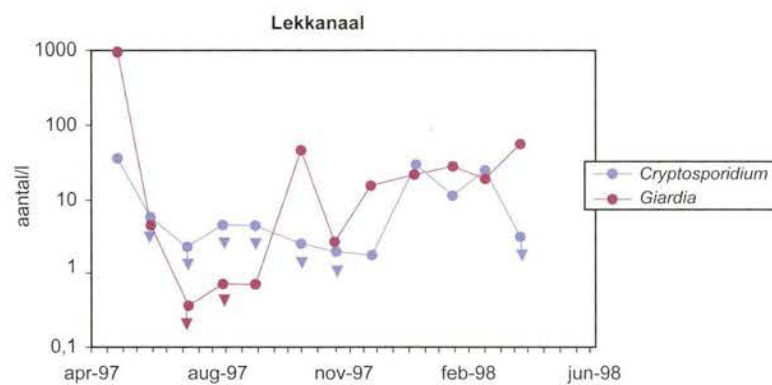
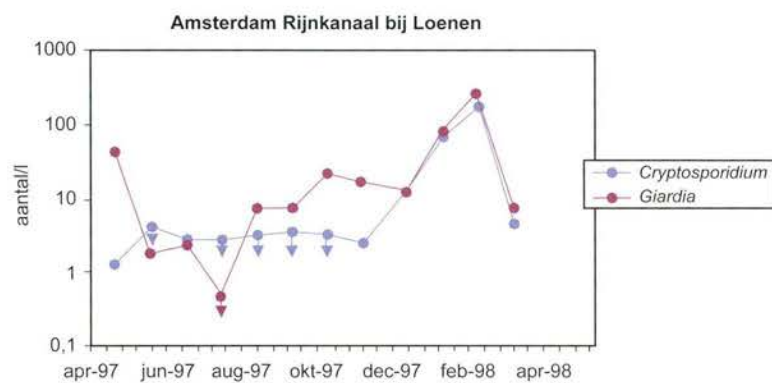
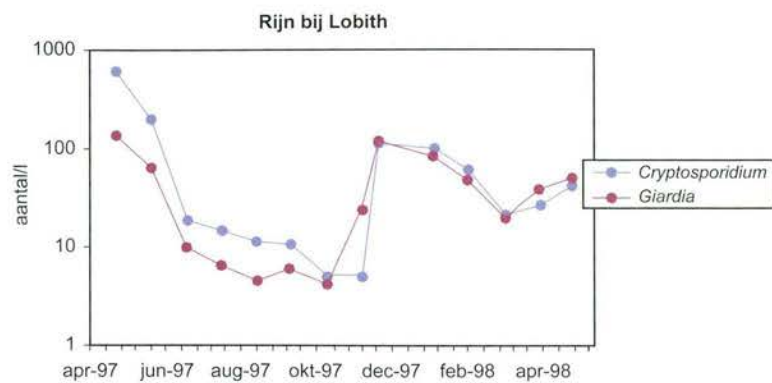
Er zijn extra monsters genomen van het uitslagwater uit de Brakel op momenten dat dit polderwater vlak in de Afgedamde Maas (dichtbij het onttrekkingspunt van DZH) werd uitgeslagen. In de drie monsters die zijn onderzocht werden geen *Cryptosporidium*-oöcysten aangetroffen (<0,1 per liter), maar in twee van de drie monsters werden wel *Giardia*-cysten gevonden. Het gemiddelde *Giardia*-gehalte was 0,55 per liter (na rende-

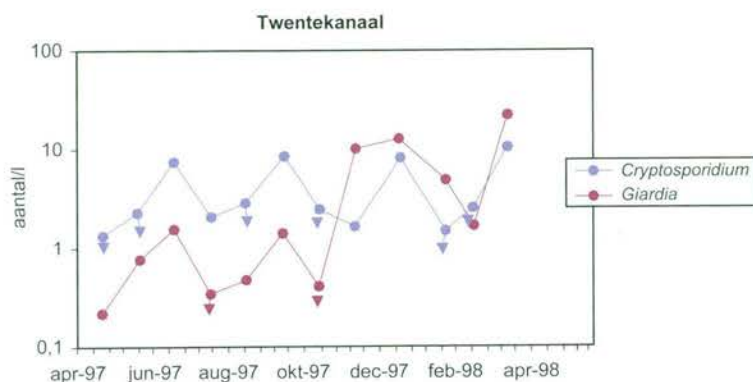
mentscorrectie). Daarmee lag het aantal *Cryptosporidium*-oöcysten in polderwater be-
duidend lager dan in de Afgedamde Maas, maar het gemiddelde gehalte aan *Giardia*-
cysten was vergelijkbaar tot iets lager. Polderwater lijkt daarmee een relevante bron
voor *Giardia*-cysten te kunnen zijn. Voor *Cryptosporidium* is het minder duidelijk. Er is
gemeten op momenten dat het gemaal uitsloeg naar de Afgedamde Maas. Omdat het
aantal monsters beperkt is, is het mogelijk dat piekverontreinigingen, die op kunnen
 treden bij onder andere hevige regenval of na dooi, zijn gemist.

Rijnstroomgebied

Bij Lobith liepen de gehalten van beide parasieten gedurende de meetperiode parallel.
Na hoge aantallen in mei 1997 (het chlorofyl-a gehalte was ook hoog) en een daling in
juni 1997 waren de gehalten relatief laag. Op 3 december 1997 volgde een sterke
stijging in het *Giardia*-gehalte. Deze stijging is ook duidelijk zichtbaar in de gehalten
aan THCOL en FSTREP. Op 17 december volgde een sterke stijging van het *Crypto-*
sporidium-gehalte die ook te zien is in de gehalten aan SSRC, SCP en in het debiet en
het gehalte aan zwevende stof. In het Lekkanaal is een vergelijkbaar patroon zichtbaar.
De *Giardia*-gehalten stegen echter al in oktober 1997 - dit is ook te zien aan FSTREP en
in mindere mate aan THCOL - en de *Cryptosporidium*-gehalten waren pas in januari
1998, samen met SSRC, SCP, FSTREP en troebelheid, hoger. Het *Giardia*-gehalte piekt
ook in april 1998. De enige indicator die dit ook (in mindere mate) laat zien is SCP.
In het Amsterdam-Rijnkanaal bij Loenen trad de stijging voor beide parasieten in febru-
ari 1998 op. In dezelfde periode waren ook de gehalten aan SSRC en SCP hoger en ook
de troebelheid liet een stijging zien. Voor *Giardia* was ook in mei 1997 een stijging
zichtbaar. In dezelfde periode waren de gehalten aan SSRC en SCP eveneens hoog.
Bij Andijk waren de *Cryptosporidium*- en *Giardia*-gehalten hoog op 1 december 1997
en op 2 februari 1998. Op 1 december 1997 werd ook voor het gehalte aan SSRC, de
troebelheid en het gehalte aan chlorofyl-a een hoog gehalte gemeten; op 2 februari gold
dat voor het gehalte aan THCOL en SSRC.

Het *Giardia*-gehalte in het Twentekanaal vertoonde een sterke stijging in december
1997. Deze is in lichte mate te zien in het gehalte aan THCOL (en *E. coli*). Het gehalte
aan *Cryptosporidium*-oöcysten varieerde. Een vergelijkbare variatie is terug te vinden in
het gehalte aan indicatorbacteriën. De piek voor beide parasieten eind maart 1998 is in
alle indicatororganismen terug te vinden en ook in het gehalte aan chlorofyl-a.





Figuur 5.2 Verloop van de gehalten aan *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten in het Rijnstroomgebied op de onderzochte locaties in de periode mei 1997 - mei 1998. Bij monsters waarin geen (oö)cysten zijn aangetroffen, is het datapunt op de detectiegrens gezet. Dit is aangegeven met een datapunt met een pijl naar beneden.

5.7.3 Correlatie met andere waterkwaliteitsparameters

Uit het voorgaande blijkt dat een duidelijke stijging in het *Cryptosporidium*- en *Giardia*-gehalte in oppervlaktewater vaak parallel loopt met een stijging in het gehalte aan indicatororganismen en soms ook de troebelheid en het debiet. Omdat zowel de parasieten als de indicatororganismen van fecale herkomst zijn, is onderzocht of er een lineair verband bestaat tussen het gehalte aan parasieten en indicatororganismen. Ook voor de andere waterkwaliteitsparameters is bepaald hoe goed zij met het *Cryptosporidium*- en *Giardia*-gehalte correleren. De product-moment correlatiecoëfficiënt is berekend per locatie, per stroomgebied en voor alle oppervlaktewaterlocaties gezamenlijk, om een indruk te krijgen van het detailniveau van een eventuele correlatie.

De beste correlatie werd gevonden tussen de beide parasieten; de correlatiecoëfficiënten waren relatief hoog en significant in zowel de dataset van alle locaties, alle locaties in Rijn of Maas en op 4 individuele oppervlaktewaterlocaties. De bronnen voor beide protozoa komen ook voor een belangrijk deel overeen. Hoewel niet kan worden uitgesloten dat een deel van deze correlatie door variaties in de opbrengst van de meetmethode is veroorzaakt, worden ook met de andere organismen van fecale herkomst (THCOL, FSTREP, SSRC, SCP) in de Maas- en Rijnstroomgebieden en op een aantal individuele locaties correlaties gevonden. Dit duidt erop dat de variatie in de meetmethode ondergeschikt was aan de variatie in de waterkwaliteit. Van de fecale indicatororganismen zijn de FSTREP het vaakst gecorreleerd met zowel *Cryptosporidium* als *Giardia*.

Giardia en *Cryptosporidium* zijn op een aantal plaatsen negatief gecorreleerd met de temperatuur. Er is echter geen duidelijke overlap tussen de locaties waarop temperatuur-correlaties bestaan. Van *Giardia*-cysten is bekend dat ze sneller afsterven in water bij hogere temperaturen dan *Cryptosporidium* (DeReignier *et al.*, 1989; Chauret *et al.*, 1995; Medema *et al.*, 1997a).

Tabel 5.4 Locaties waar een significante correlatie is gevonden tussen het gehalte aan *Cryptosporidium*-oöcysten en andere waterkwaliteitsparameters. Cursief weergegeven locaties duiden op een negatieve correlatie.

parameter	locaties waar een significante correlatie is aangetroffen
<i>Giardia</i>	¹ oppervlaktewater ^{***} , ² Maas ^{***} , ² Rijn ^{***} , Tailfer ^{***} , Eijsden*, Lobith ^{***} , ARK ^{**}
THCOL	oppervlaktewater ^{***} , Maas ^{***} , Afgedamde Maas ^{***} , Lekkanaal ^{***}
FSTREP	oppervlaktewater ^{***} , Maas ^{***} , Rijn ^{**} , Tailfer*, Afgedamde Maas ^{***} , Lekkanaal ^{***} , ARK*, Twentekanaal*
SSRC	oppervlaktewater ^{**} , Maas*, Rijn*, Tailfer*, Twentekanaal ^{***}
SCP	oppervlaktewater ^{***} , Maas*, ² Rijn ^{**}
temperatuur	Maas*, ARK ^{**} , <i>IJsselmeer*</i>
debiet	oppervlaktewater ^{***} , Tailfer ^{**} , Lobith*
chlorofyl-a	<i>Afgedamde Maas*</i> , Lobith ^{**} , ARK ^{**} , Twentekanaal*
troebelheid	oppervlaktewater ^{***} , Rijn*, <i>Lekkanaal^{***}</i>
¹ oppervlaktewater	alle locaties gezamenlijk
² Maas of ² Rijn	alle locaties in het stroomgebied
*	p<0,05
**	p<0,01
***	p<0,001

Tabel 5.5 Locaties waar een significante correlatie is gevonden tussen het gehalte aan *Giardia*-cysten en andere waterkwaliteitsparameters. Cursief weergegeven locaties duiden op een negatieve correlatie.

parameter	locaties waar een significante correlatie is aangetroffen
<i>Cryptosporidium</i>	¹ oppervlaktewater ^{***} , ² Maas ^{***} , ² Rijn ^{***} , Tailfer ^{***} , Eijsden*, Lobith ^{***} , ARK ^{**}
THCOL	oppervlaktewater ^{***} , Maas ^{***} , Rijn*, <i>Afgedamde Maas*</i>
FSTREP	oppervlaktewater ^{***} , Maas ^{***} , Rijn*, Tailfer*, Eijsden*
SSRC	oppervlaktewater ^{***} , Maas ^{***} , Rijn ^{***}
SCP	oppervlaktewater ^{***} , Maas ^{***} , Rijn ^{***} , ARK*
temperatuur	oppervlaktewater ^{***} , <i>Maas*</i> , <i>Rijn*</i> , <i>Tailfer*</i> , <i>Keizersveer*</i> , <i>Twentekanaal*</i>
debiet	oppervlaktewater ^{***} , Maas ^{***} , Eijsden*, Keizersveer*
chlorofyl-a	geen
troebelheid	oppervlaktewater ^{***} , Maas ^{***} , Rijn*
¹ oppervlaktewater	alle locaties gezamenlijk
² Maas of ² Rijn	alle locaties in het stroomgebied
*	p<0,05
**	p<0,01
***	p<0,001

Ook met het debiet en met de troebelheid zijn correlaties gevonden. Zowel debiet als troebelheid zijn, zeker bij een plotselinge toename, een indicatie voor een verhoogde mate van verontreiniging van de rivier, door regenval of dooi, waarmee dierlijke mest van het land wordt afgespoeld en door overstorten en overbelasting meer huishoudelijk afvalwater wordt geloosd. Omdat deze parameters eenvoudig en continu meetbaar zijn, zouden zij gebruikt kunnen worden als 'early warning system' voor een fecale belasting met de daarin aanwezige pathogenen. Om hiervoor te worden gebruikt, moeten deze parameters bij een stijging van het gehalte aan protozoa in het water ook een duidelijke stijging laten zien. In het Maasstroomgebied zijn op drie locaties de debieten gemeten: Tailfer, Eijsden en Keizersveer. Bij alle pieken of snelle stijgingen van het gehalte aan een van beide of beide protozoa was een stijging van het debiet met een factor 3 tot zelfs 10 zichtbaar op deze drie locaties. De troebelheid is alleen bij Keizersveer gemeten. Daar is de troebelheid niet altijd hoog bij hoge *Cryptosporidium*-gehalten. Voor het Rijnstroomgebied is alleen bij Lobith het debiet gemeten. Een hoog *Cryptosporidium*-gehalte is gevonden bij een hoog debiet; de *Giardia*-piek ging echter niet vergezeld van een debietstijging.

5.7.4 Protozoavracht via Rijn en Maas

Met het geometrisch gemiddelde van het aantal per liter tijdens de onderzoeksperiode en de afvoer van Rijn en Maas in deze periode kan de protozoavracht worden bepaald. Het geometrisch gemiddelde gehalte aan *Cryptosporidium* in de Maas bij Eijsden werd berekend door negatieve monsters te vervangen door de waarde van de detectiegrens.

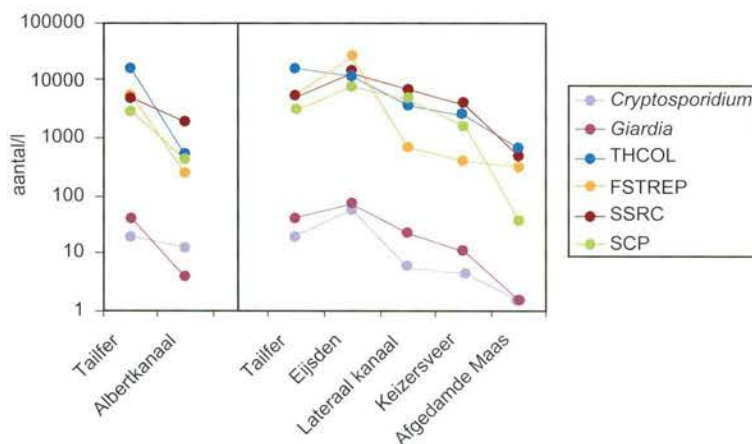
De afvoer van de Rijn lag in 1997 - 1998 gemiddeld op $1,8 \times 10^8$ m³/dag en voor de Maas op $2,1 \times 10^7$ m³/dag (RIWA Jaarverslag Rijn en Maas 1997, 1998). De jaarlijkse protozoavracht wordt dan voor de Rijn bij Lobith $1,7 \times 10^{15}$ *Cryptosporidium*-oöcysten en $1,4 \times 10^{15}$ *Giardia*-cysten en voor de Maas bij Eijsden $2,1 \times 10^{14}$ oöcysten en $3,6 \times 10^{14}$ cysten. Evenals de aantallen per liter al lieten zien is met name de *Cryptosporidium*-vracht in de Rijn hoger in vergelijking met eerder onderzoek (Medema *et al.*, 1996). Ook de *Cryptosporidium*-vracht in de Maas is nu circa 10 keer hoger dan in het najaar van 1995. De verklaring hiervoor is waarschijnlijk dat in dit eerdere onderzoek alleen in het najaar is gemeten, met relatief lage aantallen, terwijl in dit onderzoek alle seizoenen zijn meegenomen.

De vracht van de Rijn is, evenals in het eerdere onderzoek, voor beide protozoa beduidend hoger dan van de Maas. De gemeten gehalten aan *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten bij de grensovergang van Maas en Rijn zijn vergelijkbaar, maar door de 10x hogere watervracht van de Rijn wordt de protozoavracht navenant hoger. Dit bete-

kent ook dat de emissie van protozoa in het stroomgebied van de Rijn voor de grensovergang beduidend groter moet zijn dan in het bovenstroomse deel van de Maas. In Duitsland is het overgrote deel van de lozingen van huishoudelijk afvalwater gezuiverd, terwijl in België een groot deel ongezuiverd wordt geloosd. De Rijn wordt verontreinigd door een groot aantal grote steden en een groot landbouwareaal; beide zijn veel groter dan voor het Maasstroomgebied en waarschijnlijk de oorzaak van de hogere vracht in de Rijn.

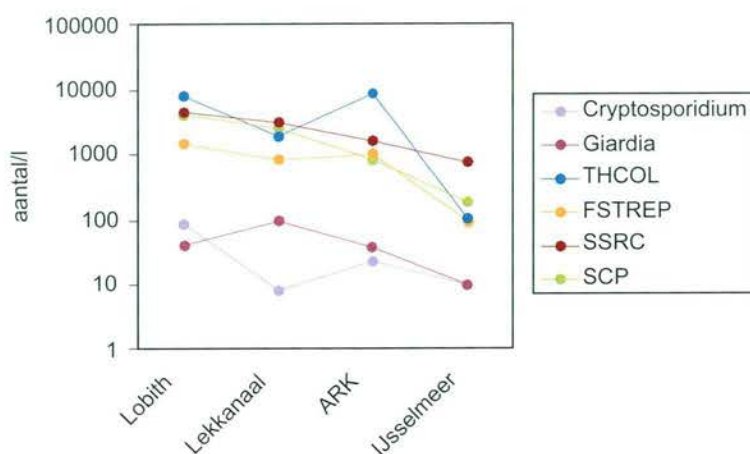
5.7.5 Verloop van de gehalten aan protozoa en indicatororganismen in de stroomgebieden

In het RIWA-onderzoek van 1995 waren de gehalten aan protozoa in het Nederlandse deel van de Rijn en Maas lager dan bij de grensovergang. Ook in dit onderzoek zijn de *Cryptosporidium*- en *Giardia*-gehalten het hoogst bij Tailfer en Eijsden en worden lager naarmate de Maas verder Nederland inkomt (figuur 5.3). De indicatorbacteriën laten een vergelijkbaar beeld zien. Dit betekent dat de fecale verontreinigingsgraad van het Maaswater afneemt. Dit kan door verdunning van het verontreinigde water met schoner water uit de Nederlandse beken, rivieren en polders en mogelijk in combinatie met afsterving en sedimentatie. Als afsterving een belangrijke rol speelt, is te verwachten dat organismen die snel afsterven, zoals THCOL, een steiler verloop vertonen dan persistente organismen, zoals SCP en *Cryptosporidium* (Medema *et al.*, 1997b). Omdat de (gemiddelde) gehalten van bijvoorbeeld THCOL en *Cryptosporidium*-oöcysten op dezelfde wijze aflopen, lijkt afsterving geen belangrijke rol te spelen.



Figuur 5.3 Verloop van de gemiddelde gehalten aan protozoa en indicatorbacteriën in het Maasstroomgebied.

In het Albertkanaal nemen de gehalten aan *Giardia* en indicatorbacteriën ook af ten opzichte van de Maas bij Tailfer, van waaruit dit kanaal wordt gevoed. Ook hier kan verdunning, weer mogelijk in combinatie met sedimentatie of afsterving de oorzaak zijn. Uit de metingen in het Rijnstroomgebied is ook zichtbaar dat de protozoagehalten afnemen in Nederland, hoewel in het Lekkanaal de ene hoge meetwaarde voor *Giardia* het gemiddelde in het Lekkanaal boven de Rijn bij Lobith laat uitkomen (figuur 5.4). De gehalten in het IJsselmeer bij Andijk, met een lange verblijftijd (afsterving, sedimentatie, predatie) zijn relatief laag. De indicatorbacteriën laten een vergelijkbaar beeld zien.



Figuur 5.4 Verloop van de gemiddelde gehalten aan protozoa en indicatorbacteriën in het Rijnstroomgebied.

5.7.6 Benodigde verwijderingscapaciteit

Uit het verschil tussen de gemeten gehalten in oppervlaktewater en het maximaal toelaatbare gemiddelde gehalte in drinkwater, zoals omschreven in het concept beleidsstandpunt van VROM (1995), is de benodigde verwijderingscapaciteit te berekenen. Daarbij spelen twee variatiebronnen die de zekerheid van het resultaat beïnvloeden: de variatie in de gemeten gehalten (in sommige monsters zitten hoge gehalten en in sommige lage) en de variatie in de opbrengst van de meetmethode. Om deze beide variatiebronnen in de berekening tot hun recht te laten komen, is hier gekozen voor een Monte Carlo analyse: uit de gegevensset van de metingen van het gehalte per locatie ($n = 12$) en uit de gegevensset van de rendementsmetingen van de innamepunten (door Kiwa, $n = 33$) is 5000x random een gehalte en een rendement getrokken. Deze twee getallen zijn gebruikt om een gecorrigeerd gehalte te berekenen. Wat daaruit resulteert, is per innamepunt een set van 5000 gecorrigeerde gehalten. Uit de wijze waarop deze gegevensset is verdeeld, kunnen de betrouwbaarheidsintervallen worden berekend. De gegevenssets zijn daartoe gefit aan

een log-normale verdeling. De gehalten berekend via deze Monte Carlo analyse, zijn hoger dan de gehalten die zijn gecorrigeerd voor het geometrisch gemiddelde rendement (tabel 5.2). Dit wordt voornamelijk veroorzaakt door de enkele zeer lage rendementsmetingen, die de onzekerheid vergroten. De mate van variatie in de gemeten gehalten in oppervlaktewater en de onzekerheid in het rendement van de methode zijn op deze manier vertaald naar een hogere eis aan het zuiveringsrendement. De 'kosten' van deze vertaling verschillen per locatie en liggen tussen 0,3 en 1,0 log-eenheid, die extra van de zuivering wordt gevraagd. Het (rekenkundig) gemiddelde en de 95%-betrouwbaarheidsinterval van deze verdeling zijn gebruikt voor het berekenen van de benodigde verwijdering (tabel 5.6 en 5.7). Deze varieert, afhankelijk van de mate van verontreiniging van de grondstof en de variatie daarin van 5,8 - 7,0 ¹⁰log-eenheden op basis van de gecorrigeerde gemiddelde concentratie *Cryptosporidium*-oöcysten en van 6,0 - 7,8 ¹⁰log-eenheden op basis van de gecorrigeerde gemiddelde concentratie *Giardia*-cysten. De berekende benodigde verwijdering op basis van de 95%-betrouwbaarheidsgrens lag voor beide protozoa op alle innamepunten 0,5 - 0,6 ¹⁰log-eenheden hoger (tabel 5.6 en 5.7). Bij deze berekening is aangenomen dat alle waargenomen (oö)cysten levensvatbaar zijn en tot de menspathogene typen behoren. Deze aanname betekent vrijwel zeker een overschatting van de aantallen infectieuze protozoa in het ruwe water en dus ook van de benodigde verwijderingscapaciteit. Om de grootte-orde van deze overschatting te kunnen bepalen, zijn specifiekere methoden nodig die de infectieuze van de niet-infectieuze (oö)cysten kunnen onderscheiden.

Tabel 5.6 Benodigde verwijderingscapaciteit van de zuivering voor *Cryptosporidium*-oöcysten, berekend op basis van het rekenkundig gemiddelde en de 95%-betrouwbaarheidsgrens van de log-normale verdeling van de gecorrigeerde gehalten in het water bij het innamepunt en de voorlopige richtwaarden in het beleidsstandpunt van VROM (1995).

locatie	<i>Cryptosporidium</i>			
	gemiddelde gehalte (n/l)	benodigde ¹⁰ log-verwijdering	95-percentiel (n/l)	benodigde ¹⁰ log-verwijdering
Maas bij Tailfer	96	6,6	370	7,2
Albertkanaal	82	6,6	320	7,2
Lateraal kanaal	26	6,1	86	6,6
Maas bij Keizersveer	19	5,9	73	6,5
Afgedamde Maas	15	5,8	58	6,4
Lekkanaal	87	6,6	330	7,2
ARK	200	7,0	640	7,5
IJsselmeer	51	6,4	240	7,0
Twentekanaal	23	6,0	91	6,6

Tabel 5.7 Benodigde verwijderingscapaciteit van de zuivering voor *Giardia*-cysten, berekend op basis van het rekenkundig gemiddelde en de 95%-betrouwbaarheidsgrens van de log-normale verdeling van de gecorrigeerde gehalten in het water bij het innamepunt en de voorlopige richtwaarden in het beleidsstandpunt van VROM (1995).

locatie	<i>Giardia</i>			
	gemiddelde gehalte (n/l)	benodigde ¹⁰ log-verwijdering	95-percentiel (n/l)	benodigde ¹⁰ log-verwijdering
Maas bij Tailfer	140	7,4	530	8,0
Albertkanaal	18	6,5	69	7,1
Lateraal kanaal	63	7,1	240	7,6
Maas bij Keizersveer	42	6,9	160	7,5
Afgedamde Maas	5,8	6,0	22	6,6
Lekkanaal	330	7,8	980	8,2
ARK	110	7,3	400	7,9
IJsselmeer	28	6,7	110	7,3
Twentekanaal	18	6,5	66	7,1

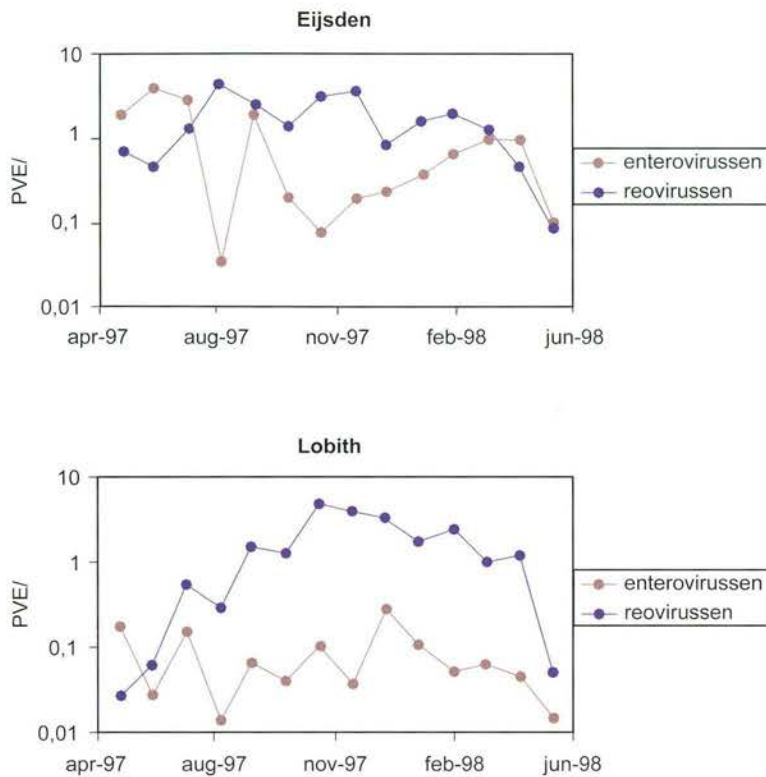
5.7.7 Virusgehalten in Rijn en Maas

De resultaten van het onderzoek naar entero- en reovirussen zijn samengevat in tabel 5.8. De gehalten enterovirussen in de Rijn bij Lobith zijn circa een factor 10 lager dan in de Maas bij Eijsden. De gemiddelde gehalten van alle indicatororganismen lagen ook lager in de Rijn bij Lobith dan in de Maas bij Eijsden, maar alleen bij F-specifieke RNA-fagen en fecale streptococcen was het gehalte evenredig lager.

Tabel 5.8 Kentallen over het voorkomen van enterovirussen en reovirussen in de Rijn bij Lobith en de Maas bij Eijsden (grensovergangen) in de periode mei 1997 - mei 1998. De getallen zijn afgerond op twee significante cijfers.

locatie	Lobith	Eijsden	Lobith	Eijsden
	enterovirussen (pve/l)		reovirussen (pve/l)	
aantal waarnemingen	14	14	14	14
% positieve monsters	100	100	100	100
rekenkundig gemiddelde	0,088	1,0	1,7	1,6
geometrisch gemiddelde	0,061	0,46	0,74	1,1
standaardafwijking	0,080	1,2	1,6	1,2
minimum	0,014	0,032	0,028	0,084
P10	0,019	0,081	0,054	0,45
mediaan	0,059	0,50	1,3	1,3
P90	0,17	2,5	3,9	3,4
maximum	0,30	4,2	5,3	4,2

5.7.8 Seizoensvariatie virusgehalten



Figuur 5.5 Verloop van de gehalten aan enterovirussen en reovirussen in de Maas bij Eijsden en de Rijn bij Lobith in de periode mei 1997 - mei 1998.

In eerder onderzoek in de Maas bij Keizersveer leek er voor de virusgehalten een duidelijke piek in de winterperiode te liggen. In dit onderzoek was deze in de Maas bij Eijsden niet aanwezig. De enterovirusgehalten in de Maas bij Eijsden waren relatief hoog in het voorjaar en vertoonden een duidelijke daling in augustus en in de nazomer (figuur 5.5). In de Rijn bij Lobith waren de gehalten aan reovirussen wel relatief hoog in de winterperiode. De enterovirussen vertoonden geen duidelijke seizoensvariatie; hun aantal schommelde tussen 0,015 en 0,3 pve/l.

5.7.9 Virusvracht via Rijn en Maas

Op dezelfde wijze als in paragraaf 5.7.4 de protozoavracht is berekend, kan uit de gemiddelde virusgehalten in de Maas bij Eijsden en de Rijn bij Lobith de vracht aan enterovirussen en reovirussen worden berekend. De gemiddelde gehalten in de Maas bij Eijsden waren 1,0 enterovirussen per liter en 1,6 reovirussen per liter. In de Rijn bij Lobith was het gehalte aan enterovirussen gemiddeld 0,088 per liter en 1,7 reovirussen

per liter. De jaarlijkse vracht enterovirussen die daaruit is berekend is $7,6 \times 10^{12}$ voor de Maas en $5,8 \times 10^{12}$ voor de Rijn. Voor reovirussen ligt de jaarlijkse vracht op $1,2 \times 10^{13}$ voor de Maas en $1,1 \times 10^{14}$ voor de Rijn.

Tabel 5.9 Gemiddelde gehalten aan indicatororganismen in het Nederlandse deel van het Rijnstroomgebied in de periode mei 1997 - mei 1998. De getallen zijn afgerond op twee significante cijfers. Ter vergelijking zijn de gemiddelde gehalten aan protozoa opgenomen (gecorrigeerd voor het rendement).

parameter	Lobith	Lekkanaal	ARK	IJsselmeer	Twentekanaal
<i>Cryptosporidium</i> (n/l)	87	8,2	22	10	3,2
<i>Giardia</i> (n/l)	43	95	38	10	4,7
THCOL (kvd/l)	7900	2000	8700	105	2900
FSTREP (kvd/l)	1400	870	1000	93	570
SSRC (kvd/l)	4700	3200	1600	805	1400
SCP (kvd/l)	4200	2600	820	184	390
FRNAPH (n/l)	1100	-	-	-	-

Tabel 5.10 Gemiddelde gehalten aan indicatororganismen in het Maasstroomgebied in de periode mei 1997 - mei 1998. De getallen zijn afgerond op twee significante cijfers. Ter vergelijking zijn de gemiddelde protozoagehalten opgenomen (gecorrigeerd voor het rendement).

parameter	Tailfer	Albert-kanaal	Eijsden	Lateraal kanaal	Keizersveer	Afgedamde Maas
<i>Cryptosporidium</i> (n/l)	20	13	57	5,8	4,2	1,4
<i>Giardia</i> (n/l)	39	4,0	74	21	10	1,5
THCOL (kvd/l)	15000	500	12000	3600	2400	670
FSTREP (kvd/l)	5300	250	25000	680	390	290
SSRC (kvd/l)	5000	1800	13000	6500	3600	460
SCP (kvd/l)	3000	430	7400	4600	1600	37
FRNAPH (n/l)	-	-	8900	-	-	-

5.8 Conclusies

- *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten komen voor op alle onderzochte locaties in oppervlaktewater.
- Het percentage positieve monsters op de onderzochte locaties varieerde van 33 - 100% voor *Cryptosporidium* en van 67 - 100% voor *Giardia*.
- De gemiddelde gehalten (gecorrigeerd voor het rendement) aan *Cryptosporidium*-oöcysten varieerde van 1,4 - 87 per liter en aan *Giardia* van 1,5 - 95 per liter.
- In de zomerperiode waren de *Cryptosporidium*- en *Giardia*-gehalten relatief laag, in de nazomer en herfst was op de meeste locaties een relatief snelle stijging van de gehalten zichtbaar.

- De hoogste en meest voorkomende positieve correlaties werden aangetroffen tussen de *Cryptosporidium*- en de *Giardia*-gehalten. De fecale indicatororganismen (met name fecale streptococci) correleerden elk op een aantal locaties met *Cryptosporidium* en/of *Giardia*.
- Een stijging in het debiet van de rivier met een factor 3-10 binnen een maand was, met name in het Maasstroomgebied, een voorspeller voor de stijging van het gehalte aan *Cryptosporidium* en *Giardia* met eveneens een factor 3-10. De overige indicatororganismen waren tijdens de meeste pieken van een van beide of beide protozoa ook verhoogd.
- De jaarlijkse protozoavracht in de Rijn bij Lobith was $1,7 \times 10^{15}$ *Cryptosporidium*-oöcysten en $1,4 \times 10^{15}$ *Giardia*-cysten en voor de Maas bij Eijsden $2,1 \times 10^{14}$ oöcysten en $3,6 \times 10^{14}$ cysten.
- De jaarlijkse virus-vracht in de Rijn bij Lobith was $5,8 \times 10^{12}$ enterovirussen en $1,1 \times 10^{14}$ reovirussen en voor de Maas bij Eijsden $7,6 \times 10^{12}$ enterovirussen en $1,2 \times 10^{13}$ reovirussen.
- De benodigde verwijderingscapaciteit van de oppervlaktewaterzuiveringssystemen varieert, afhankelijk van de gemiddelde gehalten aan protozoa in de grondstof, van 5,8 - 7,0 $^{10}\log$ -eenheden voor *Cryptosporidium*-oöcysten en van 6,0 - 7,8 voor *Giardia*-cysten.

6 Zwemwater

6.1 Inleiding

Het onderzoek naar het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in oppervlaktewater heeft zich tot nu toe voornamelijk gericht op innamepunten voor de drinkwatervoorziening. Gezien de bron van de verontreiniging van oppervlaktewater met deze parasieten is ook te verwachten dat zij voorkomen bij zwemgelegenheden in oppervlaktewater. In Nederland wordt op veel plaatsen in oppervlaktewater gezwommen. Aanwezigheid van deze parasieten in zwemwater betekent een gezondheidsrisico voor de baders.

Bij de controle of het oppervlaktewater geschikt is als zwemwater wordt de microbiologische waterkwaliteit bepaald. Daarbij wordt tweewekelijks het aantal (thermotolerante) bacteriën van de coligroep gemeten gedurende het badseizoen. Deze bacteriegroep is indicatief voor de mate waarin het zwemwater is verontreinigd met fecaal materiaal van mensen en/of dieren. Bij een te hoog gehalte aan thermotolerante bacteriën van de coligroep (>2000/100 ml) wordt zwemmen ontraden. Omdat *Cryptosporidium* en *Giardia* beide van fecale origine zijn, biedt deze controle ook een zekere mate van bescherming tegen deze parasieten. (Oö)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia* sterven in water echter veel langzamer af dan deze indicatorbacteriën. Dat betekent dat deze parasieten nog in relatief hoge aantallen aanwezig kunnen zijn, terwijl het gehalte aan thermotolerante bacteriën van de coligroep al tot lage aantallen is afgenomen.

Daarenboven is uit onderzoek gebleken dat zelfs in Nederlands zwemwater dat voldoet aan de norm voor thermotolerante bacteriën van de coligroep, nog een verhoogd risico op darminfecties bij baders kan optreden (Van Asperen *et al.*, 1998). Hoewel niet onderzocht, is het plausibel dat *Cryptosporidium* en *Giardia* een deel van deze infecties hebben veroorzaakt.

Gegevens over het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in zwemwater in Nederland zijn beperkt tot een enkelvoudige bemonstering van enkele zwemgelegenheden in oppervlaktewater, ten tijde van de 'outbreak' van cryptosporidiose in augustus/september 1996 en ter voorbereiding op een epidemiologische studie (Van Asperen *et al.*, 1997). Uit deze bemonsteringen bleek dat *Cryptosporidium* in zwemwater voorkwam in aantallen van 0,1-0,3 per liter (aantallen niet gecorrigeerd voor het rendement van de methoden).

6.2 Doelen van het onderzoek

In deze studie is het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in het water van enkele zwemgelegenheden in oppervlaktewater gedurende het badseizoen onderzocht.

Daarbij is ook gekeken of er een relatie bestaat met de resultaten van de reguliere microbiologische controle van deze zwemgelegenheden.

Op basis van de gemeten aantallen *Cryptosporidium* en *Giardia* in zwemwater, de hoeveelheid water die baders inslikken tijdens het baden en de dosis-respons relatie van beide protozoa is een inschatting gemaakt van het risico dat baders een *Cryptosporidium*- of *Giardia*-infectie oplopen.

6.3 Selectie zwemgelegenheden

In Nederland zijn veel zwemgelegenheden in oppervlaktewater. Vanuit de reguliere zwemwatercontrole is de mate van fecale verontreiniging bekend. In dit onderzoek zijn bij de selectie van locaties drie criteria gehanteerd:

- de locatie is een erkende zwemgelegenheid waar veel baders komen, of voert water aan naar nabijgelegen zwemgelegenheden.
- lozing van gezuiverd of ongezuiverd huishoudelijk afvalwater via de rivier is de belangrijkste bron van verontreiniging. Deze lozingen vinden niet direct op het zwemwater plaats, maar de zwemlocatie wordt gevoed door oppervlaktewater dat via deze routes is verontreinigd.
- de fecale verontreiniging is relatief hoog, maar is de afgelopen jaren binnen de norm gebleven.

De volgende locaties zijn geselecteerd:

- de Bijland, bij Lobith. Dit is een zwemgelegenheid in een plas die in open verbinding staat met de Rijn.
- de Maasplas bij Eijsden. Dit is een zwemgelegenheid in een serie van plassen die in open verbinding staat met de Maas.
- Bovensluis, in het Hollands Diep. Dit is geen zwemgelegenheid, maar water dat twee nabijgelegen zwemplassen voedt (Rietplaat en Plas a/d Reeweg). Deze locatie wordt gevoed door Rijn en Maas en is gekozen vanuit de (oude) grondstofgedachte en vanwege de monsternemingslogistiek. De microbiologische kwaliteit van Rietplaat kan echter ook door een nabijgelegen lozing van een rwzi-effluent worden beïnvloed.

Enkele eigenschappen van deze zwemgelegenheden worden weergegeven in tabel 6.1.

Tabel 6.1 Beschrijving van de zwemlocaties.

	Bijland	Maasplas	Bovensluis
erkende zwemlocatie	ja	ja	nee
bron van fecale verontreiniging	Rijn	Maas	Rijn/Maas
grote aantallen vogels aanwezig	nee	nee	nee
voldeed in 1997 aan zwemwaternorm	ja	ja	nvt (ja)
gehalte thermotolerante bacteriën van de coligroep (kvd/100ml)			
1995	69	206	51
1996	104	118	13
1997	40	203	12

6.4 Bemonstering

De bemonstering van de zwemgelegenheden is uitgevoerd in het badseizoen van 1997 (mei tot en met september). Van het zwemwater van de Bijland zijn 8 monsters genomen, van de Maasplas 6 en van Bovensluis 7. De bemonstering is uitgevoerd door RIZA, samen met de beheerder van de zwemgelegenheid. De bemonstering vond plaats op de locatie waar de zwemgelegenheid ook wordt onderzocht tijdens de routinecontrole. Dit betekent op een afstand van circa 1-3 m van de oever en circa 30 cm onder de waterspiegel. Bij Bovensluis is in het midden van het Hollands Diep bemonsterd.

Voor het onderzoek naar *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn monsters van circa 200 l genomen. Daarnaast zijn monsters genomen voor onderzoek naar de bacteriologische parameters, fagen en chlorofyl-a. De monsters zijn gekoeld naar het laboratorium van RIZA getransporteerd. De bemonsteringsmethoden zijn beschreven in hoofdstuk 2.

6.5 Onderzoek

Op het zwemwater van de drie locaties zijn de volgende analyses verricht:

- *Cryptosporidium* en *Giardia*. Op elk van de locaties is eenmalig een extra monster genomen dat ter plekke kunstmatig is besmet met een bekende hoeveelheid (oö)cysten, om het rendement van de meetmethode vast te stellen.
- Bacteriologische parameters:
 - thermotolerante bacteriën van de coligroep
 - fecale streptococci
 - sporen van sulfietreducerende clostridia
 - sporen van *Clostridium perfringens*
 - F-specifieke RNA-fagen
- Chlorofyl-a

De methoden voor onderzoek zijn beschreven in hoofdstuk 2.

6.6 Data-evaluatie

Om een indruk te krijgen of en in welke mate de aantallen protozoa in het zwemwater aanleiding kunnen geven tot het optreden van gezondheidsklachten bij zwemmers, is op basis van een aantal scenario's berekend welke aantallen protozoa de zwemmers binnenkrijgen tijdens een badseizoen. Met de dosis-respons relaties die voor beide protozoa met gezonde vrijwilligers zijn opgesteld (Teunis *et al.*, 1996), is het infectierisico bij deze blootstelling berekend.

Er zijn drie scenario's doorgerekend:

1. Een bezoeker die in een badseizoen eenmalig de zwemgelegenheid bezoekt. Daarbij gaat hij zwemmen en krijgt 10 ml (een slok) water binnen.
2. Een kind dat in een badseizoen vijf maal de zwemgelegenheid bezoekt en tijdens het spelen in het water per keer in totaal 100 ml water binnenkrijgt.
3. Een surfer of zwemmer die gedurende het badseizoen zeer frequent (30 keer) de zwemlocatie bezoekt om te surfen/zwemmen en daarbij telkens 50 ml binnenkrijgt.

De scenario's verschillen dus in mate van blootstelling aan het water. Voor de mate waarin zwemmers water binnenkrijgen is een aantal gegevens voorhanden dat aangeeft dat de gehalten die hier zijn aangenomen niet uitzonderlijk zijn. In het onderzoek naar de triatleten in wedstrijdverband gaf 70% van de zwemmers aan water binnen te hebben gekregen van een slok (59%), tot een kopje (33%), tot veel meer (7%) (Van Asperen *et al.*, 1993). Bij een pilot-onderzoek met spelende kinderen in zwemwater gaf 26-52% van de kinderen aan water binnen te hebben gekregen (Van Asperen *et al.*, 1997).

6.7 Resultaten

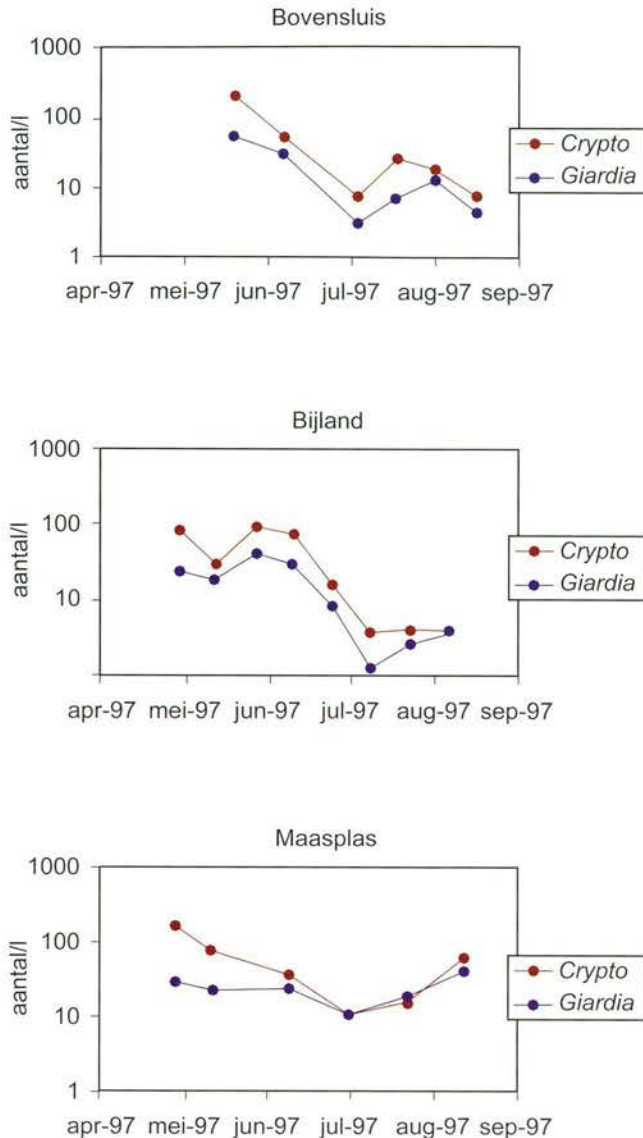
Cryptosporidium en *Giardia* zijn op alle onderzochte locaties aangetroffen in alle monsters. Beide parasieten blijken gedurende het badseizoen op deze zwemwaterlocaties algemeen voor te komen. Tabel 6.2 geeft een overzicht van de kentallen. De verschillen tussen de locaties zijn niet erg groot. De gemiddelde concentratie was voor *Cryptosporidium* en *Giardia* het hoogst in de Maasplas, terwijl de maxima in Bovensluis het hoogst waren.

Tabel 6.2 Kentallen over het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in zwemwater (gecorrigeerd voor het rendement) in het badseizoen (mei-sep) van 1997 bij drie zwemgelegenheden in oppervlaktewater.

	Bovensluis	Bijland	Maasplas
<i>Cryptosporidium</i>			
aantal waarnemingen	7	8	6
rekenkundig gemiddelde (n/l)	47	38	59
standaardafwijking (n/l)	69	38	56
geometrisch gemiddelde (n/l)	23	19	40
minimum (n/l)	8	4	12
P10 (n/l)	8	4	13
mediaan (n/l)	19	23	46
P90 (n/l)	112	84	117
maximum (n/l)	200	92	162
<i>Giardia</i>			
aantal waarnemingen	7	8	6
rekenkundig gemiddelde (n/l)	17	16	24
standaardafwijking (n/l)	18	15	11
geometrisch gemiddelde (n/l)	11	9	22
minimum (n/l)	3	1	10
P10 (n/l)	4	2	14
mediaan (n/l)	8	13	23
P90 (n/l)	39	33	35
maximum (n/l)	53	44	42

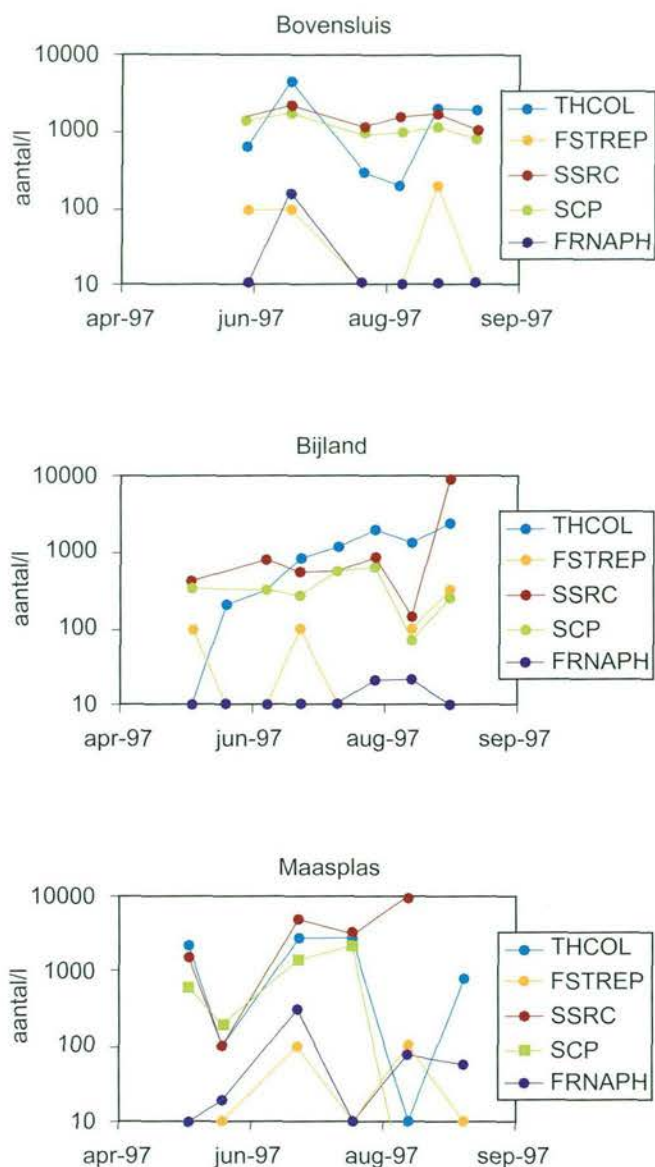
Het verloop van de aantallen *Cryptosporidium* en *Giardia* gedurende het badseizoen verschildte per locatie (figuur 6.1). Op twee locaties (Bovensluis en Bijland) waren de aantallen relatief hoog in mei en juni en daalden ze in juli en augustus naar een lager niveau. Bij de andere locatie (Maasplas) was er in augustus wel een lichte daling zichtbaar, maar de aantallen herstelden zich eind augustus/september tot op het oorspronkelijke niveau. In de andere microbiologische parameters, die net als de beide protozoa van fecale origine zijn, was geen overeenkomstige trend waar te nemen. De thermotolerante bacteriën van de coligroep, de routine waterkwaliteitsparameter, vertoonde alleen in Bovensluis in augustus dezelfde verlaging in aantallen als de protozoa. Verder was er geen duidelijke relatie waar te nemen tussen aantallen protozoa en de overige parameters (figuur 6.2).

De analyse van de correlatie van de protozoa met de overige kwaliteitsparameters over de drie zwemgelegenheden gezamenlijk (tabel 6.3) geeft aan dat de aantallen van beide parasieten duidelijk aan elkaar waren gekoppeld ($r = 0,91$, $p < 0,01$). Beide parasieten vertoonden een positieve correlatie met F-specifieke fagen en een negatieve correlatie met zowel de concentratie aan chlorofyl-a (mogelijk door verlaging van het rendement van de meetmethode voor protozoa door de aanwezigheid van algen) als met de aantallen fecale streptococci. Dit laatste lijkt een artefact, gezien het geringe aantal monsters dat positief is bevonden voor fecale streptococci en de lage aantallen die zijn aangetroffen.



Figuur 6.1 Verloop van de aantallen *Cryptosporidium* en *Giardia* in zwemwater gedurende het badseizoen.

In figuur 6.3 zijn de gemiddelde aantallen micro-organismen in zwemwater van de drie locaties naast elkaar gezet. Daaruit komt naar voren dat deze locaties niet sterk van elkaar verschillen en dat de verhouding tussen de (gemiddelde aantallen van de) parameters redelijk constant is. Ook is duidelijk dat de microbiologische kwaliteit van het zwemwater op deze zwemgelegenheden gedurende dit badseizoen ruim aan de zwemwaternorm (thermotolerante bacteriën van de coligroep <20.000 per liter) voldoet. Wel lagen de gemiddelde aantallen net boven het niveau waarboven in epidemiologisch onderzoek is vastgesteld, dat een meetbare verhoging van de kans op maagdarminfecties optreedt (Van Asperen *et al.*, 1998).

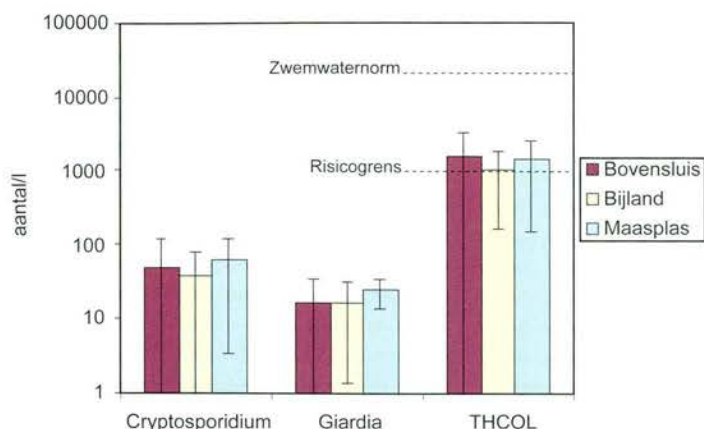


Figuur 6.2 Verloop van de microbiologische parameters in zwemwater gedurende het badseizoen.

Tabel 6.3 Correlatie van *Cryptosporidium* en *Giardia* in zwemwater met de overige kwaliteitsparameters.

	<i>Crypto</i>	<i>Giardia</i>	THCOL	FSTREP	SSRC	SCP	FRNAPH	chl-a
<i>Crypto</i>	1,00							
<i>Giardia</i>	0,92***	1,00						
THCOL	-0,28	-0,17	1,00					
FSTREP	-0,55**	-0,51*	0,26	1,00				
SSRC	-0,22	-0,01	0,57*	0,45	1,00			
SCP	0,16	0,01	0,31	0,12	-0,08	1,00		
FRNAPH	0,48*	0,62**	0,59**	n.b.	0,79***	0,23	1,00	
chl-a	-0,62**	-0,59**	0,01	-0,19	0,45	-0,09	n.b.	1,00

p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n.b. niet bepaald



Figuur 6.3 Gemiddelde aantallen micro-organismen in zwemwater bij de verschillende zwemgelegenheden. De foutbalken geven de minimale en maximale aantallen weer. De lijn geeft aan boven welk niveau van THCOL een verhoogd risico is aangetroffen in epidemiologisch onderzoek (Van Asperen *et al.*, 1998).

6.8 Risico-analyse

De mate van blootstelling en het infectierisico van de drie zwemscenario's wordt weergegeven in tabel 6.4.

Tabel 6.4 Mate van blootstelling van verschillende zwemmers aan *Cryptosporidium* en *Giardia* in zwemwater en het daaruit berekende infectierisico.

<i>Giardia</i>	1	2	3
scenario	zwemmer	spelend kind	surfer
aantal maal zwemmen in seizoen	1	5	30
binnenkrijgen water per zwembeurt (l)	0,01	0,1	0,05
totaal volume in seizoen (l)	0,01	0,5	1,5
concentratie (Maasplas) (n/l)	24	24	24
blootstelling per zwembeurt	0,24	2,4	1,2
infectierisico per zwembeurt	0,5%	4,7%	2,4%
infectierisico per seizoen	0,5%	23%	71%

<i>Cryptosporidium</i>	1	2	3
scenario	zwemmer	spelend kind	surfer
aantal maal zwemmen in seizoen	1	5	30
binnenkrijgen water per zwembeurt (l)	0,01	0,1	0,05
totaal volume in seizoen (l)	0,01	0,5	1,5
concentratie (Maasplas) (n/l)	59	59	59
blootstelling per zwembeurt	0,59	5,9	2,95
infectierisico per zwembeurt	0,2%	2,3%	1,2%
infectierisico per seizoen	0,2%	12%	35%

Er is gerekend met de rekenkundig gemiddelde aantallen *Cryptosporidium* en *Giardia* zoals die in de Maasplas zijn gevonden. De blootstelling per zwembeurt lag voor elk scenario in de orde van geen tot enkele (oö)cysten. Het infectierisico over het hele badseizoen varieerde van 0,5% voor *Giardia* en 0,2% voor *Cryptosporidium* voor de eenmalige zwemmer tot 35% voor *Cryptosporidium* en 71% voor *Giardia* voor de regelmatige zwemmer.

6.9 Discussie en conclusies

De gemeten aantallen *Cryptosporidium* en *Giardia* in zwemwater liggen in dezelfde orde van grootte als op de overige oppervlaktewaterlocaties die in deze studie zijn meegenomen. Een selectie criterium voor de zwemgelegenheden die in deze studie zijn opgenomen was, dat zij indirect verontreinigd werden vanuit lozingen van huishoudelijk afvalwater, omdat daar de kans om beide parasieten aan te treffen het grootst was (*worst case*) en in huishoudelijk afvalwater het grootste deel van de parasieten menspathogeen is. Deze lozingen vonden niet direct op het zwemwater plaats, maar het zwemwater werd gevoed door oppervlaktewater dat via rioollozingen werd verontreinigd (Maas bij Eijsden, Rijn bij Lobith en Maas en Rijn bij Bovensluis).

De gemeten aantallen weerspiegelen dus de gehalten in zwemwater met een dergelijke verontreinigingsbron. Niet gemeten is of en in welke mate beide parasieten voorkomen in zwemwater waar huishoudelijk afvalwater geen of een ondergeschikte bron van verontreiniging is. Vanuit de ervaringen uit het onderzoek van de waterleidingbedrijven kan worden verwacht dat beide parasieten ook voorkomen in dergelijke wateren (zie hoofdstuk 5).

De huidige meetmethoden zijn niet specifiek voor de menspathogene soorten *Cryptosporidium* en *Giardia*. Een deel van de (oö)cysten dat in het water is aangetroffen is mogelijk afkomstig van andere bronnen, hoewel bij de selectie van de locaties is gekozen voor zwemgelegenheden die door lozingen van (al dan niet gezuiverd) huishoudelijk afvalwater worden beïnvloed en die geen hoge aantallen vogels rapporteerden. De methode maakt ook geen onderscheid tussen dode en levende (oö)cysten. Een deel van de aangetroffen (oö)cysten is mogelijk niet levensvatbaar. Deze zijn wel meegenomen in de analyse van het infectierisico. Aan de andere kant worden niet alle (oö)cysten die in het water aanwezig zijn voldoende aangekleurd om gedetecteerd te worden. Op basis van deze en literatuurgegevens is het niet mogelijk een kwantitatieve schatting te maken van het effect van deze meetfouten, alleen dat ze elkaar tegenwerken. Dat betekent dat de berekende infectierisico's als een indicatie moeten worden beschouwd van de grootteorde van het gezondheidsrisico.

De volgende conclusies kunnen uit het onderzoek worden getrokken:

- De microbiologische kwaliteit van het zwemwater op de onderzochte zwemlocaties voldoet ruim aan de zwemwaternorm.
- De aantallen thermotolerante bacteriën van de coligroep liggen net boven het niveau waarboven een meetbare verhoging van de kans op maagdarminfecties optreedt (Van Asperen *et al.*, 1998).
- *Cryptosporidium* en *Giardia* komen voor in oppervlaktewater met de functie zwemwater.
- Op de onderzochte locaties waren beide parasieten gedurende het gehele badseizoen in het zwemwater aantoonbaar.
- De aantallen waarin beide parasieten voorkwamen in zwemwater waren duidelijk gecorreleerd.
- Er was geen relatie tussen de routine waterkwaliteitsparameter (thermotolerante bacteriën van de coligroep) en de aantallen parasieten.
- Er bestond wel een correlatie tussen aantallen parasieten en F-specifieke RNA-fagen en een negatieve correlatie met het gehalte aan chlorofyl-a, waarschijnlijk doordat algen de bepaling van de protozoa negatief beïnvloedden.
- Een analyse van het infectierisico op basis van drie blootstellingsscenario's geeft aan dat bij de gemeten aantallen *Cryptosporidium* en *Giardia*, het risico bij enkelvoudige blootstelling relatief laag is (0,2-0,5%). Duidelijk is wel dat het risiconiveau van zwemmen in oppervlaktewater ruim boven het maximaal acceptabele jaarrisico ligt, zoals dat voor drinkwaterconsumptie wordt gehanteerd (0,01% ofwel 1 infectie per 10.000 personen per jaar). Bij herhaalde blootstelling is dit risico echter duidelijk hoger (14-71%). Een zwemmer die regelmatig een dergelijke zwemgelegenheid bezoekt, heeft dus een aanzienlijk risico op het oplopen van een infectie met *Cryptosporidium* en *Giardia*.

7 Geïntegreerde eindbeschouwing

7.1 Detectiemethode voor *Cryptosporidium* en *Giardia*

De bemonsterings- en bepalingstechniek die in deze studie is gebruikt voor het aantonen van *Cryptosporidium* en *Giardia* is nog niet optimaal. De metingen worden gebruikt voor het evalueren van het belang van de verschillende bronnen en de gezondheidsrisico's van zwemmen in oppervlaktewater en bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater. Alvorens deze evaluatie te maken, wordt de onzekerheid die wordt veroorzaakt door de tekortkomingen van de gebruikte detectiemethodiek belicht.

7.1.1 Rendement

Uit rendementsbepalingen blijkt dat het rendement erg variabel is en dat de feitelijke opbrengst van de bepaling relatief laag is. In dit onderzoek lag het geometrisch gemiddelde rendement voor *Cryptosporidium* op 2,6% en voor *Giardia* op 15,6%. Het 10- en 90-percentiel lag op 0,3 en 29% voor *Cryptosporidium* en 0,9 en 90% voor *Giardia*, voor beide een verschil van 2 log-eenheden. De in dit rapport gebruikte rendementspercentages voor de *Cryptosporidium*- en *Giardia*-analyse zijn het geometrisch gemiddelde rendement van alle rendementsbepalingen (met uitzondering van slachthuisafvalwater). De methode werd, met kleine verschillen, in drie verschillende laboratoria toegepast. De onderzochte watermonsters verschilden van samenstelling, zowel door de aard van het monster (rioolwater, slachthuisafvalwater, effluent rwzi, oppervlaktewater) als door de troebelheid en de hoeveelheid fytoplankton. In hoofdstuk 2 is onderzocht of deze factoren de rendementsverschillen veroorzaakten. Er werd echter voor geen van deze factoren een significante correlatie met het rendement gevonden, waarschijnlijk omdat de algehele variatie (ruis) groot was. Methodische factoren die ook hebben meegespeeld zijn:

- de variatie in de getelde aantallen en de conditie van de (oö)cysten-suspensies die voor de rendementsbepalingen aan de monsters werden toegevoegd.
- het feit dat van verschillende monsters verschillende hoeveelheden zijn onderzocht; de onderzochte fractie was afhankelijk van de hoeveelheid geconcentreerd slibachtig materiaal in de pellet. Deze pelletgrootte varieerde van 1-41 g. Van elk monster is slechts 1 g pellet onderzocht. Omdat het om kleine aantallen parasieten gaat, is het te verwachten dat de onzekerheid in de uiteindelijk berekende gehalten groter is naar-

mate een kleiner deel van de pellet is onderzocht. Het onderzoeken van steeds een vergelijkbare kleine hoeveelheid slib in het microscopisch te onderzoeken preparaat was noodzakelijk om de kans op fouten in de tellingen te voorkomen. Bij een te hoog slibgehalte wordt een deel van de parasieten in het microscopisch preparaat gemaskeerd. Van de monsters met een groot concentraat zouden meerdere fracties onderzocht moeten worden om een grotere betrouwbaarheid te verkrijgen. Dit is vanwege de hogere kosten niet uitgevoerd.

7.1.2 Betekenis voor de interpretatie van de protozoagegevens

Alle meetgegevens zijn dus gecorrigeerd voor hetzelfde, lage rendement. Dat betekent dat de *Giardia*-gehalten een factor 6,4 hoger worden en de *Cryptosporidium*-gehalten zelfs een factor 38. Het grote aantal rendementsmetingen ($n = 99$) gaf duidelijk aan dat het rendement laag is. De correctie van de meetgegevens voor dit lage rendement geeft een reëlere inschatting van de werkelijke gehalten in de onderzochte watermonsters. Deze correctie betekent natuurlijk dat de gehalten in alle matrices hoger uitkomen dan de meetwaarden. Voor het bepalen van het relatieve belang van de verschillende bronnen is het effect beperkt, omdat alle bronnen (met uitzondering van mest) met hetzelfde rendement zijn gecorrigeerd. Voor het bepalen van het gezondheidsrisico van zwemmen in oppervlaktewater en de benodigde verwijderingscapaciteit van drinkwaterzuiveringsprocessen betekent de correctie respectievelijk dat het berekende risico hoger is en de benodigde verwijderingscapaciteit ook groter is. Vanwege de onzekerheid in het rendement moeten de genoemde gegevens en berekeningen worden beschouwd als de beste benadering van de werkelijkheid die met de beschikbare gegevens mogelijk is.

Op het niveau van de individuele monsterlocaties zijn er verschillen in de gevonden rendementen. Deze verschillen waren niet significant, maar het aantal replica's (en dus het onderscheidend vermogen) was voor de meeste locaties ook laag. Voor de innamepunten voor de drinkwaterbereiding was het rendement voor beide protozoa relatief laag in het Twentekanaal, IJsselmeer en Lateraal kanaal en relatief hoog in de Afgedamde Maas, het Lekkanaal en het Albertkanaal. Correctie voor het 'locale' rendement in plaats van het gemiddelde rendement kan betekenen dat voor *Cryptosporidium* de berekende benodigde verwijderingscapaciteit $0,3^{10}\log$ -eenheid lager - $0,8^{10}\log$ -eenheid hoger uitkomt. Voor *Giardia* ligt dat op circa $0,4^{10}\log$ -eenheid. Voor de drie zwemwateren Bovensluis, Bijland en Maasplas lagen de *Cryptosporidium*-gehalten (mediaan respectievelijk: 19, 23 en 46 per liter) hoger dan die van *Giardia*

(mediaan respectievelijk 8, 13 en 23 per liter). In veel andere oppervlaktewatermonsters lag het *Giardia*-gehalte hoger dan dat voor *Cryptosporidium*. Bij de rendementsbepalingen ($n = 3$) werd voor de oöcysten een mediaan rendement gevonden van 1,3%, terwijl het zwemwater-rendement voor *Giardia* met 2,9% veel lager uitviel dan voor de overige oppervlaktewatermonsters. Als monsters van zwemwateren inderdaad een systematisch lager rendement vertonen voor *Giardia*, zal er in het algemeen een relatief gering aantal cysten worden gevonden. Correctie voor het lage rendement zou betekenen dat de berekende *Giardia*-gehalten in zwemwater een factor 5,4 hoger uitkomen. Een verklaring voor de lagere rendementen voor *Giardia* in de zwemwatermonsters is niet te geven; zowel de aard van het monster als het onderzoekend laboratorium verschilden niet van locaties zoals Lobith en Eijsden, waar wel hogere *Giardia*-rendementen zijn gevonden. De meetgegevens zijn daarom gecorrigeerd voor het rendement gebaseerd op de 99 rendementsmetingen van alle locaties en niet op de 3 rendementsmetingen van de zwemwateren.

7.1.3 Infectiviteit

De methode die is toegepast geeft informatie over de aanwezigheid van oöcysten van *Cryptosporidium* spp. en cysten van *Giardia* spp. in water. Met deze methode is het niet mogelijk onderscheid te maken tussen de wel en niet menspathogene (sub)soorten van *Cryptosporidium* of *Giardia*. Ook levert de methode geen directe informatie over de mate waarin de aangetroffen (oö)cysten nog levensvatbaar zijn.

Deze twee aspecten zijn erg belangrijk voor het bepalen van het gezondheidsrisico van deze parasieten via zwem- en drinkwater en voor het bepalen van de benodigde verwijdering tijdens de zuivering. De verwachting is dat het aantal levensvatbare, menspathogene (oö)cysten van beide protozoa een deelverzameling is van de hier gerapporteerde aantallen en dat het risico daarmee lager is dan op basis van deze aantallen is berekend.

7.2 Bronnen

In figuur 1.1 is op basis van literatuuronderzoek weergegeven, wat de belangrijkste potentiële bronnen zijn van verontreiniging van oppervlaktewater met *Cryptosporidium* en *Giardia*. In eerder onderzoek in Nederland is een aantal van deze bronnen inventariserend onderzocht (Schijven *et al.*, 1996; Medema *et al.*, 2000). Daaruit kan worden opgemaakt dat huishoudelijk afvalwater, mest van landbouwhuisdieren en aanvoer met de Rijn en Maas relevante verontreinigingsbronnen voor het Nederlands oppervlaktewater kunnen zijn. De in het wild levende dieren zijn alleen van belang in water dat niet

direct door huishoudelijk afvalwater of mest van landbouwhuisdieren wordt beïnvloed (bijvoorbeeld na voorzuivering in bekkens of na duinpassage of geïsoleerde zwemplas-
sen; Medema *et al.*, 2000).

In dit grootschalige onderzoek is het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in de twee belangrijkste bronnen (huishoudelijk afvalwater en landbouwhuisdieren) bepaald. Ook is gekeken naar het effect van afvalwaterbehandeling op deze parasieten. Daarnaast is de buitenlandse aanvoer, beter dan voorheen, gekwantificeerd en zijn gehalten van deze parasitaire protozoa in oppervlaktewater bestemd voor drinkwater op een groot aantal onttrekkingspunten in Nederland en België en in zwemwater bepaald.

Tegelijkertijd is in beperkte mate gekeken naar het voorkomen van enterovirussen in huishoudelijk afvalwater, hun verwijdering in de rwzi en de aanvoer in Nederland via Rijn en Maas.

Hier worden eerst de belangrijkste bevindingen per bron beschreven. Daaropvolgend wordt de informatie geïntegreerd tot een beeld over het relatieve belang van de verschillende bronnen voor oppervlaktewaterverontreiniging.

7.2.1 Huishoudelijk afvalwater

Uit het rioolwateronderzoek bij de rwzi's Kralingseveer te Rotterdam en Westpoort te Amsterdam is gebleken dat beide parasieten gedurende het hele jaar aanwezig zijn in rioolwater en in effluent van de rwzi's. *Giardia*-cysten blijken in veel hogere aantallen voor te komen in het influent dan *Cryptosporidium*-oöcysten. Doordat cysten echter beter verwijderd worden dan oöcysten (respectievelijk $1,9-2,0^{10}\log$ en $1,3-1,5^{10}\log$), zijn de aantallen van beide protozoa in het effluent van rwzi's min of meer gelijk.

Tussen de twee rwzi's bleek er een groot verschil in absolute gehalten te zijn van zowel *Cryptosporidium* als *Giardia* in het influent en in het effluent: in Westpoort was de gemiddelde concentratie 9-17 maal hoger dan in Kralingseveer. Kralingseveer ontvangt het water van een gemengd rioolstelsel, waardoor verdunning met regenwater kan optreden. Ondanks dat er weinig neerslag is gevallen vlak voor en op de bemonsteringsdagen, blijkt dat de hoeveelheid zwevende stof, BZV en CZV van het influent van Westpoort duidelijk (factor 2,5-3) hoger was dan van Kralingseveer. Datzelfde verschil was terug te vinden in de gehalten aan indicatororganismen (factor 1,5-4) en virussen (factor 2-5). Deze gegevens duiden op een invloed van de bijmenging van afstromend regenwater, maar dit kan maar een deel van het grote verschil in protozoagehalten tussen beide rwzi's verklaren. Een andere mogelijkheid is dat er in het verzorgingsgebied van de rwzi's verschillen zijn, die leiden tot een hogere belasting met protozoa in Westpoort.

Er zijn geen slachthuizen aanwezig in beide voorzieningsgebieden. Opvallend is ook dat de hoeveelheid slib in het gefiltreerde en opgewerkte monster van het ruwe rioolwater voor de protozoa-analyses duidelijk verschilden: Westpoort gemiddeld 15,0 g en Kralingseveer 2,5 g (n = 13). In het effluent werd een vergelijkbaar verschil gevonden. De afvalwatermonsters van Kralingseveer zijn door een ander laboratorium onderzocht dan van Westpoort. Van Westpoort is 0,5-1 gram onderzocht, terwijl van Kralingseveer 1-3 g is onderzocht. Van de monsters van Westpoort is dientengevolge slechts een klein deel onderzocht, terwijl van Kralingseveer het grootste deel van het monster is onderzocht. Dat betekent dat fouten in detectie en telling (inhomogeniteit van de pellets, variatie in rendement) sterker doorwerken in Westpoort dan in Kralingseveer. Als gevolg van de relatief hoge effluentgehalten draagt de locatie Westpoort aanzienlijk bij aan de belasting van het oppervlaktewater. Voor Kralingseveer liggen de effluentgehalten in dezelfde orde van grootte als die van oppervlaktewater, zodat die bijdrage hiervan gering is.

Aan de totale netto emissie aan *Cryptosporidium*-oöcysten wordt 62% bijgedragen door lozingen van gezuiverd huishoudelijk afvalwater, 20% door ongezuiverde directe lozingen en 18% uit riooloverstorten. Van de netto emissie aan *Giardia*-cysten wordt 34% via gezuiverd effluent geloosd, 36% door ongezuiverde lozingen en 30% via overstorten. De totale netto emissie is voor *Giardia* hoger ($2,3 \times 10^{14}$ cysten) dan voor *Cryptosporidium* ($1,4 \times 10^{14}$ oöcysten). Dezelfde verhouding wordt gevonden in (stromend) oppervlaktewater.

Het geometrisch gemiddelde gehalte aan *Cryptosporidium* in de lozing van ongezuiverd rioolwater van de stad Luik is lager dan dat van het ruwe rioolwater in Nederland en ligt op het niveau van de gezuiverde lozingen in Nederland. Het geometrisch gemiddelde gehalte aan *Giardia* in het ongezuiverde water van Luik was lager dan in het influent, maar hoger dan in het effluent van de rwzi's in Nederland. Mogelijk is dit het gevolg van menging met regenwater, voordat het in de rivier geloosd wordt. Vanuit het rioolwater in Luik is de belasting van het oppervlaktewater met *Giardia* 7 x groter dan die van *Cryptosporidium*. In de Maas bij Tailfer (voor de lozing) en bij Eijsden (na de lozing) lag het *Giardia*-gehalte slechts 2-2,5 x boven het *Cryptosporidium*-gehalte. Mogelijk is de verhouding tussen beide parasieten in andere Belgische rioolwateren anders of is een significant deel van de *Cryptosporidium*-oöcysten afkomstig uit een andere bron. Afsterving lijkt, gezien de korte verblijftijd tussen Luik en Eijsden, geen verklaring voor deze verschuiving te kunnen zijn.

7.2.2 Mest van landbouwhuisdieren

Het onderzoek naar de aantallen protozoa in dierlijke mest laat zien, dat met name vleeskalveren een potentieel grote emissiebron vormen. In de eerste 6 levensweken wordt in 90% van de koppels van deze dieren *Cryptosporidium* aangetroffen en in 97% *Giardia*. Deze incidentie zakt naar 20-30% voor *Cryptosporidium* en 57-72% voor *Giardia* na 21-26 weken. De gehalten aan *Cryptosporidium* en *Giardia* in mest van deze dieren liggen in de grootte-orde van 10^6 - 10^7 per kg. Dat komt met het gemiddeld aantal vleeskalveren (700.000) en de mestproductie per dier (3500-5000 kg/jaar) uit op een totale jaaremissie van $1,2 \times 10^{15}$ *Cryptosporidium*-oöcysten en $1,8 \times 10^{15}$ *Giardia*-cysten.

In mest van melkkoeien werd geen *Cryptosporidium* aangetoond en in slechts 1 van de 55 koppels *Giardia*. In mest van vleeskuikens (42 koppels) werd geen *Cryptosporidium* of *Giardia* aangetroffen. In mest van legkippen werd eveneens geen *Giardia* aangetroffen, maar wel *Cryptosporidium* in 6 van de 66 onderzochte koppels in gehalten van gemiddeld $1,3$ - $7,8 \times 10^6$ oöcysten per kg. De berekende jaaremissie kwam daarmee op $4,2 \times 10^{14}$ oöcysten.

De gecombineerde jaaremissie van de vleeskalveren en legkippen bedraagt $1,62 \times 10^{15}$ *Cryptosporidium*-oöcysten en $1,8 \times 10^{15}$ *Giardia*-cysten. Het overgrote deel daarvan wordt geleverd door de mest van vleeskalveren. De werkelijke bijdrage van mest van vleeskalveren aan de belasting van het oppervlaktewater is onbekend, omdat de mate van afspoeling en de overleving van de (oö)cysten nog niet bekend is. Als echter slechts 1% ervan uit- of afspoelt naar het oppervlaktewater, wordt de lozing via huishoudelijk afvalwater al overschaduwd. Ook zou afspoeling van op het land uitgereden of geïnjecteerde kalvermest na hevige neerslag voor grote piekbelastingen kunnen zorgen.

De *Cryptosporidium*-oöcysten die in mest van legkippen zijn aangetroffen betreft vermoedelijk de niet-menspathogene soort *C. baileyi*. In de Nederlandse gebieden aan de Maas bevinden zich veel pluimveebedrijven. In veel gemeenten bedraagt de pluimveedichtheid meer dan 10.000 per km² (Medema *et al.*, 1996). Deze bedrijven zouden belangrijke hoeveelheden *C. baileyi* in het oppervlaktewater kunnen brengen die wel met de detectiemethode worden aangetoond, maar geen gezondheidkundige betekenis hebben voor de mens. Deze situatie maakt het noodzakelijk om methoden te ontwikkelen om bij dit soort onderzoek te kunnen differentiëren tussen wel- en niet-menspathogene soorten. De aantallen in mest van melkkoeien, schapen en varkens zijn nog onvoldoende onderzocht. Aangezien de incidentie van cryptosporidiosis en giardiasis bij volwassen dieren veel lager is dan bij jongvee, is de bijdrage aan de emissie mogelijk van minder belang.

7.2.3 Kalvermestverwerkingsbedrijven

In Nederland wordt circa 25% van alle kalvergier aangeleverd bij vier kalvermestverwerkingsbedrijven. Bij een van deze bedrijven is de aangeleverde kalvergier onderzocht. *Cryptosporidium* en *Giardia* waren in elk van de monsters aanwezig in gemiddelde gehalten van $7,5 \times 10^6$ *Cryptosporidium*-oöcysten per kg en $1,4 \times 10^6$ *Giardia*-cysten per kg. Bij lage temperaturen blijken beide parasieten lang stabiel in kalvergier; na 12 maanden waren de gehalten met slechts ongeveer 50% gereduceerd.

Bij gierverwerking wordt mest ingedikt. In de ingedikte mest was nog 17-19% van de (oö)cysten aanwezig. Het waterige effluent bevat $1,1 \times 10^5$ oöcysten per liter en $7,7 \times 10^3$ cysten per liter. Dat betekent dat van de aangevoerde (oö)cysten 0,44-1,2% via het effluent wordt geloosd.

7.2.4 Slachthuisafvalwater

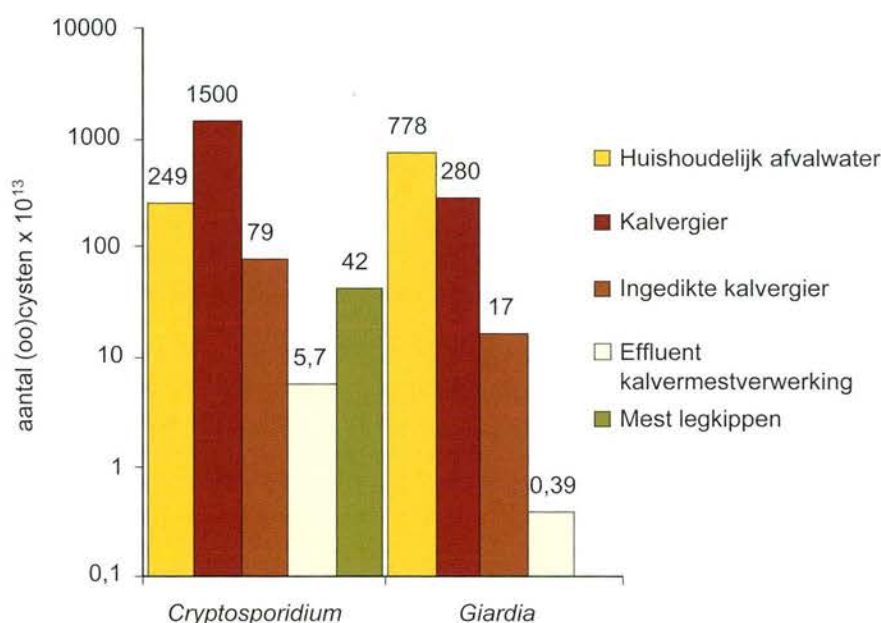
De *Cryptosporidium*- en *Giardia*-gehalten in afvalwater van runder-, varkens- en pluimveeslachthuizen zijn laag en liggen hooguit in grootte-orde op het niveau van de gehalten in oppervlaktewater. Derhalve is de bijdrage van slachthuisafvalwater aan de emissie van *Cryptosporidium* en *Giardia* naar het oppervlaktewater te verwaarlozen. Slachthuisafvalwater van vleeskalveren is echter nog niet onderzocht. Uit het onderzoek van het slachthuisafvalwater blijkt wel, dat varkens in grootte-orde in gelijke mate besmet zijn met zowel *Cryptosporidium* als *Giardia*. Gezien de mestproductie van deze dieren zouden ook varkens potentieel een belangrijke emissiebron kunnen zijn van *Cryptosporidium* en *Giardia*, evenals kalveren.

7.2.5 Totale 'productie' van *Cryptosporidium* en *Giardia*

Om een indruk te krijgen van het relatieve belang van de verschillende bronnen, zijn de meetgegevens van protozoa in mest en afvalwater gecombineerd met gegevens over de totale hoeveelheid huishoudelijk afvalwater en mest die in Nederland jaarlijks wordt geproduceerd. Figuur 7.1 geeft een overzicht van de geschatte totale bruto emissie (aantal (oö)cysten/jaar) van *Cryptosporidium* en *Giardia* in Nederland in ongezuiverd huishoudelijk afvalwater, effluent en ingedikte mest van kalvermestverwerking, en in gier van vleeskalveren en mest van legkippen. Ter verduidelijking: deze geschatte gehalten zijn de hoeveelheden die aanwezig zijn in mest en afvalwater vanuit huishoudens, maar niet de uiteindelijke netto emissies naar oppervlaktewater.

Op basis van de nu bekende gegevens kan worden berekend dat in Nederland jaarlijks $1,87 \times 10^{16}$ *Cryptosporidium*-oöcysten worden 'geproduceerd'. Kalvergier levert daarvan 85%, huishoudelijk afvalwater 13% en mest van legkippen 2%. Voor *Giardia* levert huishoudelijk afvalwater 72% en kalvergier 28%.

De emissie via effluent van kalvermestverwerkingsbedrijven die via het riool naar de rwzi gaat, is op de schaal van Nederland verwaarloosbaar ten opzichte van de andere bronnen (figuur 7.1). Op lokaal niveau zou dit effluent echter wel voor een grote belasting van het oppervlaktewater kunnen zorgen.



Figuur 7.1 Geschatte totale emissie (aantal (oö)cysten/jaar) aan *Cryptosporidium* en *Giardia* in huishoudelijk afvalwater, mest van kalveren en legkippen en ingedikte mest en het effluent van kalvermestverwerking in Nederland.

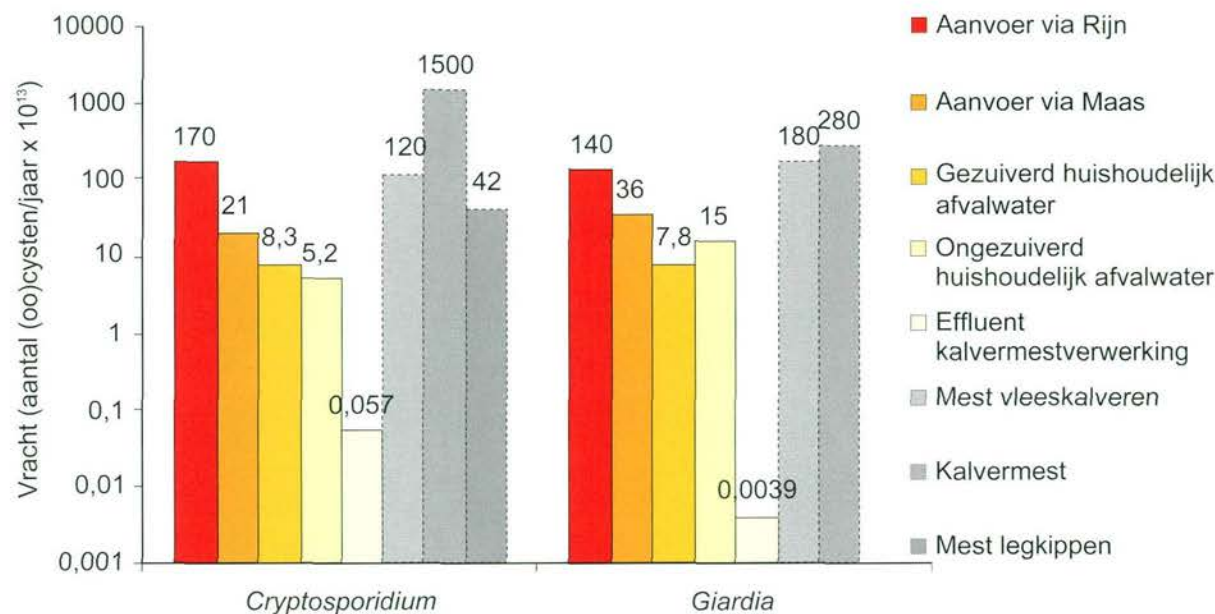
7.2.6 Aanvoer via Rijn en Maas

Door de geometrisch gemiddelde gehalten van zowel protozoa als virussen in de Rijn bij Lobith en de Maas bij Eijsden te vermenigvuldigen met de gemiddelde waterafvoer van de beide rivieren in 1997-1998, is de gemiddelde vracht van *Cryptosporidium*, *Giardia* en entero- en reovirussen van beide rivieren berekend.

De jaarlijkse protozoavracht in de Rijn bij Lobith was $1,7 \times 10^{15}$ *Cryptosporidium*-oöcysten en $1,4 \times 10^{15}$ *Giardia*-cysten en voor de Maas bij Eijsden $2,1 \times 10^{14}$ oöcysten en $3,6 \times 10^{14}$ cysten. De jaarlijkse vracht aan enterovirussen was $7,6 \times 10^{12}$ voor de Maas en $5,8 \times 10^{12}$ voor de Rijn. Voor reovirussen lag de jaarlijkse vracht op $1,2 \times 10^{13}$ voor de Maas en $1,1 \times 10^{14}$ voor de Rijn.

7.3 Relatieve belang van de verschillende bronnen

Het relatieve belang van de verschillende emissiebronnen is vergeleken door voor elke bron de totale jaarlijkse vracht naar Nederlands oppervlaktewater te berekenen. Voor aanvoer via Rijn en Maas konden de berekende vrachten direct worden gebruikt. Voor huishoudelijk afvalwater is de vracht berekend uit de meetgegevens over *Cryptosporidium* en *Giardia* in ruw rioolwater en de zuiveringsefficiëntie en uit gegevens over het totale volume gezuiverd en ongezuiverd huishoudelijk afvalwater dat jaarlijks in Nederland wordt geloosd. De lozing via het gezuiverde effluent van kalvermestverwerking is gebaseerd op een zuiveringsefficiëntie van 94% voor *Cryptosporidium* en 98% voor *Giardia*. Figuur 7.2 geeft een overzicht van de geschatte vrachten naar Nederlands oppervlaktewater in aantallen (oö)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia* per jaar.



Figuur 7.2 Geschatte vracht naar Nederlands oppervlaktewater (aantal (oö)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia* per jaar) via Rijn en Maas, de lozing van (on)gezuiverd huishoudelijk afvalwater en het effluent van kalvermestverwerkingsbedrijven in Nederland. De werkelijke bijdrage van mest via uit- en afspoeling naar het oppervlaktewater is onbekend en is daarom als potentieel aangegeven (= de totale jaarlijkse 'productie' van (oö)cysten via mest).

Daaruit blijkt dat de aanvoer via Rijn en Maas de grootste vracht levert. Deze vracht belast een groot deel van de Nederlandse oppervlaktewateren, omdat deze wordt gevoed door deze twee rivieren. Voor de oppervlaktewateren die niet of slechts een klein deel van het jaar door de Rijn en Maas worden beïnvloed, is lozing van huishoudelijk afvalwater en van het effluent van de kalvermestverwerking een belangrijke bron. Mest van vleeskalveren en legkippen is een potentiële relevante bron. De mate waarin *Cryptosporidium*

en *Giardia* in de mest van vleeskalveren, legkippen of andere dieren naar oppervlaktewater kunnen uit- of afspoelen is nog onbekend. Hierdoor kan geen reële schatting worden gemaakt van de vracht vanuit deze bronnen naar oppervlaktewater. Wel is dit de totale hoeveelheid mest die over alle agrarische gebieden van Nederland wordt uitgespreid. Dat betekent waarschijnlijk dat ook uit- en afspoeling van dierlijke mest voor de grote rivieren en de wateren die daar direct door worden beïnvloed, in Nederland niet de belangrijkste bron zal zijn. Voor regionale of lokale wateren is dit wel mogelijk.

7.4 Oppervlaktewater met drinkwaterfunctie

Op alle onderzochte onttrekkingspunten zijn zowel *Cryptosporidium*-oöcysten als *Giardia*-cysten aangetroffen in 33-100% van de monsters voor *Cryptosporidium* en 67-100% voor *Giardia*. De gemiddelde gehalten (gecorrigeerd voor het rendement) aan *Cryptosporidium*-oöcysten varieerden van 1,4-87 per liter en *Giardia* van 1,5-95 per liter. Er was een seizoensvariatie zichtbaar op de meeste locaties, waarbij de *Cryptosporidium*- en *Giardia*-gehalten in de zomerperiode relatief laag waren met in de nazomer en herfst een snelle stijging.

In het RIWA-onderzoek van 1995 waren de protozoagehalten in het Nederlandse deel van de Rijn en Maas lager dan bij de grensovergang. Ook in dit onderzoek zijn de *Cryptosporidium*- en *Giardia*-gehalten het hoogst bij Tailfer en Eijsden en worden lager naarmate de Maas verder Nederland inkomt. De indicatorbacteriën laten een vergelijkbaar beeld zien. Dit betekent dat de fecale verontreinigingsgraad van het Maaswater afneemt. Dit kan door verdunning van het verontreinigde water met schoner water uit de Nederlandse beken, rivieren en polders en mogelijk in combinatie met afsterving en sedimentatie. Omdat de (gemiddelde) gehalten van thermotolerante bacteriën van de coligroep (die snel afsterven) en *Cryptosporidium*-oöcysten (die persistent zijn) op dezelfde wijze aflopen, lijkt afsterving geen belangrijke rol te spelen.

In het Albertkanaal nemen de gehalten aan *Giardia* en indicatorbacteriën ook af ten opzichte van de Maas bij Tailfer. Het kanaal wordt gevoed vanuit de Maas bij Luik. Ook hier kan verdunning, weer mogelijk in combinatie met sedimentatie en/of afsterving de oorzaak zijn.

Uit de metingen in het Rijnstroomgebied is ook zichtbaar dat de protozoagehalten afnemen in Nederland, hoewel in het Lekkanaal de ene hoge meetwaarde voor *Giardia* het gemiddelde in het Lekkanaal boven de Rijn bij Lobith laat uitkomen. De gehalten in het IJsselmeer bij Andijk, met een lange verblijftijd (afsterving, sedimentatie, predatie) waren relatief laag. Ook hier werd dit beeld bevestigd door de indicatorbacteriën.

Uit het verschil tussen de gemeten gehalten in oppervlaktewater en het maximaal toelaatbare gemiddelde gehalte in drinkwater, zoals omschreven in het concept beleidsstandpunt van VROM (1995) en opgenomen in het advies voor de herziening van de Waterleidingwet (Versteegh *et al.*, 1999), is de benodigde verwijderingscapaciteit berekend. Daarbij spelen twee variatiebronnen die de zekerheid van deze berekening beïnvloeden een rol: de variatie in de gemeten gehalten (in sommige monsters zitten hoge gehalten en in sommige lage) en de variatie in de opbrengst van de meetmethode. Om deze beide variatiebronnen in de berekening tot hun recht te laten komen, is hier gekozen voor een Monte Carlo analyse: uit de gegevensset van de metingen van het gehalte ($n = 12$) en uit de gegevensset van de rendementsmetingen van de onttrekkingspunten (door Kiwa, $n = 33$) is 5000x random een gehalte en een rendement getrokken. Deze twee getallen zijn gebruikt om een gecorrigeerd gehalte te berekenen. Wat daaruit resulteert, is per onttrekkingspunt een set van 5000 gecorrigeerde gehalten. Uit de wijze waarop deze gegevensset is verdeeld kunnen de betrouwbaarheidsintervallen worden berekend. De gegevenssets zijn daartoe gefit aan een log-normale verdeling. Het (rekenkundig) gemiddelde en 95%-betrouwbaarheidsinterval van deze verdeling zijn gebruikt voor het berekenen van de benodigde verwijdering (tabel 5.6 en 5.7). Deze varieert afhankelijk van de mate van verontreiniging van de grondstof en de variatie daarin, van 5,8-7,0 $^{10}\log$ -eenheden op basis van de gecorrigeerde gemiddelde concentratie aan *Cryptosporidium*-oöcysten en van 6,0-7,8 $^{10}\log$ -eenheden op basis van de gecorrigeerde gemiddelde concentratie aan *Giardia*-cysten. De berekende benodigde verwijdering op basis van de 95%-betrouwbaarheidsgrens lag voor beide protozoa op alle onttrekkingspunten 0,5-0,6 $^{10}\log$ -eenheden hoger (tabel 5.6 en 5.7).

7.5 Oppervlaktewater met zwemwaterfunctie

Op de drie onderzochte zwemlocaties werden *Cryptosporidium* en *Giardia* gedurende het gehele badseizoen in het zwemwater aangetoond. Hun gehalten waren duidelijk onderling gecorreleerd. Op elk van de drie onderzochte locaties voldeed de microbiologische kwaliteit van het zwemwater (op basis van het gehalte aan thermotolerante bacteriën van de coligroep) ruim aan de zwemwaternorm. De aantallen thermotolerante bacteriën van de coligroep lagen wel net boven het niveau waarboven een meetbare verhoging van de kans op maagdarminfecties optreedt (Van Asperen *et al.*, 1998). Er was geen relatie tussen de routine waterkwaliteitsparameter (thermotolerante bacteriën van de coligroep) en de aantallen parasieten.

Om een indruk te krijgen van de gezondheidsrisico's voor zwemmers zijn drie blootstellingsscenario's (infrequente zwemmer tot frequente zwemmer) opgesteld.

Een analyse van het infectierisico op basis van deze drie blootstellingsscenario's geeft aan dat bij de gemeten aantallen *Cryptosporidium* en *Giardia* het risico bij enkelvoudige blootstelling relatief laag is (0,2-0,5%). Duidelijk is wel dat het risiconiveau van zwemmen in oppervlaktewater ruim boven het maximaal acceptabele jaarrisico ligt, zoals dat voor drinkwaterconsumptie wordt gehanteerd (0,01% ofwel 1 infectie per 10.000 personen per jaar). Bij herhaalde blootstelling wordt dit risico duidelijk hoger (14-71%). Een zwemmer die regelmatig een dergelijke zwemgelegenheid bezoekt, heeft dus een aanzienlijk risico op het oplopen van een infectie met *Cryptosporidium* en *Giardia*.

De zwemlocaties waren geselecteerd op indirecte verontreiniging vanuit lozingen van huishoudelijk afvalwater, omdat daar de kans om beide parasieten aan te treffen het grootst was en in huishoudelijk afvalwater het grootste deel van de parasieten menspathogeen is. Derhalve betreft het een *worst case* analyse. Deze lozingen vonden niet direct op het zwemwater plaats, maar het zwemwater werd gevoed door oppervlaktewater dat via rioollozingen werd verontreinigd (Maas bij Eijsden, Rijn bij Lobith en Maas en Rijn bij Bovensluis).

De gemeten aantallen weerspiegelen dus de gehalten in zwemwater met een dergelijke verontreinigingsbron. Niet gemeten is of en in welke mate beide parasieten voorkomen in zwemwater waar huishoudelijk afvalwater geen of een ondergeschikte bron van verontreiniging is. Vanuit de ervaringen uit het onderzoek van de waterleidingbedrijven kan worden verwacht dat beide parasieten ook voorkomen in dergelijke wateren.

De huidige meetmethoden zijn niet specifiek voor de menspathogene soorten *Cryptosporidium* en *Giardia*. Het is mogelijk dat een deel van de (oö)cysten dat in het water is aangetroffen afkomstig is van andere bronnen. Bij de selectie van de locaties is echter gekozen voor zwemgelegenheden die door lozingen van (al dan niet gezuiverd) huishoudelijk afvalwater worden beïnvloed en waarvan geen hoge aantallen vogels gerapporteerd zijn. De methode maakt ook geen onderscheid tussen dode en levende (oö)cysten. Een deel van de aangetroffen (oö)cysten is mogelijk niet levensvatbaar. Deze zijn wel meegenomen in de analyse van het infectierisico. Aan de andere kant worden niet alle (oö)cysten die in het water aanwezig zijn voldoende aangekleurd om gedetecteerd te worden. Op basis van deze en literatuurgegevens is het niet mogelijk een kwantitatieve schatting te maken van het effect van deze meetfouten, alleen dat ze elkaar tegenwerken. Dat betekent dat de berekende infectierisico's als een indicatie moeten worden beschouwd van de grootte-orde van het gezondheidsrisico.

7.6 Correlatie met andere waterkwaliteitsparameters

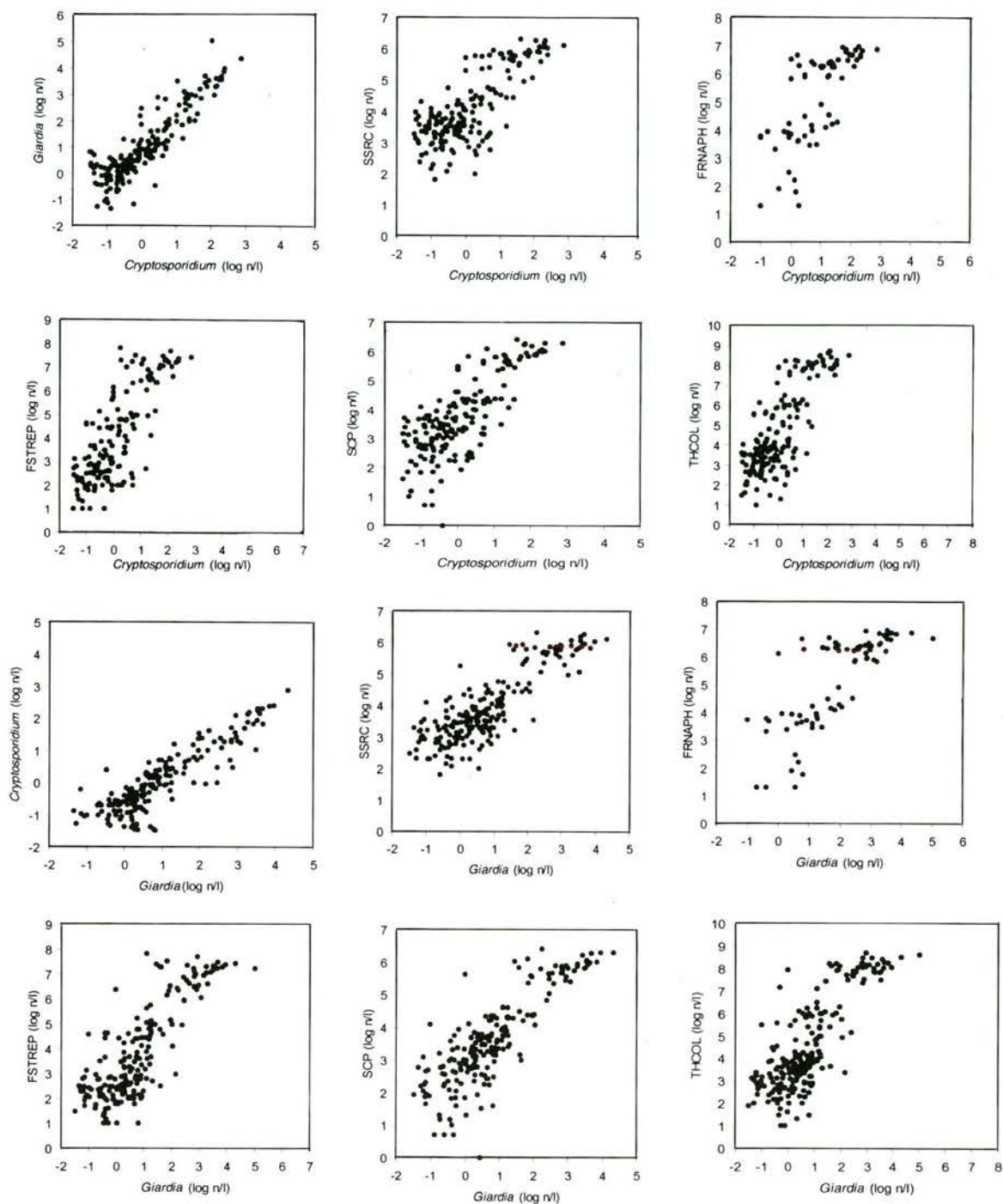
In de routinetesten van de microbiologische waterkwaliteit wordt gebruik gemaakt van indicatororganismen voor fecale verontreiniging (*E. coli*, fecale streptococci en sporen van sulfietreducerende clostridia of *Clostridium perfringens*). Omdat deze net als de protozoa van fecale origine zijn, ligt een correlatie in hun gehalten voor de hand. Als deze correlatie voldoende sterk is, zou op basis van metingen aan indicatororganismen het gehalte aan protozoa kunnen worden voorspeld. Ook zou het mogelijk kunnen zijn dat indicatororganismen piekverontreinigingen aangeven.

Bij de betreffende hoofdstukken is ingegaan op de correlatie op de onderzoekslocaties. In alle gevallen bleek het *Cryptosporidium*- en *Giardia*-gehalte sterk te correleren. Hoewel dit verklaard zou kunnen worden aan de hand van de overeenkomsten in hun herkomst, is waarschijnlijk deze correlatie mede bepaald doordat beide parasieten in hetzelfde monster met dezelfde opwerkmethode werden bepaald. Dit geeft aan dat de variaties in het rendement van de opwerkmethode ook hier de gevonden verbanden beïnvloeden.

In ongezuiverd huishoudelijk afvalwater bleek het *Cryptosporidium*- en *Giardia*-gehalte te correleren met SCP, FRNAPH en FSTREP. In het rwzi-effluent was er een correlatie met SSRC en SCP.

Voor oppervlaktewater als geheel en voor de stroomgebieden van Rijn en Maas afzonderlijk correleerden beide parasieten sterk met elkaar en daarnaast met SCP, SSRC, THCOL en FSTREP. Met de troebelheid werd voor oppervlaktewater als geheel en voor het Rijnstroomgebied een correlatie gevonden met de gehalten aan beide parasieten. In de Maas correleerde de troebelheid allen met *Giardia*. Voor *Giardia* werd op veel locaties een negatieve correlatie met de watertemperatuur gevonden, terwijl deze voor *Cryptosporidium* alleen in het ARK en IJsselmeer bestond. Dit houdt waarschijnlijk verband met de afsterving van *Giardia* die sneller gaat bij hogere temperaturen. Voor *Cryptosporidium* is de afsterving trager, en werd een dergelijke relatie met de watertemperatuur ook zelden gevonden.

In figuur 7.3 zijn alle meetgegevens van alle locaties voor *Cryptosporidium* en *Giardia* weergegeven, uitgezet tegen elkaar en tegen het gehalte aan SSRC, SCP, THCOL, FSTREP en FRNAPH. Deze correlaties zijn in alle gevallen zeer significant. Bij de meeste correlaties is te zien dat ruw rioolwater met de hoogste aantallen een apart cluster van metingen vormt. Ook het effluent en oppervlaktewater zijn in een aantal gevallen als clusters herkenbaar, met name in de relaties met de FRNAPH, maar ze lopen soms direct in elkaar over. De gevonden correlaties geven allemaal aan dat naarmate het water sterker fecaal verontreinigd is, de gehalten aan parasieten hoger zijn.



Figuur 7.3 Relatie tussen de gehalten aan protozoa en indicatororganismen in alle matrices.

Voor *Giardia* en *Cryptosporidium* is de correlatie evenredig, evenals voor *Giardia* met de indicatororganismen. Dat wil zeggen dat bij een stijging van het gehalte aan de indicator met een factor 10, het *Giardia*-gehalte ook circa een factor 10 stijgt. Voor

Cryptosporidium lopen de lijnen met de indicatororganismen steiler, vooral met THCOL en FSTREP. Dat betekent dat de gehalten aan indicatoren sneller stijgen dan de gehalten aan *Cryptosporidium*.

Op alle onderzochte innamepunten is de tendens zichtbaar dat in de zomer de laagste aantallen protozoa gevonden zijn en dat de pieken zich met name voordoen in de winterperiode. In de zomer is de afvoer van de rivieren lager en de watertemperatuur hoger, waardoor afsterving en sedimentatie mogelijk een belangrijkere rol spelen dan in de winter. In het rwzi-effluent is echter ook de tendens zichtbaar dat in de (na)zomer de gehalten relatief laag zijn, dus ook de toevoer via deze route neemt af in de zomerperiode.

Op veel locaties is het (geometrisch gemiddelde) *Giardia*-gehalte 2-3 x hoger dan het *Cryptosporidium*-gehalte. Zoals eerder beschreven vormen de zwemwateren daarop een uitzondering. Ook in het Albertkanaal, Twentekanaal en de Afgedamde Maas zijn de *Cryptosporidium*-gehalten 2-3 x hoger dan de *Giardia*-gehalten. Dit zijn alle relatief stagne wateren in vergelijking met de overige locaties in de Maas en Rijn. Overlevingsstudies geven aan dat *Cryptosporidium* persistenter is in water dan *Giardia* (DeReignier *et al.*, 1989; Chauret *et al.*, 1995; Medema *et al.*, 1997b). De verschuiving die in deze studie is waargenomen, is mogelijk het gevolg van de snellere afsterving van *Giardia*.

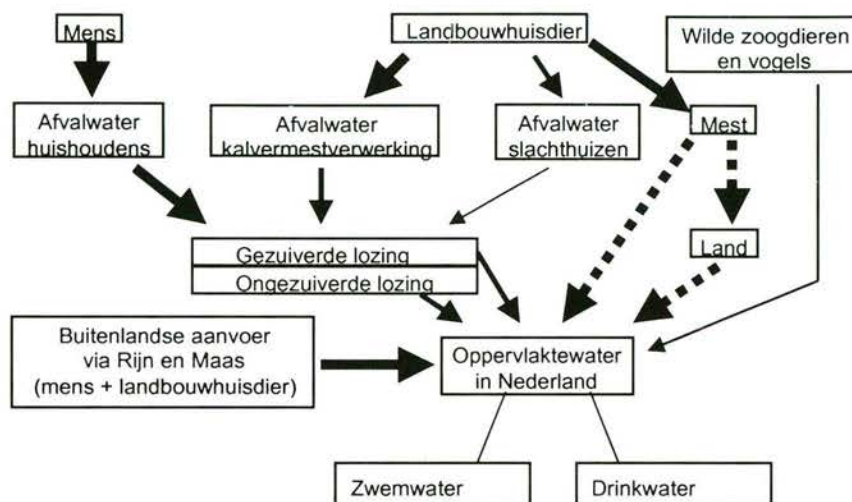
7.7 'Early warning' van piekgehalten aan protozoa

In oppervlaktewater zijn correlaties gevonden tussen het gehalte aan protozoa met het debiet en met de troebelheid. Zowel het debiet als de troebelheid zijn, zeker bij een plotselinge toename, een indicatie voor een verhoogde mate van verontreiniging van de rivier door regenval of dooi. In zo'n periode wordt dierlijke mest van het land afgespoeld en wordt meer huishoudelijk afvalwater geloosd door overstorten en overbelasting. Omdat deze parameters eenvoudig en continu meetbaar zijn, zouden zij gebruikt kunnen worden als 'early warning system' voor een fecale belasting met de daarin aanwezige pathogenen. Deze parameters moeten bij een stijging van het gehalte aan protozoa in het water ook een duidelijke stijging laten zien. In het Maasstroomgebied zijn op drie locaties de debieten gemeten: Tailfer, Eijsden en Keizersveer. Bij alle pieken of snelle stijgingen van het gehalte aan een van beide of beide protozoa was een stijging van het debiet zichtbaar op deze drie locaties. De troebelheid is alleen bij Keizersveer gemeten. Daar is de troebelheid niet altijd hoog bij hoge gehalten aan *Cryptosporidium*.

Voor het Rijnstroomgebied is alleen bij Lobith het debiet gemeten. Een hoog gehalte aan *Cryptosporidium* is gevonden bij een hoog debiet; de *Giardia*-piek ging echter niet vergezeld van een debietstijging.

7.8 Routes van *Cryptosporidium* en *Giardia* naar het oppervlaktewater

In figuur 7.4 staan de routes van de protozoa naar het oppervlaktewater zoals bekend is geworden in dit onderzoek.



Figuur 7.4 Routes van belangrijke bronnen van *Cryptosporidium* en *Giardia* naar het oppervlaktewater in Nederland. De dikte van de pijl geeft het relatieve belang van de route aan. Gestippelde pijlen geven aan dat niet voldoende informatie aanwezig is voor een reële schatting.

Er is nu meer inzicht in de buitenlandse aanvoer, de route van de mens en landbouwhuisdieren (mestverwerking en slachthuizen) via het afvalwater naar het oppervlaktewater. Van slechts enkele landbouwhuisdieren (vleeskalveren en legkippen) is voldoende informatie verzameld over de jaarlijkse emissie van *Cryptosporidium* en *Giardia*. Er zijn geen gegevens verzameld over het transport van beide protozoa uit dierlijke mest naar het oppervlaktewater. Over de route van (oö)cysten van de natuurlijke fauna naar het oppervlaktewater zijn de gegevens nog schaars.

8 Aanbevelingen

- De bepalingsmethode zodanig verbeteren, dat een hoger en constanter rendement verkregen wordt. Verder is het van belang informatie te verzamelen over levensvatbaarheid en soortsbepaling van de gevonden (oö)cysten om de werkelijke belasting met ziekteverwekkende parasieten te kunnen bepalen.
- Bepalen wat de daadwerkelijke afdoding is bij desinfectie van rwzi-effluenten, bijvoorbeeld UV.
- In dit onderzoek is met name aandacht besteed aan de infectierisico's van de protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia* voor de mens via inname van drinkwater en tijdens zwemmen in oppervlaktewater. Of de aangetoonde gehalten in het Nederlandse oppervlaktewater ook een risico inhouden voor andere doelgroepen, zoals voor vee bij vee-drenking, is niet bekend en verdient in de toekomst nadere aandacht.
- Meer gegevens verzamelen over de emissie van (oö)cysten door o.a. jong melkvee, varkens en vleeskuikens en de gehalten aan (oö)cysten in afvalwater van slachthuizen voor vleeskalveren.
- Nader onderzoek uitvoeren naar de uit- en afspoeling van protozoa in mest op het land.
- Meer kennis verzamelen van de ruwwaterkwaliteit voor de drinkwaterbedrijven die oppervlaktewater gebruiken en de kennis over de verwijderingcapaciteit tijdens zuiveringsprocessen vergroten. Vooral pieken in de belasting maken een betrouwbare schatting van de benodigde verwijdering moeilijk. Het vaststellen van de verwijderingscapaciteit van de zuiveringsprocessen zal vooral door locatie-specifieke metingen van surrogaatparameters dienen te geschieden.
- De buitenlandse aanvoer blijkt de belangrijkste bron van de (oö)cysten in Rijn en Maas te zijn. Internationaal overleg dient daarom plaats te vinden om een verbetering van de waterkwaliteit te bewerkstelligen.
- Meer zwemwaterlocaties dienen onderzocht te worden, in het bijzonder in gebieden waar uitspoeling van mest, lozing van ongezuiverd rioolwater en effluenten van rwzi's een belangrijke rol zouden kunnen spelen.
- Seroprevalentie-onderzoek bij zwemmers kan gegevens opleveren over de besmettingsgraad.
- Met behulp van de in dit onderzoek verzamelde gegevens kan de emissie en verspreiding van de protozoa gemodelleerd worden, waarbij de datasets van het oppervlaktewater als validatiepunten kunnen dienen. Emissie- en verspreidingsmodellen zijn te gebruiken voor het voorspellen van gehalten op zwemwaterlocaties en bij nieuw te realiseren innamepunten, bijvoorbeeld voor huishoudwater.

9 Dankwoord

Namens de leden van de werkgroep willen we graag een aantal personen en instanties bedanken voor hun medewerking aan dit project: medewerkers van de verschillende laboratoria voor het uitvoeren van de monsterneming en de analyses; medewerkers van de rioolwaterzuiveringsinrichtingen (rwzi's); regionale diensten; meetstations; slachthuizen en kalvergierbedrijven en Angelique Baardse die het rapport van een consistente lay-out heeft voorzien en het taalkundig op niveau heeft gebracht. Zonder hun inzet hadden we dit project niet kunnen voltooien.

Literatuur

- Anonymus. CBS-Landbouwdatabank 1980-1997. Elsevier.
- Armon, R & Payment, P. 1988. A modified mCP medium for enumerating *Clostridium perfringens* from water samples. *Can. J. Microbiol.* **34**: 78-79.
- ASTM, 1991. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in low turbidity water by fluorescent antibody procedure. Annual Book of ASTM Standards, VOL. 11.01.
- Badenoch, J. 1990. *Cryptosporidium* in water supplies. HMSO, London.
- Bisson, JW & Cabelli, VJ. 1979. Membrane filtration method for *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 55-66.
- Box, E. 1981. Observations on *Giardia* in budgerigars. *J. Protozool.* **28**: 491-494.
- Bull, SA, Chalmers, RM, Sturdee, AP & Healing, TD. 1998. A survey of *Cryptosporidium* species in Skomer bank voles (*Clethrionomys glareolus skomerensis*). *J. Zool. London* **244**: 119-122.
- Casemore, DP, Wright, SE & Coop, RL. 1997. Cryptosporidiosis – Human and animal epidemiology. In: R Fayer (ed.). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Raton, USA: 65-92.
- Chalmers, RM, Sturdee, AP, Bull, SA & Miller, A. 1995. Rodent reservoirs of *Cryptosporidium*. In: WB Betts, D Casemore, C Fricker, H Smith & J Watkins (eds). *Protozoan parasites and water*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 63-66.
- Chauret, C, Chen, P, Springthorpe, S & Sattar, S. 1995. Effect of environmental stressors on the survival of *Cryptosporidium* oocysts. Proceedings AWWA WQTC, New Orleans.
- Chauret, C, Springthorpe, S & Sattar, S. 1999. Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. *Can. J. Microbiol.* **45**: 257-262.
- Clancey, JF, Gollnitz, WD & Tabib, Z. 1994. Commercial labs: how accurate are they? *J. AWWA* **86**: 89-97.
- Cox, DR & Hinkley, DV. 1974. Theoretical Statistics. Chapman and Hall, London: 369-370.
- Craun, GF, Hubbs, SA, Frost, F, Calderon, RL & Via, SH. 1998. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *J. AWWA* **90**: 81-91.
- D'Antonio, RG, Winn, RE, Taylor, JR, Gustafson, TL, Current, WL, Rhodes, MM, Gary, GW & Zajac, RA. 1985. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Ann. Intern. Med.* **103**: 886-888.
- Davies, RB & Hibler, CP. 1979. Animal reservoirs and cross-species transmission of *Giardia*. In: W Jakubowski & JC Hoff (eds). *Waterborne transmission of giardiasis*. USEPA, Ohio: 104-126.
- De Leeuw, PW, Moerman, A, Pol, JMA, Talmon, FP & Zijderveld, FG. 1984. Epidemiological observations on cryptosporidiosis in dairy herds in the Netherlands. Proc. 13th World Congress on diseases in cattle, Durban, South Africa: 104.

- DeReignier, DP, Cole, L, Schupp, DG & Erlandsen, SL. 1989. Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river and tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1222-1229.
- Dykes, AC, Juranek, DD, Lorenz, RA, Sinclair, S, Jakubowski, W & Davies, RB. 1980. Municipal waterborne giardiasis: an epidemiological investigation. *Ann. Int. Med.* **92**: 165-170.
- Elzenga, JG, Quarles van Ufford, CHA, Slootweg, J, Van Dijk, JC, Van den Roovaart, JC & Verstappen, GGC. 1998. PROMISE. Een scenariomodel voor de prognoseberekening van emissies naar het oppervlaktewater. Rapportnr. 773003006. RIVM/RIZA.
- Erlandsen, SL. 1994. Biotic transmission- Is giardiasis a zoonosis? In: RCA Thompson, JA Reynoldson & AJ Lymberly (eds). *Giardia: from molecules to disease*. CAB International, Wallingford: 83-97.
- Erlandsen, SL, Weisbrod, AR, Knudson, LW, Olereich, R, Dodge, WE, Jakubowski, W & Bemrick WJ. 1991a. Giardiasis in wild and captive bird populations: high prevalence in herons and budgerigars. *Int. J. Environ. Health* **1**:132-143.
- Erlandsen, SL, Bemrick, WJ & Jakubowski W. 1991b. Cross-species transmission of avian and mammalian *Giardia* species. *Int. J. Environ. Health* **1**:144-152.
- Erlandsen, SL & Bemrick, WJ. 1988. Waterborne giardiasis: source of *Giardia* cysts and evidence pertaining to their implication in human infection. In: PM Wallis & BR Hammond (eds). *Advances in Giardia research*. University of Calgary Press, Calgary, Canada: 227-236.
- Exner, M & Gornik, V. 1991. Cryptosporidiosis. Characterization of a new infection with special respect to water as source of infection. *Zbl. Hyg.*, **190**: 13-25 (in German with English summary).
- Fayer, R, Speer, CA & Dubey, JP. 1997. The general biology of *Cryptosporidium*. In: R Fayer (ed.). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC-Press, Boca Raton: 1-42.
- Feuerpfeil, I & Bischoff, K. 1998. Pathogene Bakterien und Parasiten als Faktoren der Wasserbeschaffenheit von Trinkwassertalsperren. In: U Miersch (ed.). *Entwicklung von Gewässertechnologien zur Sanierung von Talsperren und Seen*. Dresden: 333-365.
- Furtado, C, Adak, GK, Stuart, JM, Wall, PG, Evans, HS & Casemore, DP. 1998. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-5. *Epidemiol. Infect.* **121**: 109-119.
- Georgi, ME, Carlisle, MS & Smiley, ME. 1986. Giardiasis in the Great Blue Heron (*Ardea herodias*) in New York State: another potential source of waterborne giardiasis. *Am. J. Epidemiol.* **123**: 916-917.
- Grazcyk, TK, Fayer, R, Trout, JM, Lewis, EJ, Farley, CA, Sulaiman, I & Lai, AA. 1998. *Giardia* sp. cysts and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in the feces of migratory Canada geese (*Branta canadensis*). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2736-2738.
- Hayes, EB, Matte, TD, O'Brein, TR, McKinley, TW, Logsdon, GS, Rose, JB, Ungar, BLP, Word, DM, Pinsky, PF, Cummings, ML, Wilson, MA, Long, EG, Hurwitz, ES & Juranek, DD. 1989. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered water supply. *N. Eng. J. Med.* **320**: 1372-1376.
- Healy, GR. 1990. Giardiasis in perspective: the evidence of animals as a source of human *Giardia* infections. In: EA Meyer (ed.). *Giardiasis*. Elsevier, Amsterdam: 305-314.

- Heuvelink, AE, Tilburg, JJHC, Voogt, N, Van Pelt, W, Van Leeuwen, WJ, Strum, MJ & Van de Giessen, AW. 1999. Surveillance van bacteriële zoonoseverwekkers bij landbouwhuisdieren - Periode april 1997 tot en met maart 1998. RIVM, Bilthoven.
- Hoogenboezem, W, Schijven, JF, Nobel, PJ & Bergsma, J. 1999. De verwijdering van bacteriofagen tijdens duinpassage. *H₂O* **22**: 29-31.
- Hijnen, WAM, Van Veenendaal, DA, Van der Speld, WMH, Visser, A, Hoogenboezem, W & Van der Kooij, D. 2000. Enumeration of faecal indicator bacteria in large volumes using on site membrane filtration to assess water treatment efficiency. *Water Research* **34**: 1659-1655.
- Jakubowski, W. 1988. Purple burps and the filtration of drinking water supplies. *Am. J. Public Health* **78**: 123-125.
- Jakubowski, W, Sykora, JL, Sorber, CA, Casson, LW & Gavaghan, PD. 1991. Determining giardiasis prevalence by examination of sewage. *Wat. Sci. Tech.* **24**: 173-178.
- Joseph, C, Hamilton, G, O'Connor, M, Nicholas, S, Marshall, R & Maxwellsmith, R. 1991. Cryptosporidiosis in the Isle of Thanet: an outbreak associated with local drinking water. *Epidemiol. Infect.* **107**: 509-519.
- Karanis, P & Seitz, HM. 1996. Vorkommen und Verbreitung von *Giardia* und *Cryptosporidium* im Roh- und Trinkwasser von Oberflächenwasserwerken. *GWF Wasser Abwasser* **137**: 94-100.
- Ketelaars, HAM, Medema, G, Van Breemen, LWCA, Van der Kooij, D, Nobel, PJ & Nuhn, P. 1995. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the River Meuse and removal in the Biesbosch reservoirs. *Aqua* **44 Suppl. 1**: 108-111.
- Ketelaars, HAM, Kruidenier, L, Medema, GJ & De Bruijn, J. Verwijdering van *Cryptosporidium* en *Giardia* in de Biesbosch bekkens en de invloed van watervogels op de microbiologische waterkwaliteit. In prep.
- Kruidenier, L & Medema, GJ. 1996. Belasting en inactivatie van de protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia* van pompstation Weerseloseweg van NV Waterleidingbedrijf Oost-Twente. Rapport 289202012, RIVM, Bilthoven.
- Kulda, J & Nohynkova, E. 1978. In: JP Keizer (ed.). *Parasitic protozoa II*. Academic Press, New York, USA: 138.
- Laan, WPM, Slootweg, J, Knol, OM, Harmelink, M, Kusse, AAM, Van der Maas, CWM, Oostenrijk, R & Van den Berg, JC. 1996. Environmental information and planning model (RIM+). User's guide and background information. RIVM-rapport 776001005.
- LeChevallier, MW, Norton, WD & Lee, RG. 1991a. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2610-2616.
- LeChevallier, MW, Norton, WD, Lee, RG & Rose, JB. 1991b. Detection and treatment of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies. American Water Works Association Research Foundation, Denver.

- LeChevallier, MW, Norton, WD & Lee, RG. 1991c. Evaluation of a method to detect *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. In: JR Hall & GD Glysson (eds). *Meeting new challenges*, ASTM STP 1102. American Society for Testing and Materials. Philadelphia.
- MacKenzie, WR, Hoxie, NJ, Proctor, ME, Gradus, MS, Blair, KA, Peterson, DE, Kazmierczak, JJ, Addiss, DG, Fox, KR, Rose, JB & Davis, JP. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* **331**: 161-167.
- Madore, MS, Rose, JB, Gerba, CP, Arrowood, MJ & Sterling, CR. 1987. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. *J. Parasitol.* **73**: 702-705.
- Majewska, AC, Kasprzak, W & Werner, A. 1998. Prevalence of *Giardia* infection in livestock and the possibility of zoonotic transmission. *Acta Parasitologica* **43**: 1-3.
- Mayer, CL & Palmer, CJ. 1996. Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2081-2085.
- McClellan, P. 1998. Sydney Water Inquiry, final report. ISBN 0 7313 3073 0, New South Wales Premier Dept., Australia.
- Medema, GJ. 1992. *Cryptosporidium* en *Giardia* bij de drinkwaterbereiding. Literatuurstudie en oriënterend onderzoek. Report no 149103001. RIVM, Bilthoven.
- Medema, GJ. 1999. *Cryptosporidium* and *Giardia*: new challenges to the water industry. Thesis Universiteit Utrecht.
- Medema, GJ & Ketelaars, HAM. 1995. Betekenis van *Cryptosporidium* en *Giardia* voor de drinkwatervoorziening. *H₂O* **28**: 699-704, 709.
- Medema, GJ & Ketelaars, HAM. 1998. *Cryptosporidium* en *Giardia* in het afgeleverd water van het Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch. Kiwa rapport KOA 98.105. Kiwa, Nieuwegein.
- Medema, GJ & Schijven, JF. 2000. Modelling the discharge of *Cryptosporidium* and *Giardia* by domestic sewage and their dispersion in surface water. *Water Research* (accepted).
- Medema, GJ, Ketelaars, HAM & Hoogenboezem, W. 1996. *Cryptosporidium* en *Giardia* in Rijn en Maas. Rapportnummer 289202 015. RIVM/RIWA. Bilthoven, Amsterdam.
- Medema, GJ, Schijven, JF, De Nijs, ACM & Elzenga, JG. 1997a. Modelling the discharge of *Cryptosporidium* and *Giardia* by domestic sewage and their dispersion in surface water. In: *Proceedings Int. symp. on waterborne Cryptosporidium*. March 1997, Newport Beach CA, USA: 177-182.
- Medema, GJ, Bahar, M & Schets, FM. 1997b. Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, faecal enterococci and *Clostridium perfringens* in river water: Influence of temperature and autochthonous microorganisms. *Wat. Sci. Tech.* **35**: 249-252.
- Medema, GJ, Schets, FM, Ketelaars, HAM & Boschman, G. 1998. Improved detection and vital staining of *Cryptosporidium* and *Giardia* with flow cytometry. *Wat. Sci. Tech.* **35**: 249-252.
- Medema, GJ, Ketelaars, HAM, De Bruijn, J, Kruidenier, L, Engels, G & De Bruin, R. 1999. The significance of wildlife as source of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pretreatment reservoirs. In: GJ Medema. *Cryptosporidium* and *Giardia*: new challenges to the water industry. Thesis Universiteit Utrecht: 85-98.

- Medema, GJ, Hiemstra, P, Hijnen, WAM, Nobel, P & Van der Kooij, D. 2000. Multiple barriers for *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Water Supply* **18**: 430-434.
- Moore, AC, Herwaldt, BL, Craun, GF, Calderon, RL, Highsmith, AK & Juranek, DD. 1994. Waterborne disease in the United States, 1991 and 1992. *J. AWWA* **86**: 87-99.
- Morgan, UM, Sargent, KD, Deplazes, P, Forbes, DA, Spano, F, Hertzberg, H, Elliot, A & Thompson, RCA. 1998. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology* **117**: 31-37.
- Nasser, AM & Molgen, S. 1998. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater in Israel. IAWQ International Conference 'Health-related water Microbiology' 21-26 juni 1998, Vancouver, Canada.
- Nobel, PJ & Hoogenboezem, W. 1998. Voorkomen van *Giardia* en *Cryptosporidium* in ruw water bij Ps. Andijk (N.V. PWN Waterleidingbedrijf Noord-Holland). Kiwa rapport KOA 97.249. Kiwa, Nieuwegein.
- Nobel, PJ, Van Baar, M, Draak, R, *et al.*, 1999. Effecten van begrazing op waterkwaliteit, KOA-rapport 98.204. Kiwa, Nieuwegein.
- Ongerth, JE & Stibbs, HH. 1987. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 672-676.
- Payment, P & Franco, E. 1993. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2418-2424.
- Quilez, J, Sanchez-Acedo, C, Clavel, A, Del Cacho, E & Lopez Bernad, F. 1997. *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragon (northeastern Spain). *Parasitol.* **67**: 83-88.
- Regli, S, Rose, JB, Haas, CN & Gerba, CP. 1991. Modelling the risk from *Giardia* and viruses in drinking water. *J. AWWA* **83**: 76-84.
- Rose, JB, Cifirino, A, Madore, MS, Gerba, CP, Sterling, CR & Arrowood, MJ. 1986. Detection of *Cryptosporidium* from wastewater and freshwater environments. *Wat. Sci. Tech.* **18**: 233-239.
- Rose, JB, Dickson, LJ, Farrah, SR & Carnahan, RP. 1996. Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. *Water Research* **30**: 2785-2797.
- Rose, JB, Lisle, JT & LeChevallier, M. 1997. Waterborne cryptosporidiosis: incidence, outbreaks, and treatment strategies. In: R Fayer (ed.). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC-Press, Boca Raton: 93-109.
- Rose, J, Gerba, CP & Jakubowski, W. 1991. Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Environ. Sci. Technol.* **25**: 1393-1400.
- Sanford, SE. 1987. Enteric cryptosporidial infections in pigs: 184 cases (1981-1985). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190**: 695-698.
- Schijven, JF, Medema, GJ, De Nijs, ACM & Elzenga, JG. 1996. Emissie en verspreiding van *Cryptosporidium*, *Giardia* en enterovirussen via huishoudelijk afvalwater. Rapportnummer 289202014. RIVM, Bilthoven.

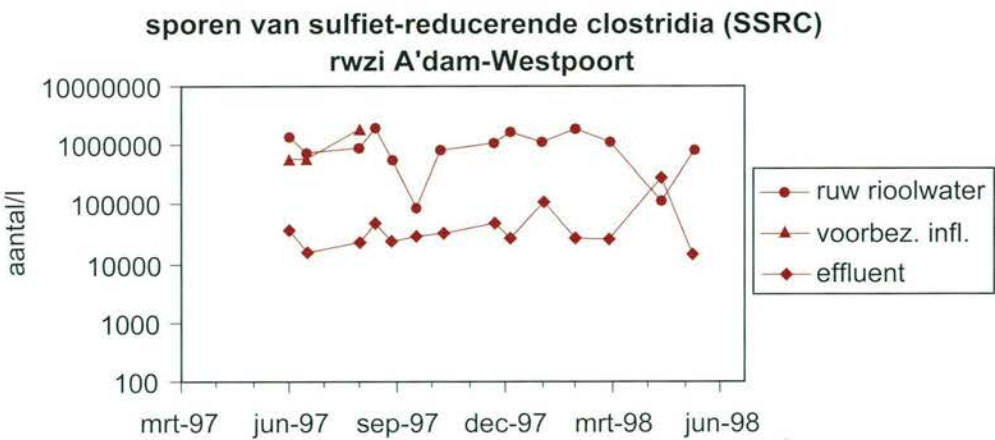
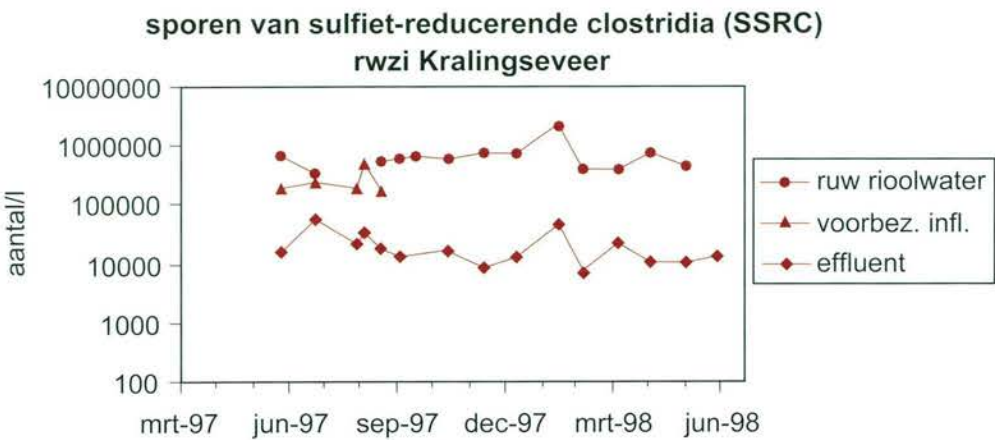
- Schijven, JF, Hoogenboezem, W, Hassanizadeh, SM & Peters, JH. 1999a. Modelling removal of bacteriophages MS2 and PRD1 by dune recharge at Castricum, Netherlands. *Water Resources Research* **35**: 1101-1111.
- Schijven, JF, De Bruin, HAM, Engels, GB & Leenen, EJTM. 1999b. Emissie van *Cryptosporidium* en *Giardia* door landbouwhuisdieren. Rapportnummer 289202023. RIVM, Bilthoven.
- Smith, HV, Girdwood, RWA, Patterson, WJ, Hardie, R, Green, LA, Benton, LA, Tulloch, W, Sharp, JCM & Forbes, GI. 1988. Waterborne outbreak of cryptosporidiosis. *Lancet* **24**: 1484.
- Sturdee, AP, Chalmers, RM & Bull, SA. 1999. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. *Veterinary Parasitology* **80**: 273-280.
- Sykora, JL, Sorber, CA, Jakubowski, W, Casson, LW, Cavaghan, PD, Shapiro, MA & Schott, MJ. 1991. Distribution of *Giardia* cysts in wastewater. *Wat. Sci. Tech.* **24**: 187-192.
- Tacal, JV, Sobieh, M & El Ahraf, A. 1987. *Cryptosporidium* in market pigs in southern California, USA. *Vet. Rec.* **120**: 615-616.
- Teunis, PFM, Van der Heyden, OG, Van der Giessen, JWB & Havelaar, AH. 1996. The dose-response relation in human volunteers for gastro-intestinal pathogens. Report 284550002. RIVM, Bilthoven.
- Teunis, PFM, Medema, GJ, Kruidenier, L & Havelaar, AH. 1997. Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* and *Giardia* in drinking water from a surface water source. *Water Research*: **31**: 1333-1346.
- Van Asperen, IA, Medema, GJ, Klokman-Houweling, JM, Schep, G, Nooitgedagt, A, Bol, E, Van de Laar, MJW & Havelaar, AH. 1993. Onderzoek naar de relatie tussen microbiologische waterkwaliteitsparameters en gezondheidsklachten: een haalbaarheidsonderzoek bij duursportwedstrijden. Rapport 289202001, RIVM. Bilthoven.
- Van Asperen, IA, Stijnen, C, Mank, T, De Boer, A, Groot, JF, Medema, GJ, Ten Ham, P, Sluiter, JF & Borgdorff, MW. 1996. An outbreak investigation of cryptosporidiosis in the Netherlands. Report 215700001. RIVM, Bilthoven.
- Van Asperen, IA, Medema, GJ, Havelaar, AH & Borgdorff, MW. 1997. Health effects of freshwater bathing among primary school children. Report 289202017. RIVM, Bilthoven.
- Van Asperen, IA, Medema, GJ, Borgdorff, MW, Sprenger, MJW & Havelaar, AH. 1998. Risk of gastroenteritis among triathletes in relation to faecal pollution of fresh waters. *Int. J. Epidemiology*, **98**: 309-315.
- Van Eerdt, MM. 1998. Mestproductie en mineralenuitscheiding 1997. Kwartaalberichten Milieu (CBS): **98/4**: 41-46.
- Van Olphen, M, Kapsenberg, JG, Van de Baan, E & Kroon, WA. 1984. Removal of enteric viruses from surface water at eight waterworks in The Netherlands, *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 927-932.
- Versteegh, JFM, Reinhold, WFE, Leenen, EJTM, Wetsteyn, FJ, Van Apeldoorn, ME, 1999. Waterleiding-besluit 2000. Voorstel voor implementatie van de EG-Drinkwaterrichtlijn; onderdeel kwaliteitseisen. Rapport 734301018. RIVM, Bilthoven.
- VROM, 1995. Infectierisico van virussen en parasitaire protozoa via drinkwater. Notitie ter voorbereiding van beleidsstandpunt. Concept 17 maart 1995. Directie DWL. VROM, Den Haag.

- Widmer, G. 1998. Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Parasitol.* **40**: 223-239.
- Willocks, L, Crampin, A, Milne, L, Seng, C, Susman, M, Gair, R, Mouldsdale, M, Shafi, S, Wall, R, Wiggins, R & Lightfoot, N. 1998. A large outbreak of cryptosporidiosis associated with a public water supply from a deep chalk borehole. *Commun. Dis. Public Health* **1**: 239-243.

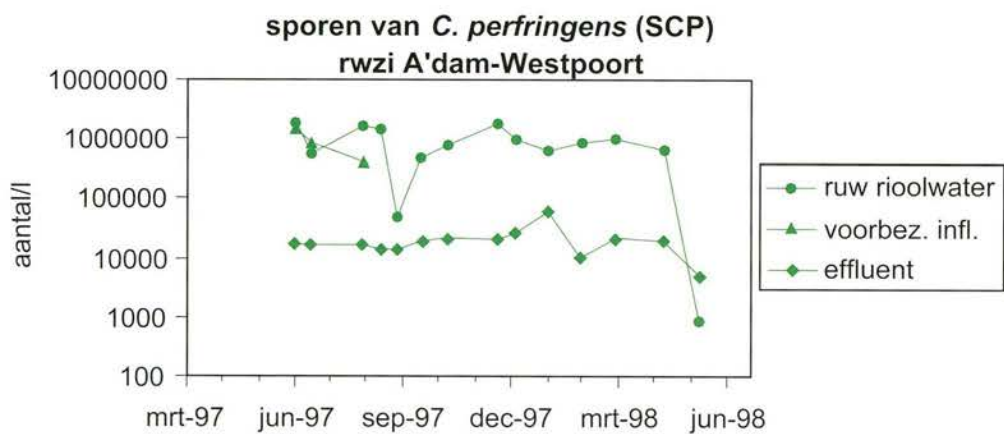
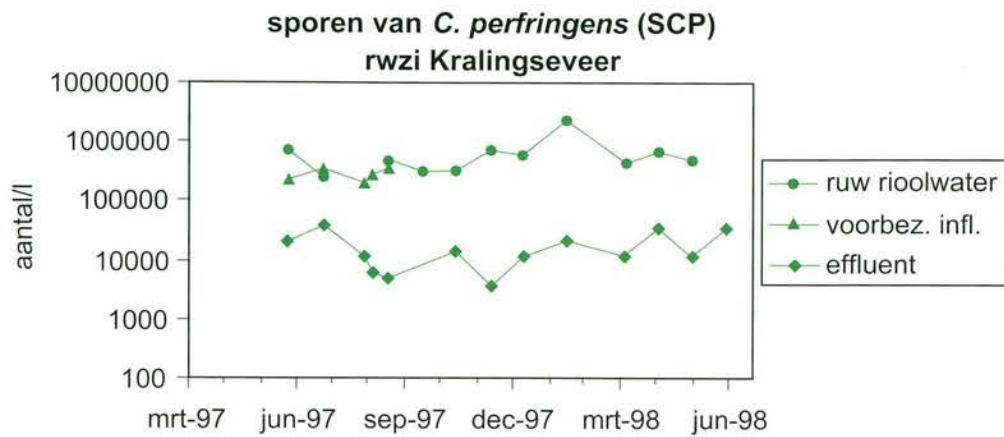
Bijlage 1 - Concentratieverloop overige parameters bij rwzi's in de tijd

- A** **Rwzi's Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)**
- B** **Locatie ruw rioolwater België**

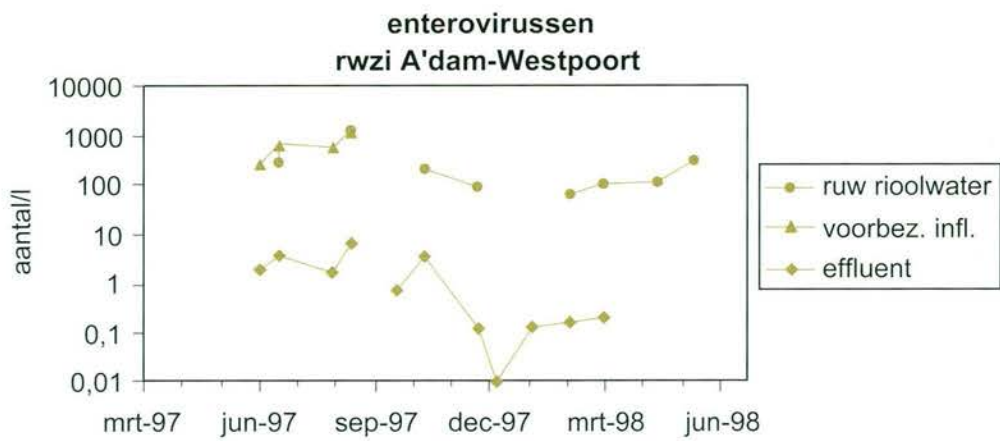
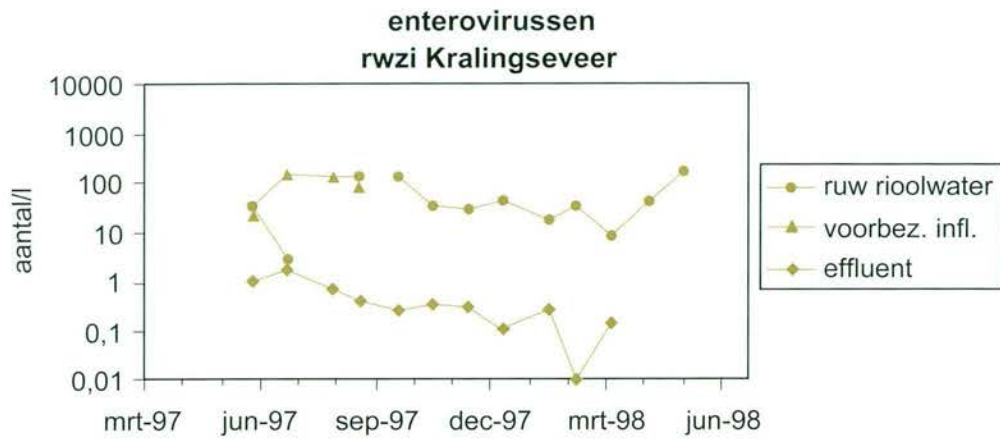
A - Rwzi's Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)



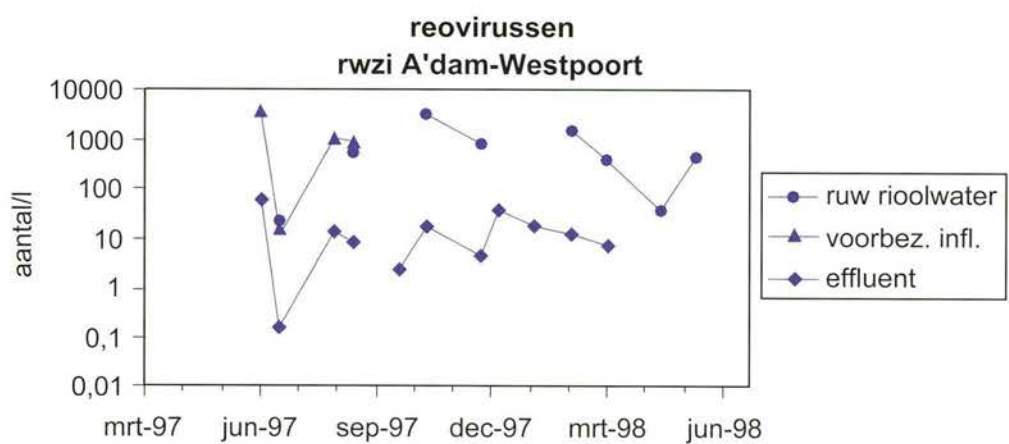
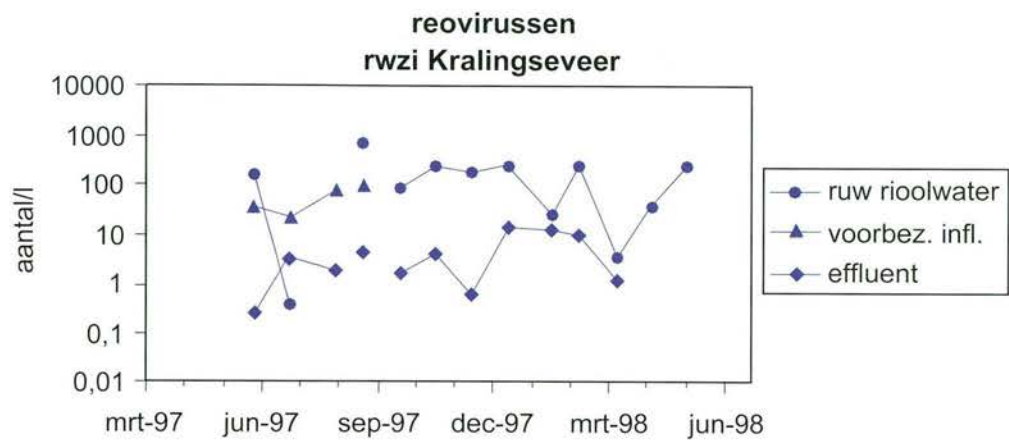
A - Rwzi's Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)



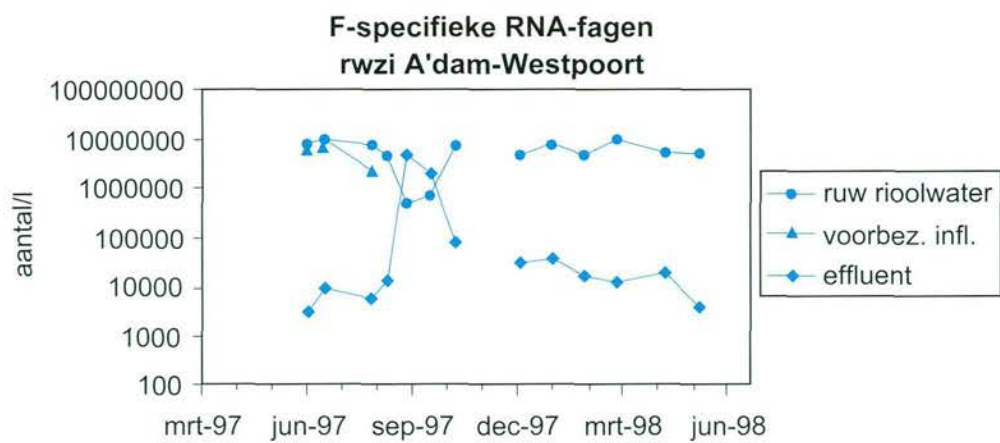
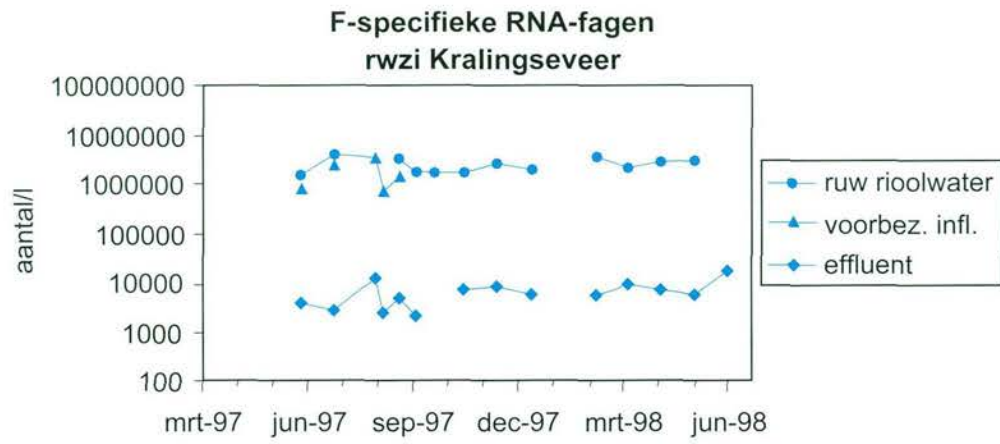
A - Rwzi's Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)



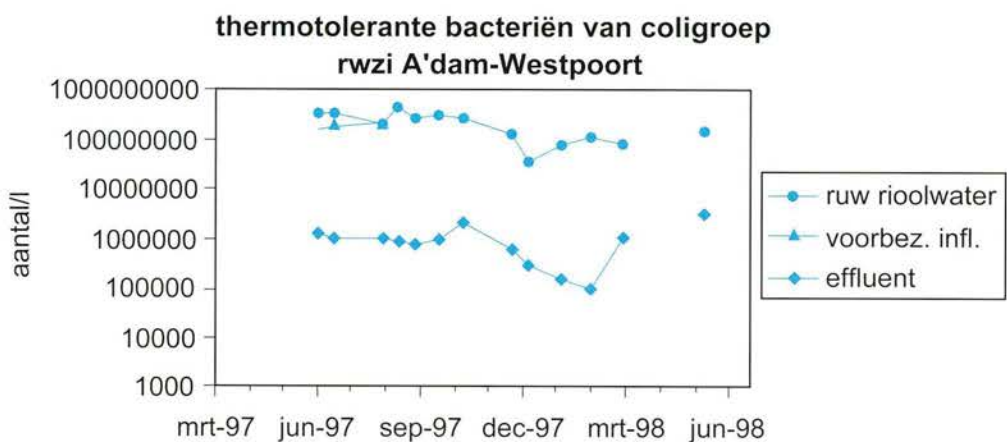
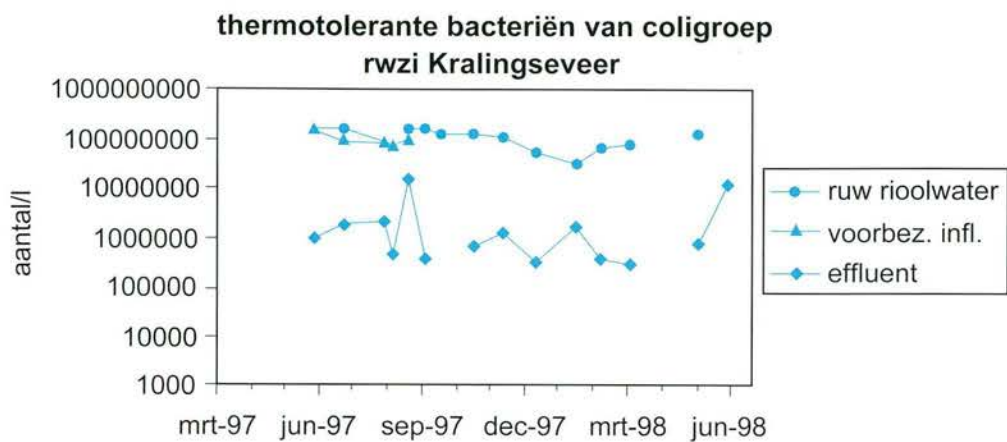
A - Rwzi's Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)



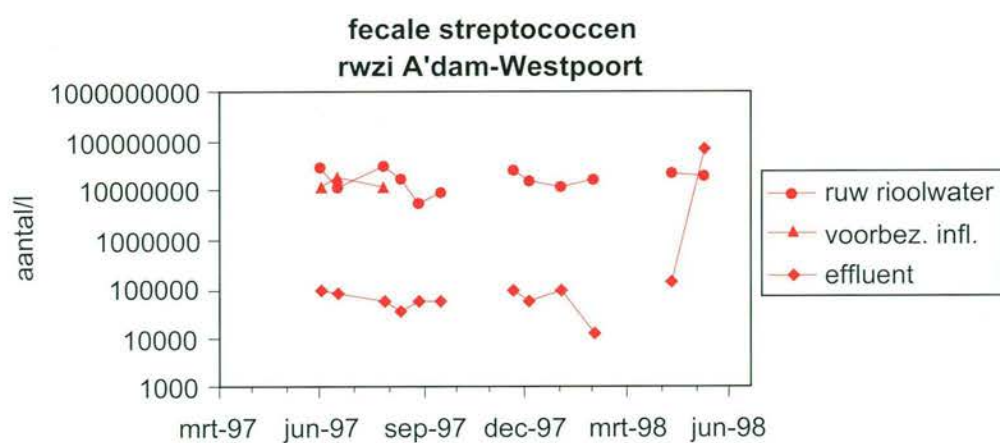
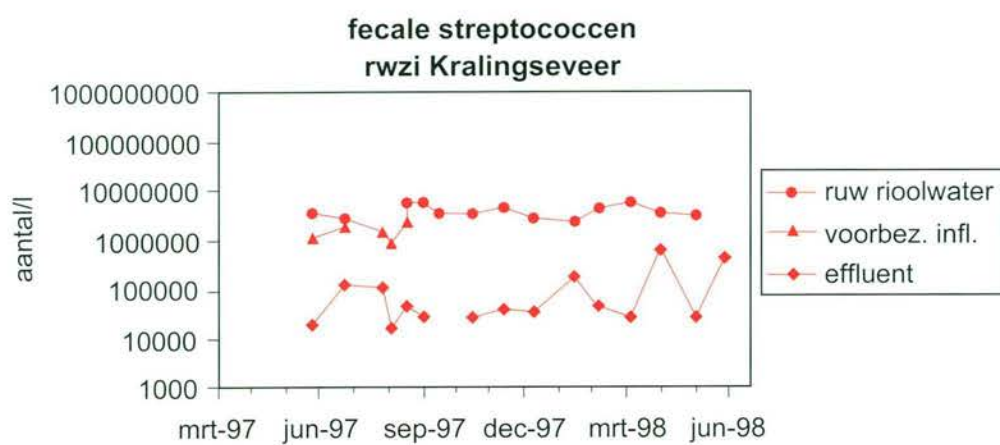
A - Rwzi's Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)



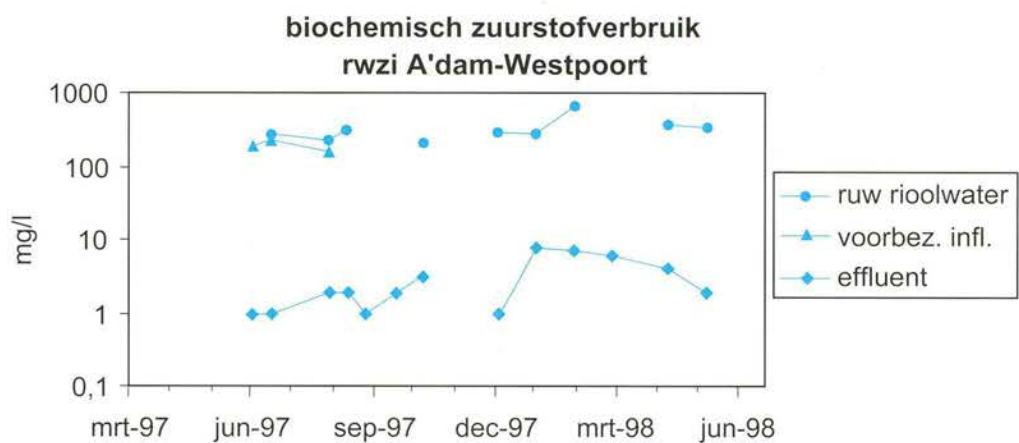
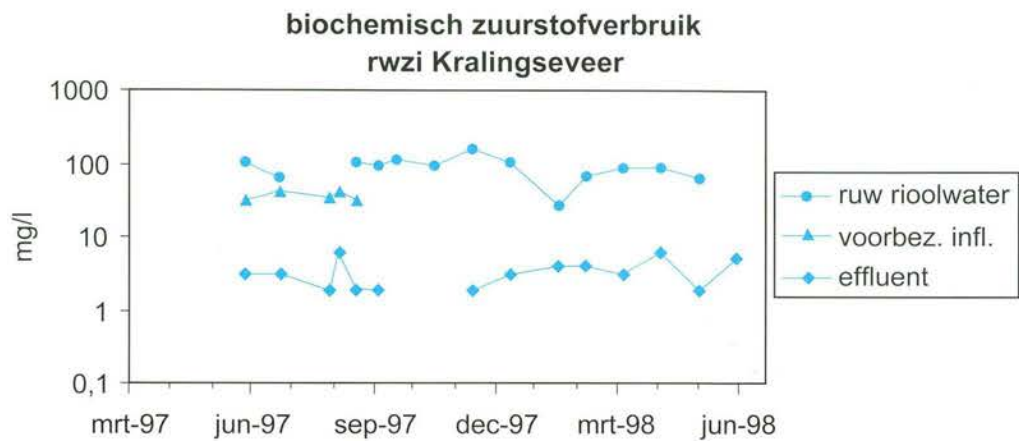
A - Rwzi's Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)



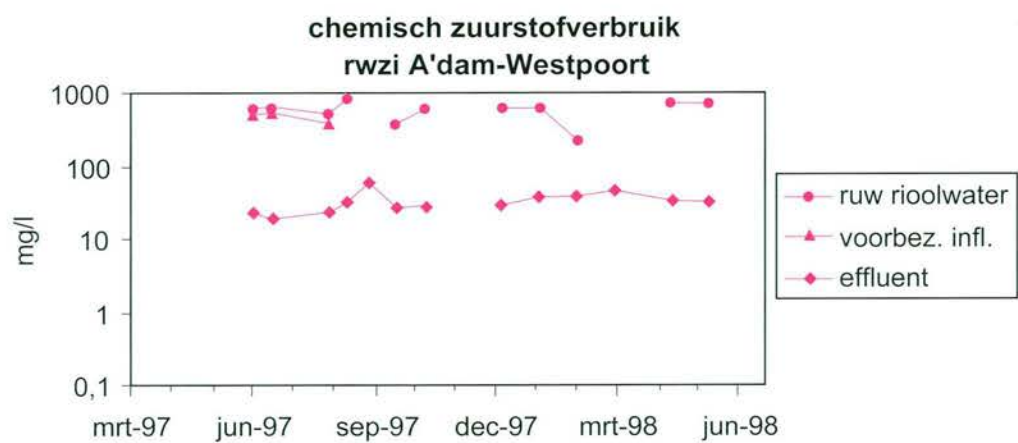
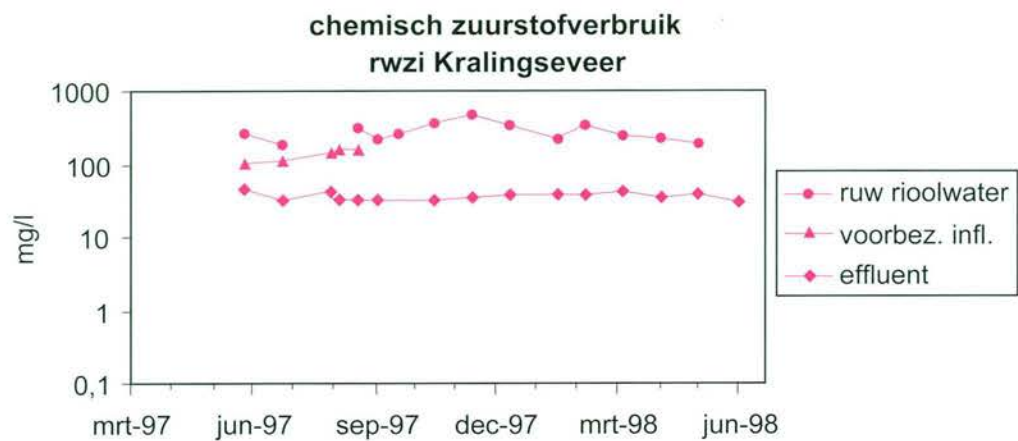
A - Rwzi's Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)



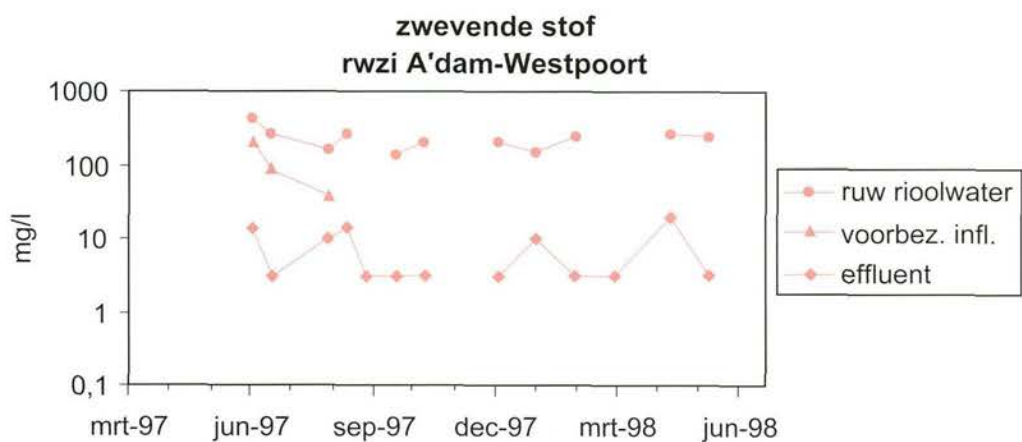
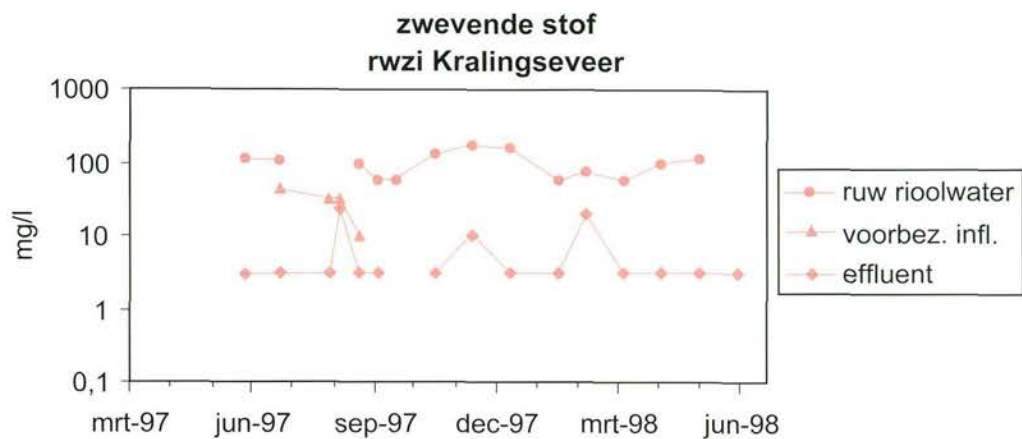
A - Rwzi's Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)



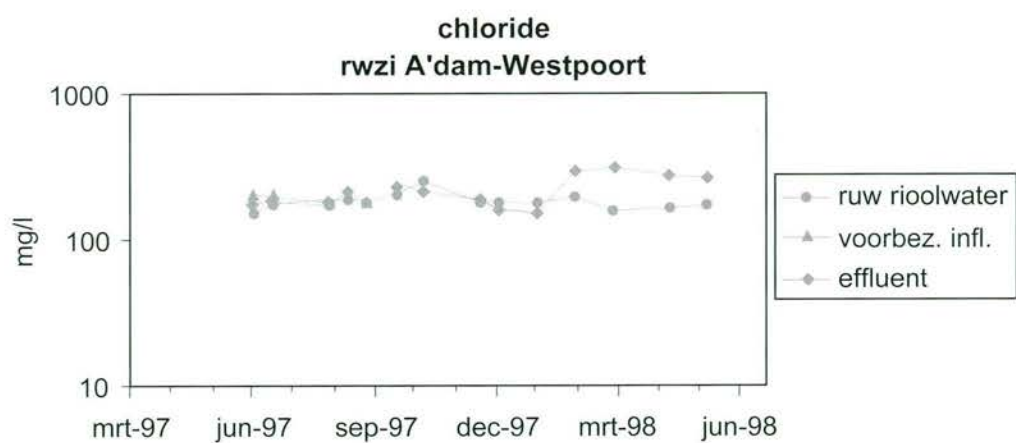
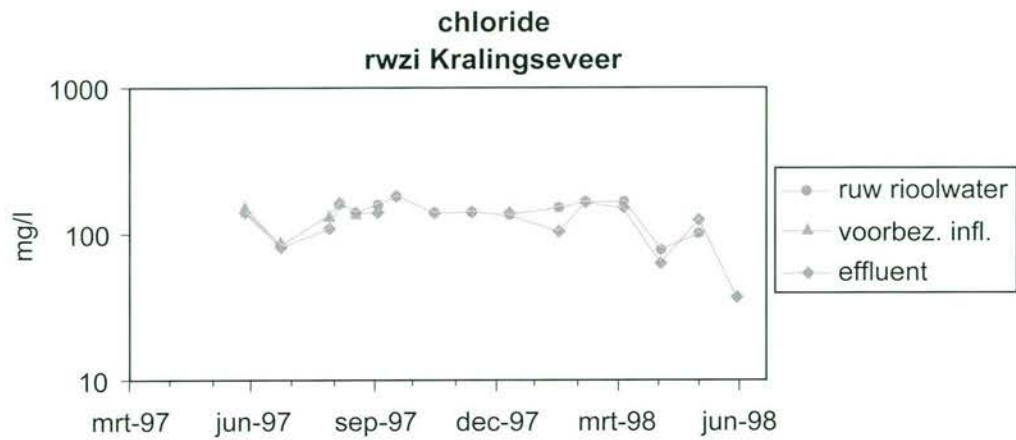
A - Rwwi's Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)



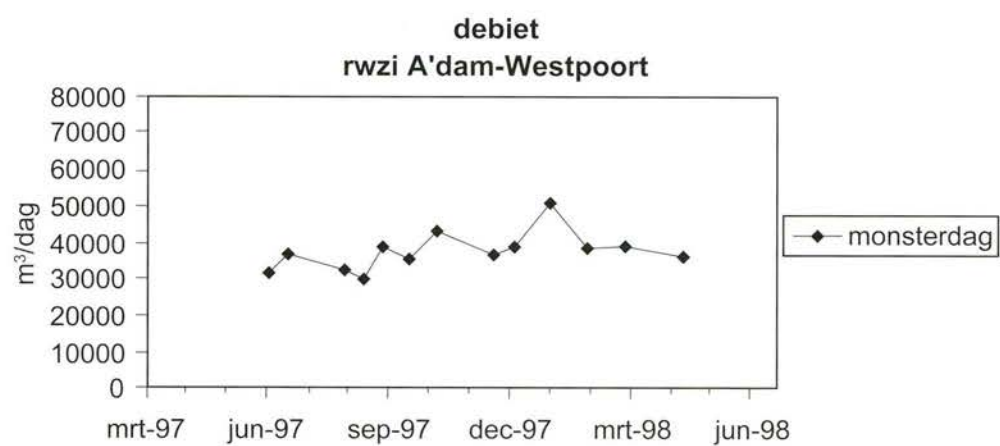
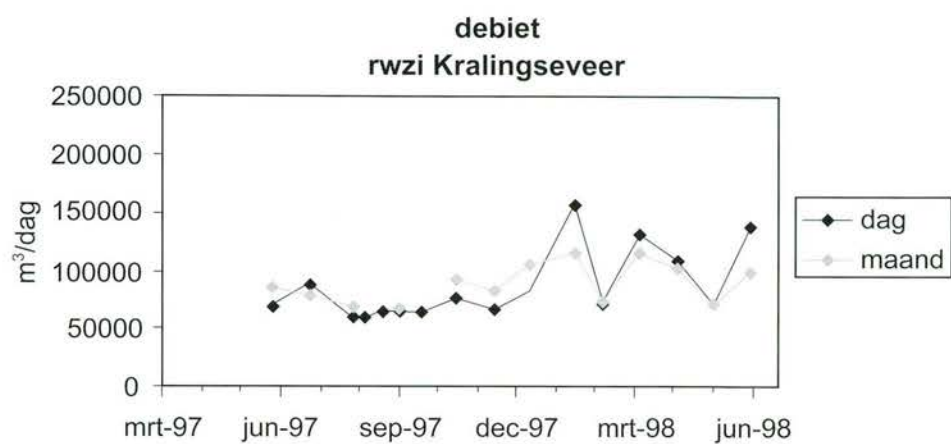
A - Rwzi's Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)



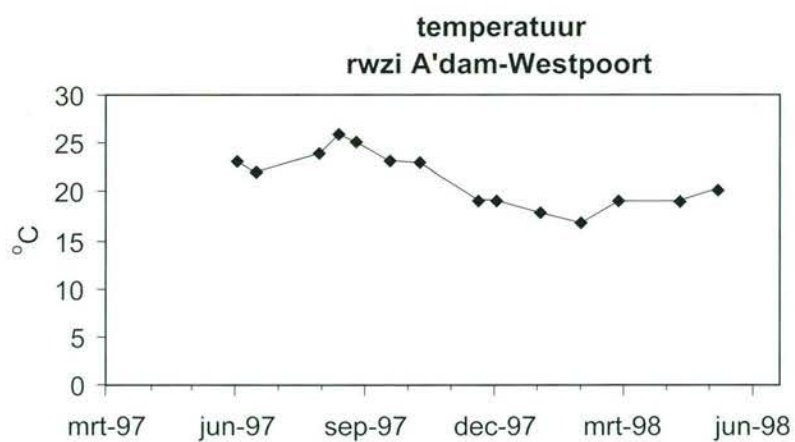
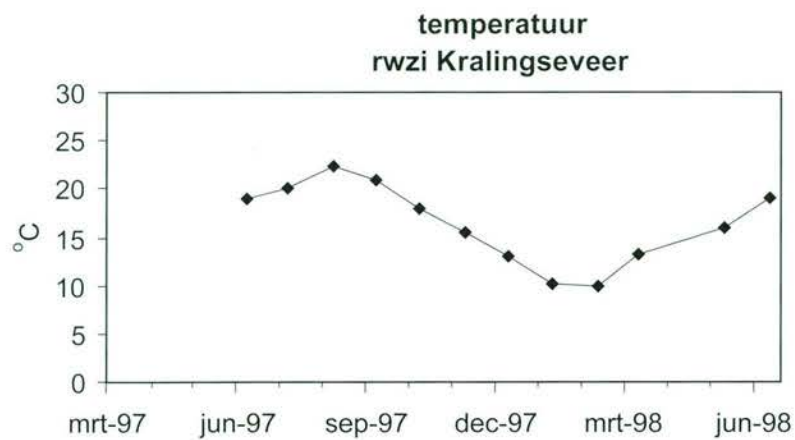
A - Rwwi's Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)



A - Rwzi's Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)

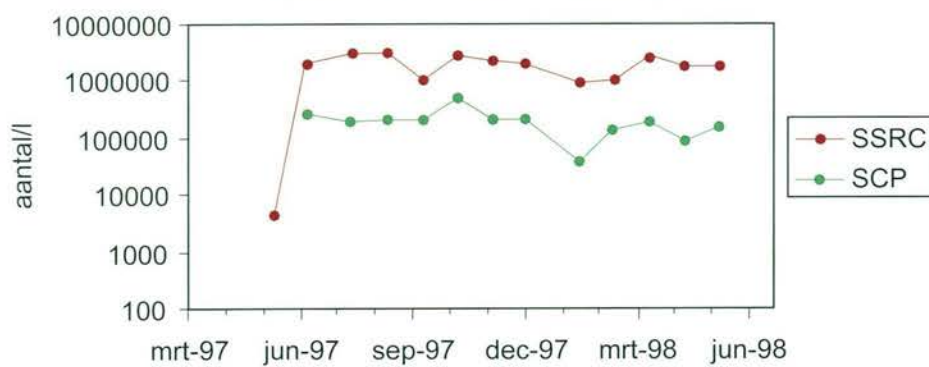


A - Rwzi's Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)

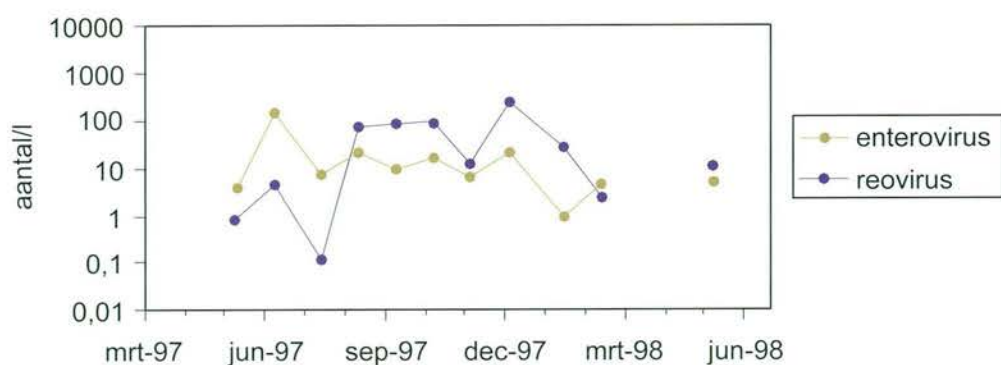


B - Locatie ruw rioolwater België

sporen van sulfietreducerende clostridia (SSRC) en
sporen van *C. perfringens* (SCP)

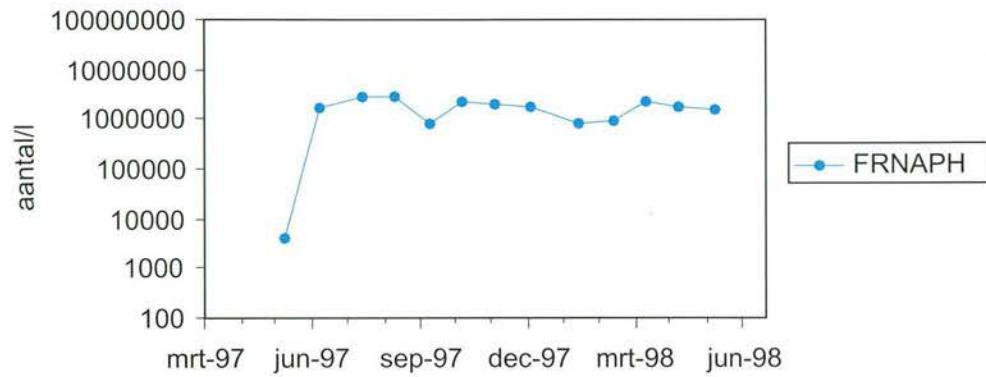


enterovirussen en reovirussen

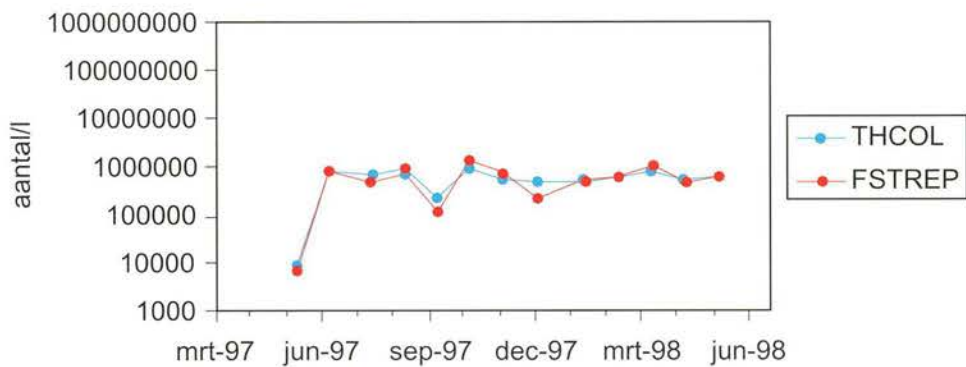


B - Locatie ruw rioolwater België

F-specifieke RNA-fagen (FRNAPH)

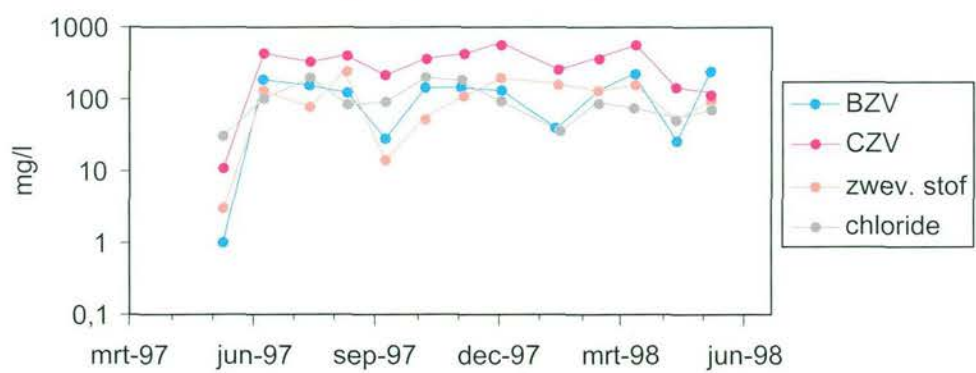


thermotolerante bacteriën van de coligroep (THCOL) en fecale streptococci (FSTREP)



B - Locatie ruw rioolwater België

biochemisch zuurstofverbruik (BZV), chemisch zuurstofverbruik (CZV),
zwevende stof en chloride

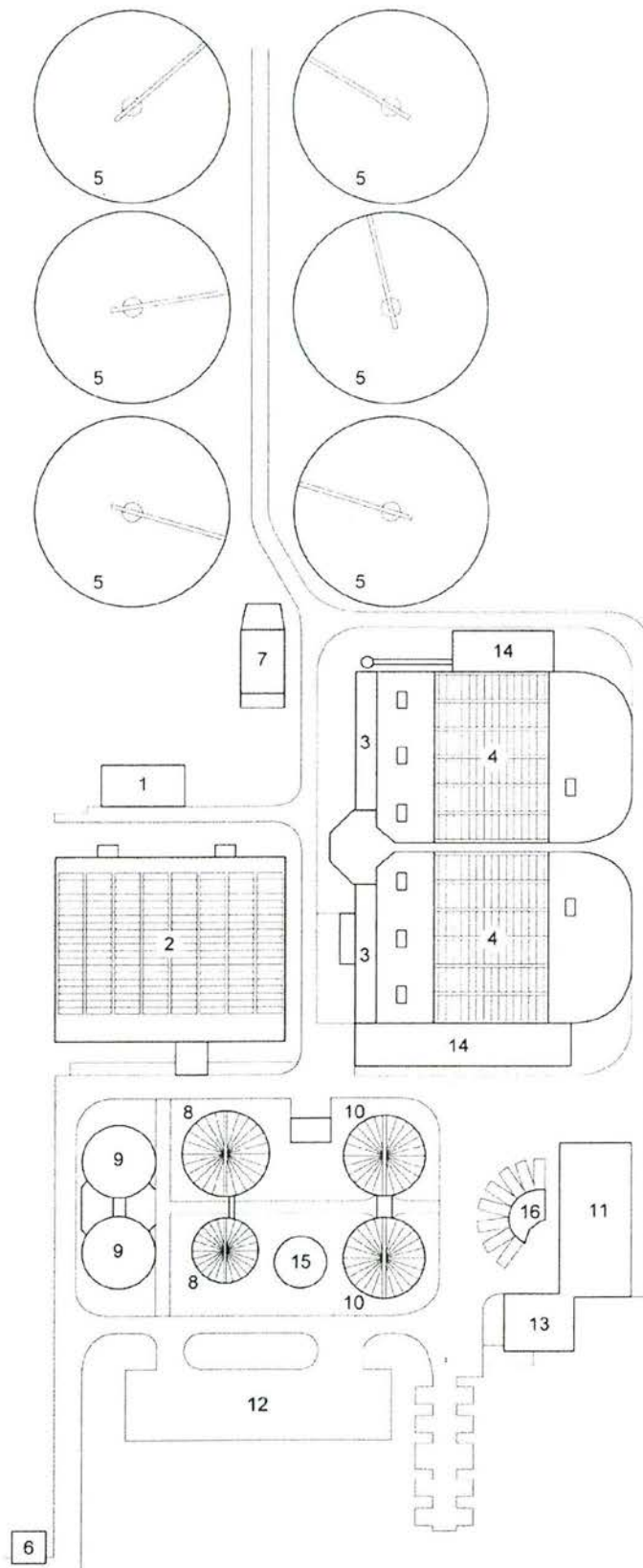


Bijlage 2 - Informatie rwzi's

Technische gegevens en zuiveringsefficiëntie van rwzi Kralingseveer en Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)

type	Kralingseveer (1997)			Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)		
	carrousel			aeratietaank		
capaciteit belasting						
ontwerp	301500	i.e.		390.000	i.e.	
werkelijk	97	%		80	%	
huishoudelijk aandeel	80	%		95	%	
gemiddelde aanvoer	80000	m ³ /dag		37000	m ³ /dag	
voorzinkstank						
aantal	4			1		
oppervlaktebelasting	4	m ³ /(m ² /uur)		2,5	m ³ /(m ² /uur)	
grootte	3200 m ² x 2,0 m			2000 m ² x 2,0 m		
contacttanks						
aantal	2			2		
inhoud	2 x 750	m ³		2 x 600	m ³	
verblijftijd	10	min		10	min	
beluchtingstanks						
aantal	2			2		
inhoud	2 x 13000	m ³		2 x 16000	m ³	
slibgehalte	3,6	kg ds/m ³		3,4	kg ds/m ³	
slibbelasting	0,058	kg BZV/(kg ds/d)		0,05	kg BZV/(kg ds/d)	
nabezinkingstanks						
aantal	2			4		
oppervlaktebelasting	0,97			0,89		
grootte	52,9 x 2 m			100 x 14 m		
kwaliteitsgegevens	influent	effluent	efficiëntie	influent	effluent	efficiëntie
BZV	120	4,3	96%	250	3,8	98%
CZV	340	41	88%	650	30	95%
NKj	37	3,7	90%	60	1,6	98%
NH ₄	24	1,7	93%			
NO ₃		10			13	
zwevende stof	180	6	97%		9	
chloride		132			188	

Schema rwzi Kralingseveer



WATER

- 1 aanvoer, grofvuilroosters zandvanger
- 2 voorbezinktank
- 3 contacttank
- 4 beluchtingstank
- 5 nabezinktank
- 6 effluent

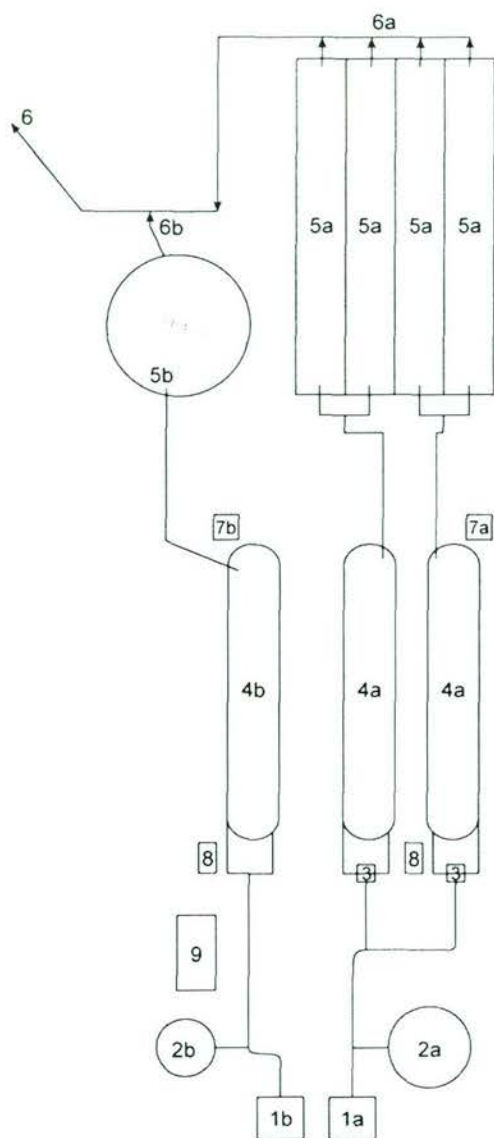
SLIB

- 7 retourslib
- 8 primair slibindikker
- 9 slibgisting
- 10 na-indikker
- 11 slibontwatering
- 12 slibopslagplaats

DIVERSEN

- 13 bedrijfsgebouw
- 14 luchtbehandeling
- 15 gashouder
- 16 slibopslagplaats

Schema rwzi Amsterdam Westpoort (huishoudelijk)



A STEDELIJK

B INDUSTRIEEL

WATER

- 1 aanvoer, grof vuilroosters
- 2a voorbezinktank
- 2b zandvanger
- 3 contacttank
- 4 beluchtingstank
- 5 nabezinktank
- 6 effluent

SLIB

- 7 retourslib
- 8 spuislib
- 9 slibafvoer

Colofon

Uitgever	Vereniging van Rivierwaterbedrijven - RIWA
In samenwerking met	Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling - RIZA Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu - RIVM Kiwa NV Onderzoek en Advies
Omslag en druk	B.V. Drukkerij De Eendracht, Schiedam
Omslagillustratie	Omslagfoto's Cryptosporidium oöcyste (foto: Reduker, D., Speer, C. & Blixt, J.) en Giardia trophozoiët (foto: Feely, D., Holbertson, D. & Erlandsen, S.)

RIWA Postbus 57212
 NL - 1040 BC Amsterdam
 Telefoon +31 (0)20 - 5840 666
 Fax +31 (0)20 - 688 1641

