

Campylobacter in afvalwater

Het effect van de zuiveringsprocessen op de hoeveelheid *Campylobacter* in afvalwater op een pluimveeslachterij en de ontvangende rioolwaterzuiveringsinstallatie.

Miriam Koene¹, Ewa Pacholewicz¹, Marleen van der Most¹, Conny van Solt¹, Jan Cornelissen¹, Remy Schilperoort², Hetty Blaak³, Heike Schmitt³.

1 Wageningen Bioveterinary Research, Lelystad

2 Partners4UrbanWater, Nijmegen

3 RIVM, Bilthoven

Dit onderzoek is uitgevoerd binnen de PPS 'Beheersing van *Campylobacter* in de pluimveesector' in het kader van Topsector Agri & Food (AF18112). Het betreft een publiek-private samenwerking, mede gefinancierd door de overheid (Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, projectnummer BO-63-001-026) en het pluimveebedrijfsleven. Binnen de PPS werken de kennisinstellingen Wageningen Bioveterinary Research, Wageningen Livestock Research en de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht samen met NEPLUVI, PLUIMNED, LTO-NOP en NVP aan de uitvoering van het onderzoek

Wageningen Bioveterinary Research
Lelystad, April 2024

Report 2401518

Miriam Koene¹, Ewa Pacholewicz¹, Marleen van der Most¹, Conny van Solt¹, Jan Cornelissen¹, Remy Schilperoort²,
Hetty Blaak³, Heike Schmitt³

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/644655> of op www.wur.nl/bioveterinary-research (onder Wageningen Bioveterinary Research publicaties).

© 2024 Wageningen Bioveterinary Research

Postbus 65, 8200 AB Lelystad, T 0320 23 82 38, E info.bvr@wur.nl, www.wur.nl/bioveterinary-research.

Wageningen Bioveterinary Research.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke wijze dan ook zonder voorafgaande toestemming van de uitgever of auteur.

Wageningen Bioveterinary Research Report

Samenvatting NL

Onderzoek is uitgevoerd naar de concentraties van *Campylobacter* in afvalwater afkomstig van een Nederlandse vleeskuikenslachterij en de effecten van de zuiveringsstappen uitgevoerd op de slachterij zelf, voordat het afvalwater werd geloosd op het gemeentelijke rioolstelsel. Vervolgens zijn ook monsters genomen bij de regionale rioolwaterzuiveringsinstallatie die het afvalwater van onder andere de pluimveeslachterij verwerkt. Zowel het inkomende (influent) als het gezuiverde water is bemonsterd, voordat het werd geloosd op het oppervlaktewater.

Het ruwe afvalwater van de pluimveeslachterij bleek gedurende de gehele onderzoeksperiode, van september 2022 tot en met januari 2023, zeer hoge concentraties *Campylobacter* te bevatten, met gemiddeld 6,6 log₁₀ *Campylobacter* per liter. Het zuiveringsproces van de slachterij bestaande uit coagulatie/flocculatie, gevolgd door een flotatiestap, gaf een beperkte reductie van de concentratie *Campylobacter* van ongeveer 0,7 log₁₀. Nadat het water werd geloosd op het openbare rioolstelsel vond een verdunning plaats door het samengaan met andere afvalwaterstromen. De verdunning op basis van de verpompte volumes van de slachterij en de rioolwaterzuiveringsinstallatie (rwzi) bleek redelijk overeen te komen met de aangetoonde concentraties van *Campylobacter* in het influent van de rwzi van gemiddeld 4,4 log₁₀ per liter. Vervolgens vond een sterke reductie plaats als gevolg van de zuiveringsprocessen van de rwzi met gemiddeld 2,6 log₁₀. Ondanks deze reductie werd ook in een groot deel van de bemonsterde volumes van het effluent van de rwzi nog *Campylobacter* gevonden, met concentraties die varieerden tussen <0,5 log₁₀ tot 2,5 log₁₀ per liter water.

In deze studie is het afvalwater niet alleen onderzocht op de aanwezigheid en hoeveelheid kweekbare *Campylobacter*, maar is er ook gekeken of er levende, maar niet meer kweekbare *Campylobacter* bacteriën in de watermonsters aanwezig waren, zogenoemde viable but non-culturable (VBNC) *Campylobacter*. VBNC *Campylobacters* zijn mogelijk nog steeds infectieus en kunnen een onderschatte bron zijn voor besmetting van mensen of dieren. Echter in geen van de onderzochte monsters zijn significante hoeveelheden VBNC *Campylobacter* gevonden, niet in het afvalwater van de slachterij, maar ook niet in dat van de rwzi. Mogelijk dat transitie naar deze niet-kweekbare vorm pas optreedt nadat *Campylobacter* terecht is gekomen in het oppervlaktewater, aangezien deze overgang enkele dagen tijd vergt.

De resultaten van deze studie laten zien dat tijdens de verschillende zuiveringsprocessen van afvalwater van een pluimveeslachterij de concentratie *Campylobacter* met meer dan 99,99% wordt gereduceerd. Hoewel de pluimveeslachterij slechts één van de mogelijke bronnen van *Campylobacter* in afvalwater was, is de relatieve bijdrage van andere bronnen en sectoren (zoals huishoudens, industrie) onbekend. Opgemerkt kan worden dat, ondanks de significante afname van *Campylobacter* tijdens de zuiveringsprocessen, *Campylobacter* nog steeds kan worden teruggevonden in het effluent van de rwzi, wat daarmee kan bijdragen aan besmetting van oppervlaktewater met *Campylobacter*. Een vertaling naar eventuele gevolgen voor de volksgezondheid is echter complex en op basis van dit onderzoek niet vast te stellen.

Summary UK

Research was conducted on the concentrations of *Campylobacter* in wastewater from a Dutch broiler slaughterhouse and the effects of the treatment steps performed at the slaughterhouse before the wastewater was discharged to the municipal sewer system. Subsequently, samples were collected at the regional sewage treatment plant (WWTP) that processes wastewater including that from the poultry slaughterhouse. Both incoming (influent) and treated water was sampled before it was discharged to surface water.

The raw wastewater from the poultry slaughterhouse was found to contain very high numbers of *Campylobacter* throughout the study period, from September 2022 through January 2023, with an average of 6.6 log₁₀ *Campylobacter* per Liter. The slaughterhouse purification process consisting of coagulation/flocculation followed by a flotation step gave a limited reduction in *Campylobacter* count of about 0.7 log₁₀.

Discharge of the water to the public sewer system accounts for a dilution due to mixing with other wastewater streams. The dilution based on the measured volumes from the slaughterhouse to the WWTP was found to fairly match the measured concentrations of *Campylobacter* in the influent of the WWTP averaging 4.4 log₁₀/Liter. Subsequently, a strong reduction occurred as a result of the WWTP's treatment processes by an average of 2.6 log₁₀. Despite this reduction, *Campylobacter* was also still found in much of the sampled volumes of WWTP effluent, with concentrations ranging from <0.5 log₁₀ to 2.5 log₁₀/Liter of water.

In addition to the amount of culturable *Campylobacter*, wastewater was also examined for the presence of viable but non-culturable (VBNC) *Campylobacter*. VBNC *Campylobacter* bacteria may still be infectious and potentially form an underrated source of infection for humans or animals. In this study however, no significant amounts of VBNC *Campylobacter* were found in any of the samples examined. It is plausible that the transformation to this non-culturable form occurs following *Campylobacter*'s exposure to surface water, as this process may require a few days to complete.

While the poultry slaughterhouse is just one of several possible sources of *Campylobacter* in sewage, the relative contributions from other sources and sectors are unknown. It can be noted that, despite significant reductions in *Campylobacter* counts during the treatment of poultry slaughterhouse wastewater, there is still a likelihood of this water contributing to surface water contamination. The implications for public health are complex and challenging to evaluate.

Inhoudsopgave

| | |
|--|-----------|
| Samenvatting NL | 3 |
| Summary UK | 4 |
| Inhoudsopgave | 6 |
| Inleiding | 7 |
| 1 Bemonsteringen | 8 |
| 1.1 Beschrijving van de slachterij | 8 |
| 1.2 Beschrijving van de afvalwaterstroom | 8 |
| 1.3 Monsternames | 9 |
| 1.3.1 Methode van bemonsteren | 9 |
| 1.3.2 Periode en tijd van bemonsteren | 9 |
| 1.3.3 Kwaliteitscriteria voor monsternames | 10 |
| 2 Laboratoriumonderzoek | 11 |
| 2.1 Monstervoorbereiding | 11 |
| 2.2 Kwantitatieve bepalingen <i>Campylobacter</i> | 11 |
| 2.2.1 Directe tellingen | 11 |
| 2.2.2 MPN-methode | 11 |
| 2.2.3 PMA-PCR | 12 |
| 2.2.4 Statistische analyses | 12 |
| 3 Resultaten | 13 |
| 3.1 Aantal monsters per locatie | 13 |
| 3.2 Resultaten <i>Campylobacter</i> in afvalwater op de pluimveeslachterij | 13 |
| 3.3 Resultaten <i>Campylobacter</i> in afvalwater bij de rwzi | 15 |
| 3.4 Verloop van <i>Campylobacter</i> concentraties op de verschillende meetlocaties gedurende het hele waterzuiveringsproces | 17 |
| 3.5 Resultaten PCR en PMA-PCR | 17 |
| 4 Discussie en conclusies | 19 |
| 4.1 Besmetting van het afvalwater van de pluimveeslachterij | 19 |
| 4.2 Zuivering van het afvalwater door de rwzi | 19 |
| 4.3 VBNC | 20 |
| 4.4 Seizoensinvloed | 21 |
| 4.5 Wat betekenen de resultaten voor de belasting van het oppervlaktewater? | 21 |
| Literatuur | 23 |
| 5 Bijlages | 26 |
| Bijlage 1 Procesbeschrijvingen zuiveringsinstallaties | 26 |
| Procesbeschrijving slachterij | 26 |
| Procesbeschrijving rwzi | 28 |

Inleiding

Campylobacter is een veel voorkomende voedselpathogeen, zowel in Nederland als in de rest van Europa, en pluimvee is daarbij een belangrijke bron. De European Food Safety Authority (EFSA) heeft geconcludeerd dat van de *Campylobacter* besmettingen bij de mens 20-30% veroorzaakt wordt door consumptie en/of (onhygiënische) bereiding van pluimveevlees, terwijl 50-80% van de besmettingen veroorzaakt wordt door stammen die uit pluimvee afkomstig zijn (Koutsoumanis et al. 2020). Dit betekent dat een deel van de *Campylobacter* besmettingen veroorzaakt door aan pluimvee-gerelateerde stammen via andere transmissieroutes dan pluimveevlees bij de mens terechtkomt. Een mogelijke besmettingsbron is oppervlaktewater, aangezien *Campylobacter* hierin goed kan overleven (Obiri-Danso, Paul, and Jones 2001; Thomas et al. 1999).

Eerder onderzoek heeft laten zien dat in Nederland de meeste *Campylobacter*-stammen in oppervlaktewater afkomstig zijn van wilde vogels en pluimvee. Pluimvee-gerelateerde *Campylobacter*-stammen werden vooral veel aangetroffen in oppervlaktewater in pluimveedichte gebieden, maar ook in de buurt van afvalwaterzuiveringsinstallaties (Mughini-Gras et al. 2016; Mulder et al. 2020).

Monitoringsgegevens van NEPLUVI geven weer dat in de zomer ongeveer de helft van alle bemonsterde vleeskuikenkoppels positief is voor *Campylobacter* (<https://www.nepluvi.nl/eindrapportage-monitoring-Campylobacter-2013-2022>). In een met *Campylobacter* besmet koppel vleeskuikens dragen vrijwel alle dieren *Campylobacter* in hun blinde darmen en wel in zeer grote hoeveelheden (gemiddeld zo'n 100 miljoen *Campylobacter* bacteriën per gram blinddarminhoud). Wanneer dergelijke koppels worden geslacht kan tijdens het slachtproces contaminatie van de karkassen en omgeving plaatsvinden, met name bij het uitnemen van de darmpakketten. Bij het slachtproces wordt veel water gebruikt (zo'n 6-7 liter per geslachte kip) en via deze route is het waarschijnlijk dat *Campylobacter* in het afvalwater van een pluimveeslachterij terechtkomt. Bekend is dat afvalwater van pluimveeslachterijen *Campylobacter* kan bevatten, echter de gegevens uit Nederland zijn beperkt tot onderzoeksresultaten daterend uit de jaren '90 van vorige eeuw (P. M.F.J. Koenraad et al. 1994).

Het afvalwater op pluimveeslachterijen ondergaat een aantal zuiveringsstappen voor het op het riool wordt geloosd. Dit heeft te maken met de heffing die een slachterij betaalt aan het waterschap voor o.a. organische belasting van de rwzi. Deze systemen zijn dus gericht op het verlagen van de organische belasting van het water en niet op de microbiële belasting. Hetzelfde geldt voor rioolwaterzuiveringssystemen. De (effluent)eisen waaraan een rwzi moet voldoen zijn gericht op nutriënten, zuurstofbindende stoffen en zwevende stof, maar het verlagen van microbiële belasting van het water is daar geen onderdeel van. Kennis over de effectiviteit van de diverse zuiveringsprocessen geeft meer inzicht in mogelijke verspreiding van *Campylobacter* vanuit pluimveeslachterijen naar oppervlaktewater. Met dit doel voor ogen is een onderzoek uitgevoerd naar de aanwezigheid en concentraties van *Campylobacter* in diverse waterstromen in de afvalwaterketen van een Nederlandse vleeskuikenslachterij. In een periode van ongeveer vijf maanden zijn op vier locaties bemonsteringen uitgevoerd, twee locaties op de slachterij zelf en twee locaties verderop in de afvalwaterketen.

In deze studie is het afvalwater niet alleen onderzocht op de aanwezigheid en hoeveelheid kweekbare *Campylobacter*, maar er is ook gekeken of er levende, maar niet meer kweekbare *Campylobacter* bacteriën in de watermonsters aanwezig waren. Diverse onderzoeken hebben namelijk aangetoond dat *C. jejuni* een zogenaemde viable but non-culturable (VBNC) vorm kan aannemen als reactie op voor de bacterie ongunstige omstandigheden, zoals koudstress of blootstelling aan zuurstof (Silva et al. 2011; Santos et al. 2023). VBNC *Campylobacters* zijn mogelijk nog steeds infectieus en kunnen een onderschatte bron zijn voor besmetting van mensen of dieren (Baffone et al. 2006; Rollins and Colwell 1986).

Een transitie naar VBNC zou een mogelijke bijdrage kunnen leveren bij de gevonden afnames in kweekbare *Campylobacters* tijdens waterzuiveringsprocessen. Dit kan ten onrechte de indruk geven dat de zuiveringsprocessen de microbiële belasting van het water verlagen.

1 Bemonsteringen

1.1 Beschrijving van de slachterij

Voor dit onderzoek is samengewerkt met een Nederlandse pluimveeslachterij die bereid was om verschillende automatische monsternamekasten te laten plaatsen voor continue bemonstering van het afvalwater. Tevens is er door de slachterij informatie verstrekt over het aantal dieren en koppels die zijn geslacht op de dagen dat het afvalwater werd bemonsterd.

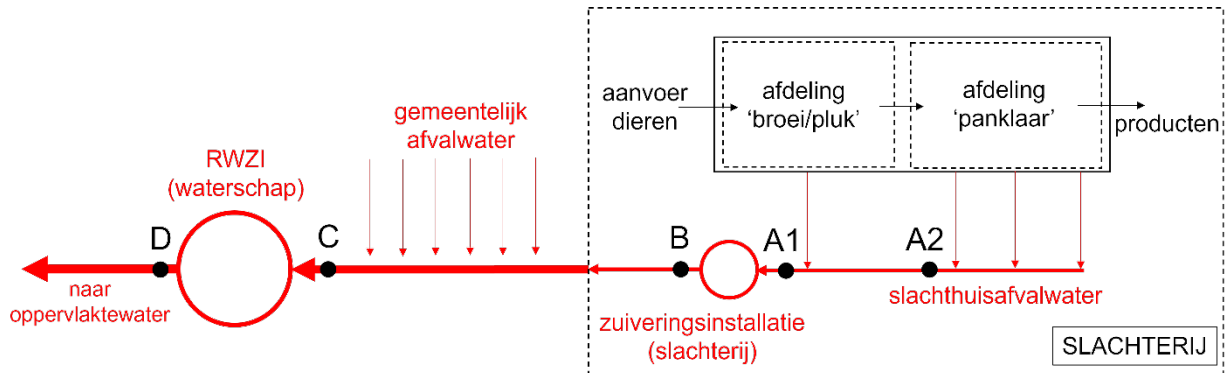
Tijdens de studieperiode werden er door deze slachterij gemiddeld 166.789 vleeskuikens per dag geslacht. Dit betroffen allemaal reguliere vleeskuikens, er werden geen concepten met trager groeiende kuikens geslacht. Op de dagen dat is bemonsterd werden gemiddeld 9 koppels geslacht (range 5-13), afkomstig van gemiddeld 5 bedrijven (range 2-10). Het zuiveringsproces van de slachterij bestaat uit coagulatie/flocculatie, gevolgd door een flotatiestap. Een uitgebreide beschrijving van het proces van afvalwaterverwerking op de slachterij is opgenomen in Bijlage 2.

1.2 Beschrijving van de afvalwaterstroom

De afvalwaterstroom is op vier locaties bemonsterd: twee locaties op de slachterij zelf (A en B) en twee locaties verderop in de afvalwaterketen (C en D), zie Figuur 1.

- Locatie A is representatief voor de (ongezuiverde) afvalwaterstroom vanuit de slachterij. Aanvankelijk werd bemonsterd bij locatie A1 waar al het afvalwater van de slachterij (ca. 1.000-1.300 m³/dag) de monsternamekast passeerde voordat deze waterstroom terecht kwam bij de zuiveringsinstallatie op het terrein. Kort na de eerste monsternames bleek uit kleurstofproeven dat locatie A1 ook humaan afvalwater (afkomstig van o.a. toiletten) bevatte. Om eventuele beïnvloeding van de resultaten door het humane afvalwater uit te sluiten is een tweede monsternamekast geplaatst op locatie A2. Op deze locatie passeerde alleen het afvalwater van de afdeling 'panklaar' de monsternamekast. De afdeling 'panklaar' volgt op de 'broei/pluk'-afdeling en is ingericht voor het verwerken van de geslachte kuikens tot vleesproducten. Per dag bedraagt de afvalwaterstroom afkomstig van de afdeling 'panklaar' ongeveer 400-500 m³. Deze stroom bevat géén humaan afvalwater. Na vier parallelle bemonsteringen op locatie A1 en A2 is de monstername op locatie A1 gestaakt.
- Locatie B bevindt zich vlak ná de zuiveringsinstallatie van de slachterij, juist voordat het afvalwater op het gemeentelijke rioolstelsel wordt geloosd. De zuiveringsinstallatie bestaat uit een flocculatie- en flotatiesysteem met twee buffertanks. Een dergelijk zuiveringssysteem vergemakkelijkt het verwijderen van (organisch) materiaal door het laten samenklonteren van deeltjes tot grotere vlokken (flocculatie) en het toevoegen van luchtbellen aan deze vlokken die vervolgens naar het wateroppervlak worden gebracht (flotatie) om te worden verwijderd.
- Locaties C en D zijn respectievelijk het influent en het effluent van de rioolwaterzuiveringsinstallatie (rwzi) waar het slachthuisafvalwater uiteindelijk terechtkomt na lozing op het gemeentelijk rioolstelsel. In dat rioolstelsel komt het afvalwater van de slachterij samen met ander huishoudelijk en industrieel afvalwater: het dag volume bij de rwzi bedraagt zo'n 20.000 m³ (bij DWA, droog weer afvoer) tot ruim 60.000 m³ (bij RWA, regenweer afvoer, een dag met veel neerslag). De betreffende rwzi werkt, zoals vrijwel alle rwzi's in Nederland, met een actiefslibinstallatie. Heel globaal omvat een dergelijke installatie een zandvangervetverwijderaar om zand en vet te verwijderen, een voorbezinktank om grof bezinkbaar organisch materiaal af te scheiden, waarna het water naar een beluchtingsbassin wordt gepompt. De hierin aanwezige micro-organismen (bacteriën, protozoa en radardieltjes) breken organische stoffen met behulp van zuurstof (en in anoxische tank met nitraat) af tot CO₂ en water (dissimilatie). Een deel van de organische stof wordt echter weer omgezet in biomassa (assimilatie).

oftewel slib, dat regelmatig als surplusslib uit het systeem dient te worden verwijderd. Het proces is dus in hoofdzaak gericht op de verwijdering van de organische fractie, nutriënten en zwevende stof uit afvalwater. Het effluent van de rwzi wordt geloosd op groot oppervlaktewater (een rivier).



Figuur 1 Schematisch overzicht van de pluimveeslachterij en de afvalwaterketen, met bemonsteringslocaties A tot en met D van de afvalwaterstroom.

1.3 Monsternames

1.3.1 Methode van bemonsteren

- Op **locatie A (A1 en/of A2)** zijn elke week twee 21-uurs verzamelmonsters genomen: de eerste van maandag 05h00 tot dinsdag 02h00 en de tweede van dinsdag 05h00 tot woensdag 02h00. Deze 21-uurs perioden zijn gekozen om zo goed mogelijk de gehele slacht- en schoonmaakcyclus van een gemiddelde dag te bemonsteren. De monsternames zijn **tijdproportioneel** uitgevoerd met behulp van een automatische monsternamekast (d.w.z. kleine deelmonsters verzameld per vaste tijdseenheid van 5 minuten). De (deel)monsters werden opgevangen en opgeslagen in een gekoeld vat (4°C).
- Van het effluent van de zuivering van de slachterij, **locatie B**, zijn ook wekelijks twee verzamelmonsters genomen: maandag 05h00 tot dinsdag 05h00 en dinsdag 05h00 tot woensdag 05h00. Het monsternameschema is afgestemd op de werking van de zuivering die, door de aanwezigheid van buffervaten, het afvalwater gelijkmatig verdeeld over de dag verwerkt. Met een automatische monsternamekast is **volumeproportioneel** bemonsterd (d.w.z. kleine deelmonsters verzameld per 6 m³ gepasseerd afvalwater) en zijn de monsters opgeslagen in een gekoeld vat (4°C).
- Voor de bemonstering van **locaties C en D** is gebruik gemaakt van de monsternames zoals die worden uitgevoerd door het Waterschap. Ook hier is **volumeproportioneel** bemonsterd van maandag 08h00 tot dinsdag 08h00 met behulp van automatische monsternamekasten.

Elke woensdagochtend werden de monsters gekoeld naar het laboratorium getransporteerd en dezelfde dag verwerkt voor analyse.

1.3.2 Periode en tijd van bemonsteren

Het slachtafvalwater is op **locatie A1** tussen 6 september en 9 november 2022 en op **locatie A2** tussen 17 oktober 2022 en 1 februari 2023 bemonsterd. Monstername vond plaats tweemaal per week met uitzondering van de kerstvakantie (26 december 2022 - 3 januari 2023).

Het effluent van de zuivering van de slachterij (**locatie B**) is bemonsterd tussen 12 september 2022 en 1 februari 2023 (wederom zonder kerstvakantie), in totaal 19 weken.

Voor de **locaties C en D** is in de periode tussen 5 september 2022 en 31 januari 2023 wekelijks bemonsterd van maandag 08h00 tot dinsdag 08h00 (kerstvakantie uitgezonderd), in totaal 20 weken.

1.3.3 Kwaliteitscriteria voor monsternames

De formele keuring op representativiteit van monsters gaat conform NEN6600-1. Die stelt dat een monster niet goed is bij een afwijking van meer dan 7,5% (verschil tussen (1) verwacht volume in het monstervat (= aantal pulsen ofwel monsternames maal het deelmonstervolume) en (2) het daadwerkelijk aangetroffen volume in het monstervat (via weging van het vat). Dit criterium wordt toegepast op monsternames bij alle Nederlandse rioolwaterzuiveringsinstallaties en is ook gehanteerd bij de verzamelmonsters afkomstig van locatie C en D.

Voor de verzamelmonsters afkomstig van de pluimveeslachterij, genomen op locatie A en B, zijn ruimere criteria voor de volumina gehanteerd, namelijk afkeur vanaf >15% afwijking ten opzichte van het verwachten volume. De reden voor het toestaan van een hoger afwijkingpercentage is dat het moeilijk te bemonsteren locaties zijn met veel grove delen in het water waardoor er regelmatig verstopping ontstaat, mogelijk droogvallende stromen en onbekende debieten. Specifieke details van de bemonsteringen zijn vastgelegd in een logboek, waarbij de monsters als volgt zijn gemerkt; <7,5% afwijking zijn weergegeven met een groene kleur, <15% met een oranje kleur en >15% met een rode kleur. Alleen die laatste categorie werd beschouwd als 'afgekeurd'.

Aanvullende criteria zijn de bewaar temperatuur in de monsternamekasten (<5°C) en de volumes van de deelmonsters. Beiden werden op het moment van het ophalen van een monster gecontroleerd. Indien van toepassingen werden afwijkingen en eventuele toelichting vastgelegd in het logboek.

2 Laboratoriumonderzoek

2.1 Monstervoorbereiding

De bemonsteringspotten bevatten 1 liter afvalwater waarvan na goed zwenken een deelmonster van 40 ml werd gefilterd door een 40 µM zeefje om een groot deel van de (grove) partikels kwijt te raken. Over het algemeen kon niet meer dan 40 ml worden gefilterd, omdat dan verstopping van het filter optrad. Uitzondering waren de effluentmonsters van de rwzi, aangezien deze monsters redelijk helder waren kon het gehele volume (1 liter) worden gefilterd.

Van alle monsters werd een 10-voudige verdunningsreeks gemaakt door 1 ml gefilterd materiaal toe te voegen aan 9 ml pepton fysiologisch zout oplossing (PFZ). Van de monsters van de slachterij werd van het influent (**locatie A**) een verdunningsreeks gemaakt van 10^{-1} tot en met 10^{-4} , van het effluent (**locatie B**) tot en met verdunning 10^{-3} . Van de monsters van de rwzi werden van zowel het influent (**locatie C**) als van het effluent (**locatie D**) verdunningen gemaakt van 10^{-1} en 10^{-2} .

Aangezien in de monsters van de rwzi lage aantallen *Campylobacter* verwacht werden, vond bij deze monsters een concentratiestap plaats om ook deze lage aantallen te kunnen aantonen. Deze concentratiestap werd uitgevoerd door middel van filtratie van het afvalwater door een nitrocellulose (NC) membraan met poriëgrootte van 0.65 µM. Van het influent werd een volume van 25 ml gefiltreerd (bij grotere volumes raakte het NC-membraan verstopt) en van het effluent werd 1 liter gebruikt. Vervolgens werd het op het NC-membraan geconcentreerde materiaal met gebufferd pepton water (BPW) verzameld; het op het NC-membraan geconcentreerde materiaal werd met 1 ml BPW van het membraan geschraapt en vervolgens werd het membraan nog gespoeld met 1 ml BPW. Dit monster werd vervolgens gesplitst voor de verschillende testen.

2.2 Kwantitatieve bepalingen *Campylobacter*

Er zijn drie kwantitatieve testen gebruikt voor het bepalen van de hoeveelheid *Campylobacter* in de monsters:

- tellingen door afenten van een verdunningsreeks op selectieve kweekplaten ('directe' tellingen)
- tellingen d.m.v. de most probable number (MPN) methode
- kwantitatieve bepaling op basis van moleculaire methodes, waarbij onderscheid gemaakt kan worden tussen levende en dode *Campylobacter* (PMA-PCR)

2.2.1 Directe tellingen

De concentraties *Campylobacter* werden bepaald door het maken van decimale verdunningen en daarvan 1 ml op mCCDA-platen met een doorsnede van 14 cm en/of 0,1 ml op mCCDA-platen met een doorsnede van 9 cm uit te spatelen, waarna de kweekplaten gedurende 48 uur microaeroob werden bebroed bij 41,5°C. Na incubatie werden de kolonies geteld conform ISO 10272:2017 (Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* - Part 2: colony-count technique). Van kweek-positieve monsters werden steeds vijf isolaten bevestigd met MALDI-TOF, waarbij tegelijk ook de species-identificatie werd uitgevoerd.

Wanneer er op geen van de platen van een monster *Campylobacter* was gegroeid, dan werden de resultaten weergegeven als minder dan 1 KVE *Campylobacter* per getest volume. Vervolgens werden alle resultaten omgezet naar log KVE per liter.

2.2.2 MPN-methode

Voor de MPN-methode werd gebruik gemaakt van Preston bouillon, dit is een selectief verrijkingsmedium waarin *Campylobacter* goed kan groeien en stoorflora zo veel mogelijk wordt geremd. De 10-voudige verdunningsreeksen, die ook werden gebruikt voor de directe tellingen, werden gebruikt als uitgangsmateriaal.

Van ieder monster werd afhankelijk van de monsternamelocatie een aantal verdunningen getest; voor de influent-monsters van de slachterij (locatie A) werd gestart met 1 ml vanuit de 10^{-2} verdunning in PFZ en deze werd verder doorverdund in 9 ml Preston bouillon tot een 10^{-6} verdunning.

De effluentmonsters van de slachterij (locatie B) werden op vergelijkbare manier doorverdund, waarbij vanwege de verwachte lagere concentraties *Campylobacter* werd gestart met 1 ml vanuit de 10^{-1} verdunning in PFZ en werd doorverdund tot een 10^{-5} verdunning in Preston. Voor de influent- en effluentmonsters van de rwzi (locatie C en D) werd 1 ml van het onverdunde monster toegevoegd aan 9 ml Preston. Van de geconcentreerde monsters (1 ml uit 25 ml influent en uit 1 liter effluent) werd 0,1 ml toegevoegd aan 9 ml Preston en vervolgens behandeld zoals beschreven bij de onverdunde monsters.

Alle MPN-bepalingen werden in triplo uitgevoerd. Nadat de ophopingsbuisen 24 uur microaerob bij 41.5°C waren bebroed, werd uit iedere buis met een $10\ \mu\text{l}$ entoog op een mCCDA-plaat afgeënt en 48 uur microaerob bij 41.5°C bebroed. De mCCDA-platen werden beoordeeld op aanwezigheid van verdachte kolonies. Wanneer per plaat tenminste 1 verdachte kolonie als *Campylobacter* werd geïdentificeerd m.b.v. MALDI-TOF werd de buis als positief beschouwd.

Op basis van de resultaten werd het aantal log KVE/ml berekend met behulp van het MPN calculation program version 6, dated 2018-11-07. (Jarvis, Wilrich, and Wilrich 2010). Alle resultaten zijn vervolgens weergegeven in log KVE/L.

2.2.3 PMA-PCR

Een deel van de monsters is ook onderzocht op de aanwezigheid van VBNC *Campylobacter*. Het betrof in totaal 27 monsters, afkomstig van 7 bemonsteringsdagen. De monsters hebben wel of niet een PMA-behandeling ondergaan volgens de procedure zoals beschreven door BfR (Stingl et al. 2021). In de laatste stap is vijf minuten bij $16.000\times$ gecentrifugeerd waarna de celpellet bij -20°C is bewaard tot aan moment van DNA-isolatie.

Van het uitgangsmateriaal van zowel de influent- als de effluentmonsters van de slachterij en rwzi werden twee deelmonsters van ieder 0,5 ml gepipetteerd in microcentrifuge buisjes; één voor de gewone PCR en één voor de PMA-PCR. Vanaf 29 november is naast het deelmonster van 1 ml uitgangsmateriaal ook een deelmonster van 0.1 ml uitgangsmateriaal van het influent en effluent van het slachthuis onderzocht d.m.v. de (PMA-)PCR. Dit is besloten op basis van de resultaten van de op dat moment reeds onderzochte monsters, waarbij bleek dat er in 1 ml uitgangsmateriaal (te) veel storend materiaal aanwezig was, wat een negatief effect had op de PCR-resultaten. Ook van de monsters uit de periode van 1 november tot en met 22 november is met terugwerkende kracht een tienvoudige verdunning onderzocht met de (PMA-)PCR. Aangezien van deze monsters het uitgangsmateriaal niet meer beschikbaar was, is een tienvoudige verdunning uitgevoerd op de geresuspendeerde celpellet wat gebruikt is voor DNA-isolatie. DNA isolatie is gedaan met behulp van de DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN), met een elutievolume van $150\ \mu\text{l}$. Hiervan werd $10\ \mu\text{l}$ eluaat getest in de PMA-PCR. Voor de berekeningen en kwaliteitscontroles is gebruik gemaakt van formulieren (in Excel format) opgesteld door BfR (Stingl et al. 2021).

2.2.4 Statistische analyses

Er zijn statistische analyses uitgevoerd. De *Campylobacter* concentraties in monsters verzameld op verschillende locaties op het slachthuis en de rioolwaterzuiveringsinstallatie en de resultaten van de verschillende methoden ('directe' kweek, MPN, PCR, PMA-PCR) zijn met elkaar vergeleken met behulp van lineaire regressie mixed effect modellen (lme4 pakket, (Bates et al. 2015). De modellen beschouwden de herkomst van een monster (influent, effluent) en de gebruikte testmethode als verklarende variabelen (vaste effecten), en de concentratie *Campylobacter* (kve per liter) in het monster als respons-variabele. Het model hield rekening met variatie in concentraties als gevolg van het verzamelen van monsters op verschillende dagen (random effect van bemonsteringsdatum). Verder zijn de gecensureerde monsters, d.w.z. onder (links gecensureerd) en boven (rechts gecensureerd) de aantoonbaarheidsgrens van de detectiemethode meegenomen in de gegevensanalyse. Hiervoor werd de concentratie van gecensureerde monsters geschat op basis van numerieke integratie via de Gauss-Hermite-regel zoals geïmplementeerd in lme4cens (Kuhn and Mackey, 2023. lme4cens: Simple Linear Mixed Effect Models and Censoring, [GitHub - lenz99/lme4cens: Simple Mixed Effect Models and Censoring](https://github.com/lenz99/lme4cens); [lenz99/lme4cens: v0.1.14 \(zenodo.org\)](https://zenodo.org/record/7011141)). De modellen werden 'gefit' in de statistische software R [R Core Team, 2022].

3 Resultaten

3.1 Aantal monsters per locatie

In de periode van 6 september 2022 tot en met 1 februari 2023 is op de slachterij tweemaal per week bemonsterd en op de met deze slachterij verbonden rwzi eenmaal per week. In totaal zijn er 124 watermonsters genomen, waarvan 23 (18,5%) watermonsters afkomstig van verschillende locaties werden afgekeurd, omdat ze niet voldeden aan de gestelde kwaliteitscriteria voor bemonstering (zie 2.3.3). Zo zijn er monsternames mislukt door operationele problemen met de monsternamekast, maar specifiek voor de influentmonsters op de slachterij was een reden voor het mislukken van de bemonstering verstopping van de apparatuur met slachtafval.

In Tabel 1 is een overzicht gegeven van het aantal genomen monsters dat is gebruikt voor de analyses. Een deel van de monsters is, behalve d.m.v. tellingen na kweek, ook onderzocht d.m.v. PCR en PMA-PCR om te kijken naar eventuele aanwezigheid van levende maar niet meer kweekbare *Campylobacter* (VBNC). Hiervoor zijn de monsters van zeven dagen gebruikt.

Tabel 1 Overzicht van het aantal valide monsters die zijn gebruikt in de analyse.

| Locatie | | Aantal genomen monsters | Aantal monsters analyse kweek | Aantal monsters analyse MPN | Aantal monsters analyse PMA-PCR |
|------------|---------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Slachterij | Influent (A1) | 18 | 11 | 10 | 0 |
| Slachterij | Influent (A2) | 30 | 20 | 13 | 6 |
| Slachterij | Effluent (B) | 38 | 26 | 17 | 7 |
| rwzi | Influent (C) | 19 | 14 | 14 | 7 |
| rwzi | Effluent (D) | 19 | 15 | 15 | 7 |
| Totaal | | 124 | 86 | 69 | 27 |

Monsters die voldoen aan criteria in M&M (2.2.3).

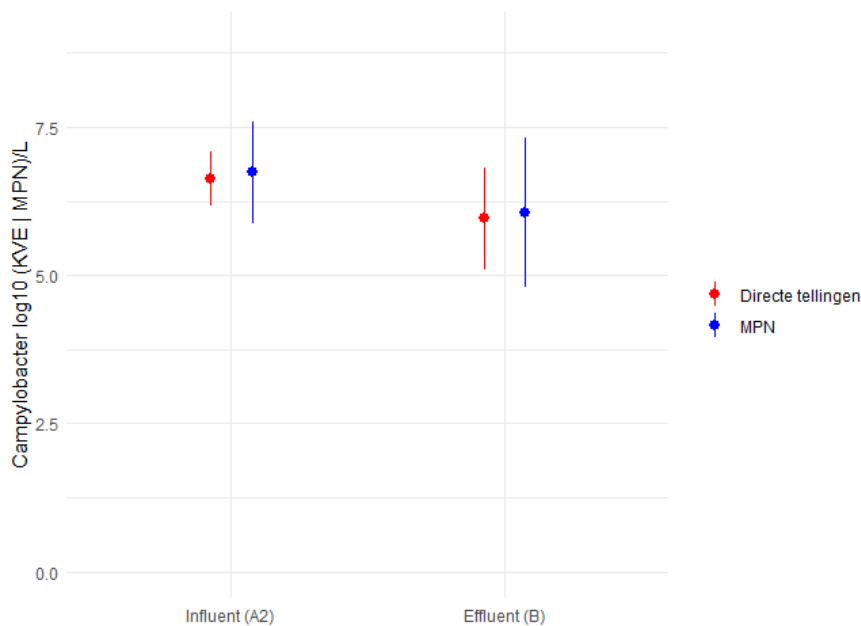
3.2 Resultaten *Campylobacter* in afvalwater op de pluimveeslachterij

De monsters van de slachterij zijn onderzocht op de concentratie van (kweekbare) *Campylobacter*. Voor bepaling van de concentratie *Campylobacter* in het afvalwater direct na het slachtproces (influent, locatie A) zijn aanvankelijk twee monsternamepunten gebruikt (A1 en A2). Omdat het afvalwater op locatie A1 ook het afvalwater van de toiletten bevatte, is gekeken naar een alternatieve locatie, zonder toevoeging van deze stroom. Op locatie A2 was deze afvalwaterstroom niet aanwezig. Ook afvalwater afkomstig van de afdeling broei/pluk werd hiermee omzeild, maar de inschatting was dat dit weinig invloed zou hebben op de *Campylobacter*concentraties. Enerzijds vanwege de hoge watertemperatuur in de broei-plukker waardoor eventueel aanwezige *Campylobacter* bacteriën op de huid en verenkleed worden afgedood, maar ook omdat de grootste risico's op contaminatie zijn gelegen tijdens het openen van de karkassen, verderop in het slachtproces. Om zeker te zijn dat de locaties vergelijkbare concentraties *Campylobacter*-bacteriën bevatten is een aantal weken dubbel bemonsterd. Statistische analyse bevestigde de aanname dat er geen significant verschil bestond tussen beide locaties wat betreft de hoeveelheid *Campylobacter* in de watermonsters ($p=0.81$). Voor de verdere analyses zijn de data van locatie A2 gebruikt, tenzij anders aangegeven.

Er zijn twee methodes gebruikt voor het bepalen van de hoeveelheid *Campylobacter* in de watermonsters, namelijk directe tellingen en de MPN-methode. De resultaten van beide methodes verschilden licht, maar dit verschil was niet significant ($p=0.62$).

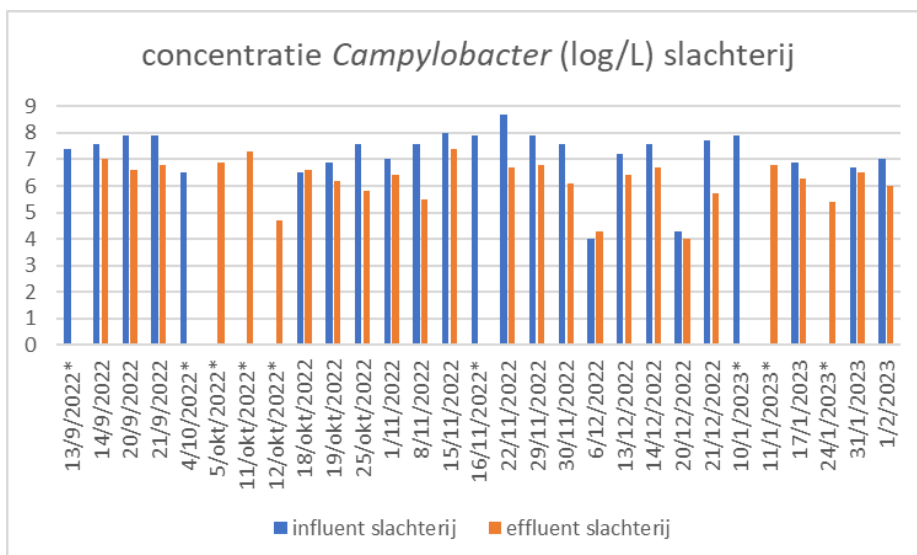
Figuur 2 laat de gevonden concentraties *Campylobacter* zien op de verschillende bemonsteringslocaties op de pluimveeslachterij. Op basis van directe tellingen bevatte het influent (locatie A2) gemiddeld 6,6 log₁₀ *Campylobacter* per liter water (met een betrouwbaarheidsinterval tussen 6,1 en 7,1 log₁₀). Na de zuivering

door de slachterij (locatie B) was de concentratie gemiddeld 6,0 log₁₀ per liter (met een betrouwbaarheidsinterval tussen 5,1 en 6,8 log₁₀). Gemiddeld werd een afname gevonden van 0,7 log₁₀ kweekbare *Campylobacter* voor en na het zuiveringsproces van de slachterij.



Figuur 2. Gemiddelde concentratie *Campylobacter* per liter afvalwater op een pluimveeslachterij vóór (influent, locatie A2) en na (effluent lokale zuivering, locatie B) zuivering door de slachterij en voordat het bedrijfsafvalwater werd geloosd op het riool.

Figuur 3 geeft per monsternamemoment de concentratie *Campylobacter* per liter afvalwater, zowel voor het procesafvalwater van de afdeling panklaar (A2) als voor het gezuiverde bedrijfsafvalwater (B) influent als voor het effluent van de slachterij. Op alle gemeten tijdstippen werden hoge concentraties *Campylobacter* aangetoond van meer dan 4 log₁₀ per liter, oplopend tot 8 log₁₀ per liter met een uitschieter van 8,7 log₁₀ per liter in het influent van 22 november 2022.



Figuur 3. Resultaten directe tellingen omgerekend naar aantallen *Campylobacter* per liter afvalwater voor individuele monsters van het influent slachterij (A1 en A2) en effluent slachterij (B). Er zijn twee keer per week monsters genomen, op maandag en dinsdag. *Slechts van één van beide monsternames van deze dag resultaat beschikbaar (met name voor het influent zijn een aantal monsternames mislukt of afgekeurd).

3.3 Resultaten *Campylobacter* in afvalwater bij de rwzi

Ook van de monsters genomen bij de rwzi zijn de concentraties *Campylobacter* bepaald door middel van directe kweek van verdunningen en door middel van de MPN-methode. De concentraties *Campylobacter* die werden vastgesteld met de MPN-methode waren gemiddeld 0.5 log₁₀ hoger in vergelijking met de directe tellingen, zie ook Figuur 4. Dit verschil tussen de twee methodes was statistisch significant ($p=0.017$). Dit verschil kan worden verklaard doordat de MPN-methode een lagere detectiegrens heeft en dat met name bij de rwzi monsters een aantal lage concentraties nog wel met de MPN-methode werden aangetoond, maar niet via directe kweek. Op basis van de MPN resultaten was de gemiddelde concentratie *Campylobacter* in het influent 4,4 log₁₀ per liter (met een betrouwbaarheidsinterval tussen 3,6 en 5,2 log₁₀).

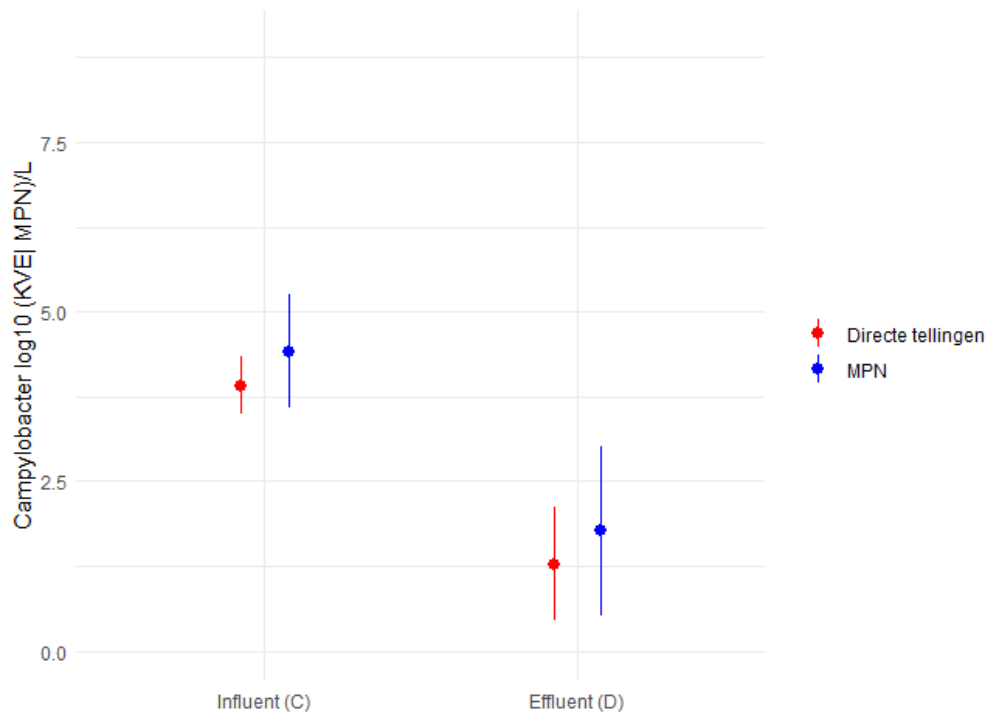
Vanaf het moment dat het afvalwater vanuit de pluimveeslachterij wordt geloosd op het riool, zorgen andere afvalwaterstromen voor een verdunning en daardoor tot een verlaging van de concentraties *Campylobacter* in het afvalwater afkomstig van de slachterij. Tabel 2 geeft een overzicht van de verpompte volumes op de bemonsterde dagen. Hieruit blijkt dat het verpompte volume van de slachterij vrij constant was; gemiddeld werd er op de bemonsterde dagen 1170 m³ afvalwater verwerkt en vervolgens geloosd op het riool, met een range van 992 - 1333 m³. Voor de rwzi varieerden de volumes tussen 16.568 en 65.520 m³, met een mediaan van 23.222 m³. Op twee momenten was een duidelijke piek in volume te zien, namelijk op 26 september 2022 en op 16 januari 2023 die te verklaren zijn door grote hoeveelheden neerslag (<https://www.knmi.nl/nederland-nu/klimatologie/maand-en-seizoensoverzichten/>).

Een grotere stroom afvalwater betekent ook een grotere verdunningsfactor van het aantal *Campylobacter* afkomstig van het afvalwater van de slachterij. Deze verdunningsfactor (Tabel 2) varieerde tussen de 13,5 (5 december 2022) en 51,9 (16 januari 2023), met een mediaan van 20,5. Met de aanname dat de rest van het rioolwater geen significante hoeveelheden *Campylobacter* bevat, levert dat een verwachte afname in concentratie van 1,3 log₁₀ *Campylobacter* op in het influent van de rwzi. Dit komt redelijk overeen met het gevonden verschil op basis van de metingen; het effluent van de slachterij bevatte gemiddeld 6,0 log₁₀ per liter *Campylobacter*, terwijl het influent van de rwzi een gemiddelde concentratie *Campylobacter* bevatte van 4,4 log₁₀ per liter, wat een verschil is van 1,6 log₁₀.

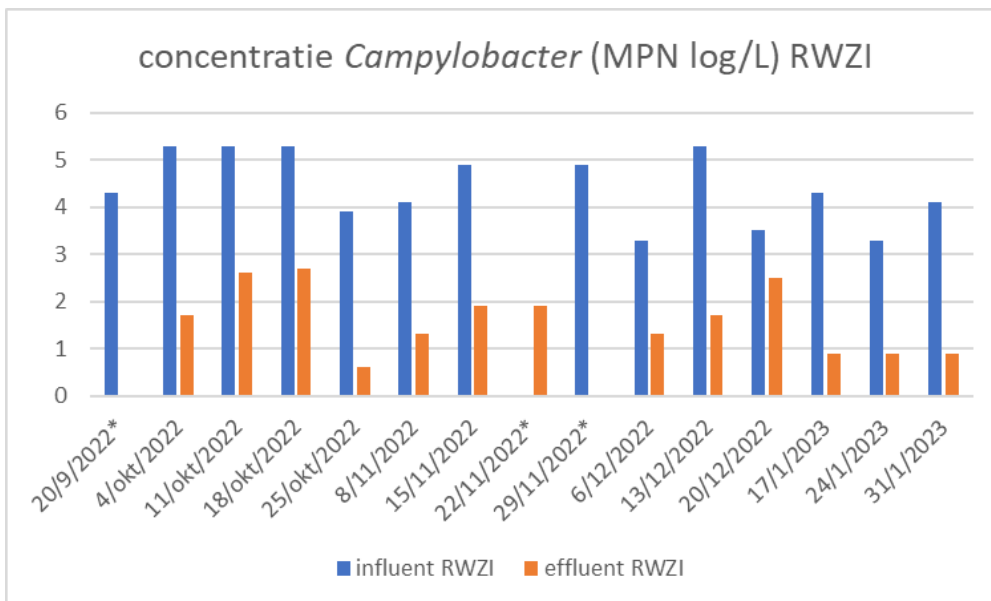
Tabel 2 Overzicht van de verpompte volumes afvalwater in m³ van de slachterij en de rwzi op de bemonsterde dagen, en de verdunningsfactor van het afvalwater van de pluimveeslachterij op basis van de verpompte volumes.

| Datum | Slachterij (m ³) | rwzi (m ³) | verdunning |
|--------|------------------------------|------------------------|------------|
| 13/sep | 1019 | 16586 | 16.3 |
| 20/sep | 1079 | 23243 | 21.5 |
| 27/sep | 1104 | 49075 | 44.5 |
| 4/okt | 1061 | 20097 | 18.9 |
| 11/okt | 1041 | 17264 | 16.6 |
| 18/okt | 1145 | 26104 | 22.8 |
| 25/okt | 1060 | 23222 | 21.9 |
| 8/nov | 1157 | 22979 | 19.9 |
| 15/nov | 1175 | 17654 | 15.0 |
| 22/nov | 1151 | 36020 | 31.3 |
| 29/nov | 1200 | 25905 | 21.6 |
| 6/dec | 1256 | 16996 | 13.5 |
| 13/dec | 1289 | 18567 | 14.4 |
| 20/dec | 1149 | 25625 | 22.3 |
| 10/jan | 1227 | 26027 | 21.2 |
| 17/jan | 1262 | 65520 | 51.9 |
| 24/jan | 1291 | 23840 | 18.5 |
| 31/jan | 1210 | 19449 | 16.1 |

De concentratie *Campylobacter* (MPN) was na de processtappen van de rwzi gedaald naar 1,8 log₁₀ per liter (met een betrouwbaarheidsinterval tussen 0,5 en 3,0 log₁₀) in het effluent, zie Figuur 4. Er was dus een significante afname te zien in *Campylobacter* van gemiddeld 2.6 log₁₀ per liter water na de zuiveringsprocessen van de rwzi.



Figuur 4. *Campylobacter* concentratie per liter afvalwater bij een rwzi, vóór (influent) en na (effluent) zuivering, gebaseerd op twee methodes; directe tellingen van decimale verdunningen (rood) en de MPN-methode (blauw).

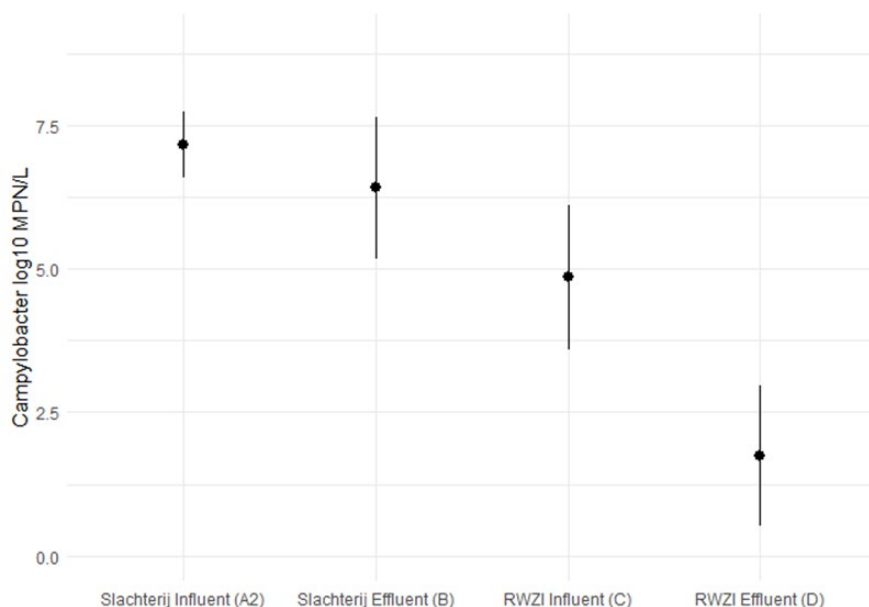


Figuur 5. Concentratie van *Campylobacter* in individuele monsters van het influent en effluent rwzi. Er is een keer per week, op maandag, een monster genomen. De testresultaten zijn vastgesteld d.m.v. de MPN-methode, uitgevoerd op geconcentreerd materiaal uit 25ml resp. 1liter. *Slechts van één van beide monsternames van deze dag resultaat beschikbaar.

Figuur 5 geeft per monsternamemoment de concentratie *Campylobacter* per liter afvalwater, zowel voor het influent als voor het effluent van de rwzi. Hieruit blijkt dat zowel de concentraties in het influent als de reductie van *Campylobacter* als gevolg van de rwzi processen een grote variatie laten zien.

3.4 Verloop van *Campylobacter*concentraties op de verschillende meetlocaties gedurende het hele waterzuiveringsproces

Figuur 6 laat het verloop zien van de gemiddelde concentraties *Campylobacter* op de vier locaties waar is gemeten. Voor de vergelijking zijn de MPN resultaten gebruikt van de monsters die op eenzelfde dag (de dinsdagen) zijn verzameld.

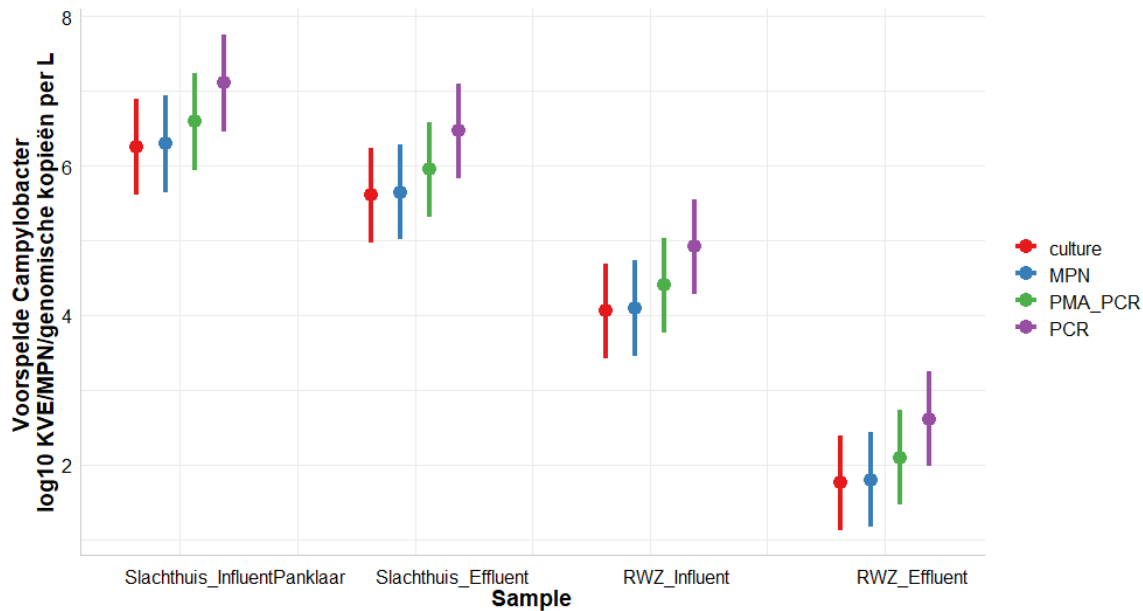


Figuur 6. Gemiddelde concentraties *Campylobacter* op de vier gemeten locaties. De concentraties zijn gebaseerd op monsters genomen op dinsdagen (zowel voor slachterij als rwzi) en bepaald d.m.v. de MPN-methode.

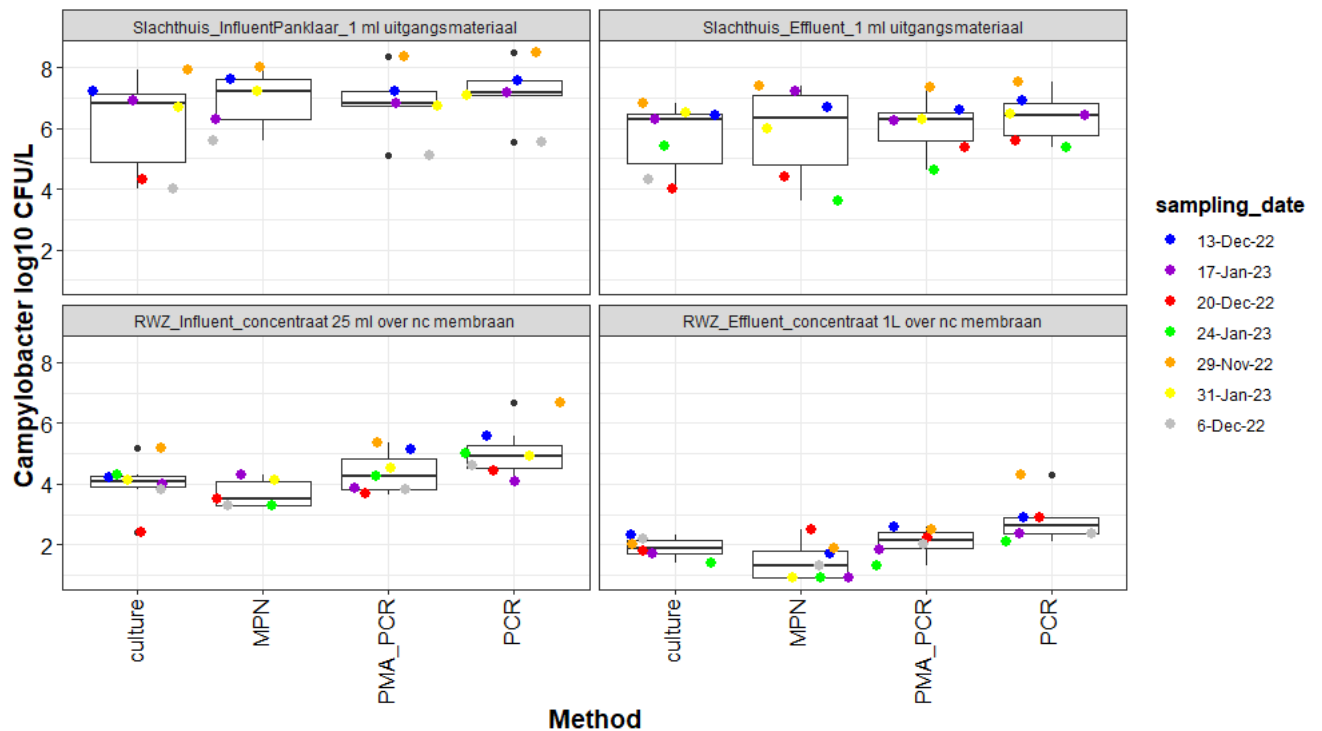
3.5 Resultaten PCR en PMA-PCR

Voor een deel van de bemonsteringen zijn aanvullend op de kweek ook testen uitgevoerd op aanwezigheid van levende, maar niet meer kweekbare *Campylobacter* (VBNC). Hiervoor werden twee PCR-testen uitgevoerd, een 'gewone' PCR en een PMA-PCR. Een 'gewone' PCR maakt geen onderscheid tussen het DNA van levende en dode bacteriën, maar door het gebruik van een speciale kleurstof, Propidium Monoazide (PMA) is dit wel mogelijk. Door de resultaten te vergelijken met die van de kweek, kan worden bepaald of sprake is van wel nog levende, maar niet-kweekbare bacteriën.

De resultaten van de vier methodes zijn weergegeven in Figuur 7 en Figuur 8. Gemiddeld toonde de PCR een 0,86 log₁₀ hogere concentratie *Campylobacter* aan ten opzichte van de kweek, wat kan worden verwacht, omdat met PCR zowel levende als dode cellen worden gedetecteerd, terwijl de kweek alleen kweekbare *Campylobacter* bacteriën kan aantonen. Gemiddeld werd ook een hogere concentratie *Campylobacter* waargenomen met de PMA-PCR (in vergelijking met kweek), echter het verschil van 0,34 log₁₀ ten opzichte van kweek was (net) niet statistisch significant (p=0,057). Dit resultaat kan wijzen op de aanwezigheid van levende, maar niet-kweekbare vormen (VBNC) in de monsters. Echter het aantal geteste monsters was beperkt, waardoor niet zeker is of dit een toevallig verschil betreft, of dat er daadwerkelijk sprake is van VBNC's.



Figuur 7. De gemiddelde waarden voor de concentratie *Campylobacter* op de vier locaties, vastgesteld met vier verschillende methodes; kweek en MPN-methode tonen de hoeveelheid kweekbare *Campylobacter* aan, PCR de totale hoeveelheid dode en levende *Campylobacter* en PMA-PCR de hoeveelheid levende *Campylobacter* (zowel kweekbaar als niet meer kweekbaar).



Figuur 8. Een overzicht van de concentratie *Campylobacter* in individuele watermonsters van vier locaties, weergegeven in boxplots. Concentraties zijn vastgesteld met vier verschillende methodes; kweek en MPN-methode tonen de concentraties kweekbare *Campylobacter* aan, PCR het totaal van dode en levende *Campylobacter* en PMA-PCR concentratie levende *Campylobacter* (zowel kweekbaar als niet meer kweekbaar).

4 Discussie en conclusies

Campylobacter jejuni en *C. coli*, wereldwijd de belangrijkste verwekkers van bacteriële voedselinfecties bij de mens, worden ook in oppervlaktewater gevonden. Het is herhaaldelijk aangetoond dat de concentratie van *Campylobacter* in oppervlaktewater is gecorreleerd met landbouwactiviteiten en effluent van waterzuiveringsinstallaties (Jones 2001; Bolton et al. 1987).

Eerder onderzoek in Nederland heeft laten zien dat wilde vogels en pluimvee de belangrijkste bijdrage leveren aan de besmetting van oppervlaktewater met *C. jejuni* en *C. coli*, gevolgd door herkauwers en varkens (Mulder et al. 2020; Mughini-Gras et al. 2016). De relatieve bijdragen van wilde vogels en pluimvee leken te variëren met het seizoen, het watertype (sloten, oppervlaktewater bij lozingspunten van afvalwaterzuiveringsinstallaties (rwzi's) en recreatiewater) en de omvang van de lokale pluimveeproductie. De resultaten wijzen op een aanzienlijke verspreiding van *Campylobacter* in het milieu vanuit pluimveebedrijven in pluimveerijke regio's. Behalve in gebieden met een hoge pluimveedichtheid werd ook in oppervlaktewateren in de buurt van lozingspunten van rwzi's een relatief hoge bijdrage gezien van stammen die gerelateerd zijn aan vleeskuikens.

4.1 Besmetting van het afvalwater van de pluimveeslachterij

Wanneer vleeskuikens zijn gekoloniseerd met *Campylobacter* zijn er zeer hoge aantallen *Campylobacter* aanwezig in de caeca, tot wel 100 miljoen *Campylobacter* per gram blinddarminhoud (data NEPLUVI). In slachthuizen is het vrijwel niet te voorkomen dat tijdens het slachtproces contaminatie van karkassen en omgeving met *Campylobacter* optreedt, zoals ook ander onderzoek liet zien dat werd uitgevoerd binnen het Topsectoren PPS project 'Beheersing van *Campylobacter* in de pluimveeketen' (Koene et al. 2019; van der Goot, Koene, and den Hartog 2019; Pacholewicz et al. 2019). Tijdens het slachtproces worden karkassen gespoeld met water, en daarmee kan dit water ook *Campylobacter* bevatten. Inderdaad laten de *Campylobacter* tellingen uitgevoerd in de huidige studie zien dat het influent (dus het water direct afkomstig van het slachtproces voordat het een zuiveringstap ondergaat) hoge concentraties bevatte tijdens vrijwel alle bemonsteringen die gedurende de studieperiode zijn uitgevoerd (Figuur 3), met gemiddeld over alle bemonsteringen een concentratie van 6,6 log₁₀ *Campylobacter* per liter water. Ondanks het feit dat de waterzuiveringen (zowel bij de slachterij als de rwzi) niet ontworpen zijn om bacteriën te verwijderen, resulteerde de zuivering door de slachterij in een reductie in de concentraties *Campylobacter*. Toch bleven de concentraties nog steeds hoog, met gemiddeld 6,0 log₁₀ per liter. Deze resultaten zijn vergelijkbaar met de concentratie *Campylobacter* van >5.1 log₁₀ MPN/100ml die Koenraad et al (Petra M.F.J. Koenraad et al. 1996) vond in het effluent van het slachthuis in een studie uitgevoerd in een vergelijkbare periode van het jaar (sept 1992- jan 1993). Dit laat zien dat vanuit pluimveeslachterijen een substantiële hoeveelheid *Campylobacter* in rioolwater terecht kan komen.

4.2 Zuivering van het afvalwater door de rwzi

De resultaten van het effluent van de pluimveeslachterij laten zien dat de afvalwaterstroom vanuit deze locatie aanzienlijke hoeveelheden *Campylobacter* bevat; gemiddeld over alle meetmomenten werd een volume van 1170 m³ met een concentratie van 6,2 log₁₀ *Campylobacter* per liter effluent gemeten, wat betekent dat een 'load' van ongeveer 1,8 biljoen (10¹²) *Campylobacter* per dag op het riool werd geloosd. Onbekend is wat de eventuele bijdrages zijn vanuit andere afvalwaterstromen, en of een deel van de *Campylobacter*-bacteriën tijdens de verblijftijd in het rioolwatersysteem afsterft. Om toch een indruk te krijgen over hoe de hoeveelheden *Campylobacter* in beide locaties (slachthuis en rwzi) zich tot elkaar verhouden, is berekend wat de verdunningsfactor is voor het afvalwater afkomstig van de slachterij ten opzichte van het totale volume afvalwater bij de rwzi. Hiervoor zijn de verpompte volumes van de slachterij vergeleken met de volumes van het influent van de rwzi. Op de bemonsterde dagen in deze studie varieerde de verdunningsfactor tussen de 13,5 (5 dec 2022) en 51,9 (16 januari 2023), met een mediaan van 20,5 (zie tabel 2 voor een overzicht van de verpompte volumes). Deze verdunningsfactoren kunnen de afname van de concentraties *Campylobacter* in

het influent van de rwzi (t.o.v. het effluent van de slachterij) vrijwel geheel verklaren, ook als gekeken wordt naar de individuele monsternames.

Echter, behalve het aantal *Campylobacter* wat via het effluent van de slachterij wordt geloosd op het rioolwatersysteem spelen ook andere processen een rol bij de *Campylobacter* belasting van het influent van de rwzi. Mogelijk dat een deel van de *Campylobacter* zal afsterven tijdens het transport naar de rwzi, maar andere afvalwaterstromen kunnen op hun beurt een bijdrage leveren aan de hoeveelheid *Campylobacter* in het rioolwater. Eerder Nederlands onderzoek heeft rwzi influent vergeleken van twee rwzi's die wel afvalwater van pluimveeslachterijen verwerken en één rwzi welke niet belast wordt door slachterijen (P. M.F.J. Koenraad et al. 1994). Deze laatste bevatte weliswaar iets lagere concentraties *Campylobacter* (2,3 log₁₀/100ml) in vergelijking met de twee andere rwzi's die wel afvalwater van pluimveeslachterijen verwerken (3,0 en 2,6 log₁₀/100ml), maar deze resultaten bevestigendat er meerdere bronnen zijn van *Campylobacter* in rioolwater dan enkel (pluimvee)slachterijen.

In vergelijking met de situatie op de pluimveeslachterij, waar een reductie van de concentratie kweekbare *Campylobacter* van 0,7 log₁₀ werd gevonden na het zuiveringsproces van het afvalwater, werd een grotere afname in de concentraties *Campylobacter* gevonden in de watermonsters van de rwzi, namelijk een verschil van 2,6 log₁₀ tussen het influent (4,4 log₁₀/L) en effluent (1,8 log₁₀/L). De bemonsterde rwzi beschikt over een actiefslibinstallatie en deze logreductie ligt in dezelfde orde van grootte als voor indicator bacteriën zoals coliformen en streptococci (Surampalli, Banerji, and Chen 1994). Hoewel het proces primair is gericht op de verwijdering van de organische fractie en nutriënten uit afvalwater, en niet op reductie van microbiële verontreiniging, is een voor de hand liggende verklaring voor de reductie van *Campylobacter* onder andere blootstelling aan zuurstof tijdens de zuivering. Andere factoren die invloed kunnen hebben zijn het wegvangen van *Campylobacter* door adsorptie aan actief slib, interactie en competitie met aanwezige microflora, of afdoden door antibacteriële componenten in afvalwater (Thomas et al. 1999).

De reductie die in deze studie is gevonden is groter dan die werd beschreven in een vergelijkbare Nederlandse studie die 20 jaar geleden werd uitgevoerd in een vergelijkbare periode van het jaar (sept 1992- jan 1993). Hierin werd een reductie beschreven van 1log₁₀ tijdens het waterzuiveringsproces op basis van actiefslibzuivering van de rwzi (P. M.F.J. Koenraad et al. 1994) waarbij zij in het effluent van een rwzi *Campylobacter* concentraties vonden variërend tussen 2,5 en 3,8 log₁₀ MPN/liter. Uit internationale literatuur is beschreven dat de mate van reductie van thermofiele *Campylobacter* in rioolwaterzuiveringsinstallaties voor een belangrijk deel afhangt van de processtap en het type waterzuivering. Van primaire zuivering (bezinking) is beschreven dat deze een beperkte reductie van *Campylobacter* gaf van <1 log (Arimi, Fricker, and Park 1988). Secundaire (biologische) zuivering verminderde de concentraties aanzienlijker, met reducties die meestal varieerden tussen grofweg 1,5 en 2,5 log, met enkele uitschieters tot 3,5 log (Stampi et al. 1992; 1993; Höller 1988; Arimi, Fricker, and Park 1988; Rechenburg and Kistemann 2009). Het grootste effect werd beschreven van tertiaire zuivering (verwijdering van nutriënten uit het afvalwater) of behandeling met 2 p.p.m. chloordioxide, waarbij in sommige gevallen geen *Campylobacter* meer kon worden teruggevonden (Stampi et al. 1999; Rechenburg and Kistemann 2009; Betaieb and Jones 1990). Daarbij moet worden aangetekend dat secundaire en tertiaire behandelingen over het algemeen verschillen in de leeftijd van het actief slib (slibleeftijd), in de hydraulische verblijftijd in de actief slibtanks. Een hogere hydraulische verblijftijd (tot ongeveer 20 uur bij laagbelaste rwzi's) zal een flink effect hebben op de verwijderingsrendementen. Bij secundaire zuivering kan echter ook sprake zijn van laagbelaste systemen. Dit verschilt per land. Het zou dan ook juist zijn om het type zuivering (ultra) laag, laag of hoogbelast als kader te nemen i.p.v. secundair of tertiair, echter dit wordt in de gerefereerde literatuur (gericht op *Campylobacter*) doorgaans niet vermeld.

4.3 VBNC

Het bestaan van viable but nonculturable *Campylobacter* werd voor het eerst beschreven door (Rollins and Colwell 1986). Het is een manier voor *Campylobacter* om gedurende langere periode buiten een gastheer te overleven, maar toch nog infectieus te blijven (Thomas et al. 1999; Stern et al. 1994). Het wordt steeds duidelijker dat VBNC's een rol kunnen spelen in de epidemiologie van *Campylobacter* (Reichelt et al. 2023; Santos et al. 2023; Silva et al. 2011; Knipper et al. 2023; Wulsten et al. 2022; Beterams et al. 2023; Wulsten, Galeev, and Stingl 2020).

Eén van de reservoirs voor *Campylobacter* is oppervlaktewater (Thomas et al. 1999). Er is geopperd dat het overgaan in de VBNC-vorm een mogelijke bijdrage kan leveren bij de gevonden afnames in kweekbare *Campylobacter* tijdens waterzuiveringsprocessen (Holler 1988; P. M.F.J. Koenraad et al. 1994)

In de huidige studie zijn geen significante hoeveelheden VBNC's gevonden. Onderzoek heeft laten zien dat onder experimentele omstandigheden pas na een aantal dagen de hoeveelheid kweekbare *C. jejuni* zichtbaar afnam om over te gaan in de VBNC vorm (Baffone et al. 2006; Santos et al. 2023). *Campylobacter* bacteriën in de afvalstroom van de slachterij zijn afkomstig uit het darmkanaal van vleeskuikens, wat de natuurlijke habitat vormt voor *Campylobacter*. Mogelijk dat gedurende het traject van afvalwater op de slachterij en rwzi onvoldoende prikkels worden ondervonden om over te gaan naar een eventuele VBNC-vorm, of dat deze overgang meer tijd vraagt. Het is niet uitgesloten dat dit plaatsvindt nadat het gezuiverde afvalwater wordt geloosd op het oppervlaktewater. In ieder geval geven de resultaten van dit onderzoek geen aanwijzingen dat de transitie naar VBNC *Campylobacter* een mogelijke bijdrage kan leveren bij de gevonden afnames in kweekbare *Campylobacter* tijdens waterzuiveringsprocessen.

4.4 Seizoensinvloed

Er bestaat een sterke seizoensinvloed op het voorkomen van *Campylobacter* bij vleeskuikens; in Nederland worden in de maanden mei tot en met september de meeste besmettingen gezien, met percentages tot 60% van de vleeskuikenkoppels, terwijl de percentages besmette koppels in de herfst en winter een stuk lager zijn (<https://www.nepluvi.nl/eindrapportage-monitoring-Campylobacter-2013-2022>). Hierdoor kan worden verwacht dat de besmettingsgraad van het afvalwater ook een dalende trend laat zien in de bemonsterde periode (sep 2022-jan 2023). Het was echter opvallend dat de concentraties *Campylobacter* in het afvalwater van de slachterij ook in de wintermaanden hoog bleven. Het is mogelijk dat in de winter van 2022 door de slachterij een hoger dan gebruikelijk aantal positieve koppels vleeskuikens werd geslacht. Er zijn in deze studie geen gegevens verzameld over de *Campylobacter*-status van individuele koppels die op de bemonsteringsdagen zijn geslacht. Echter uit de landelijke monitoringsgegevens, waarbij steekproefsgewijs koppels van alle Nederlandse pluimveeslachterijen worden getest, werden geen aanwijzingen gevonden voor een hoger dan gebruikelijk aantal positieve koppels in de bemonsterde periode (NEPLUVI monitoringsgegevens). Een andere mogelijkheid is dat er al een daling van het aantal positieve koppels had plaatsgevonden in de periode voorafgaand aan de bemonsteringen en dat de concentraties *Campylobacter* in het afvalwater van de slachterij in de zomerperiode nog hoger zijn.

Ook bij de rwzi was geen sprake van een significante afname van de concentraties *Campylobacter* gedurende de studieperiode. Dit is in lijn met sommige studies (Holler 1988), terwijl andere studies wel een duidelijke seizoensinvloed vonden van *Campylobacter* in een rwzi, met hogere concentraties in het voorjaar en zomer (Jones, Betaieb, and Telford 1990a; Stampi et al. 1992). Het is ook in lijn met eerder Nederlands onderzoek, waar ook geen hogere prevalentie te zien is in voorjaar en zomer vergeleken met herfst en winter bij rwzi effluentlozingspunten: 73% en 70% positieve monsters in voorjaar en zomer vergeleken met 77% en 83% in herfst en winter (Mulder et al. 2020). In dat onderzoek zijn weliswaar geen concentraties bepaald, maar is alleen gekeken naar prevalentie. Echter aangezien de gevonden concentraties in rwzi effluent rond de detectiegrens lagen, is aannemelijk dat beide parameters wel gecorreleerd zijn.

In tegenstelling tot de prevalentie van *Campylobacter* bij pluimvee, waarbij de meeste besmettingen worden gezien in de zomerperiode, is in oppervlaktewater juist een omgekeerde trend waarneembaar (Obiri-Danso and Jones 1999a; Thomas, Hill, and Mabey 1999; Thomas et al. 1999). Dit heeft waarschijnlijk te maken met de hogere UV-straling in combinatie met hogere omgevingstemperaturen, waarvan is aangetoond dat dit leidt tot meer afsterving van *Campylobacter* (Thomas, Hill, and Mabey 1999; Thomas et al. 1999). Dit verklaart waarom in meerdere studies een hogere prevalentie van *Campylobacter* in oppervlaktewater werd gevonden in de koudere maanden, met minder zonlicht (Mulder et al. 2020).

4.5 Wat betekenen de resultaten voor de belasting van het oppervlaktewater?

Ondanks dat er een significante reductie werd gevonden van de concentraties *Campylobacter* in afvalwater gedurende het hele proces van slachthuis tot effluentlozing door de rwzi van meer dan 5 log₁₀, was in het effluent van de rwzi nog steeds een hoeveelheid *Campylobacter* aanwezig, die varieerde van minder dan 0,5 log₁₀ tot 2,5 log₁₀ per liter. De resultaten van deze studie zijn in lijn met internationale studies, waarbij tijdens

de zuiveringsprocessen van de rwzi weliswaar een reductie van *Campylobacter* wordt beschreven, maar er nog steeds levende *Campylobacters* kunnen worden geloosd op het oppervlaktewater. Daarbij moet worden gezegd dat er meer routes van (ongezuiverd) afvalwater naar oppervlaktewater zijn. Tijdens grote buien is het riool 'vol' en loost deze ruw afvalwater (factor 1-2log10 verdund met regenwater) direct op oppervlaktewater, zonder tussenkomst van een rwzi. Dat is veelal ander, kleiner oppervlaktewater dan waar de rwzi op loost. Minder relevant in deze context is dat ook via foutaansluitingen ongezuiverd afvalwater in oppervlaktewater terecht komt.

De betekenis voor de volksgezondheid van *Campylobacter* in oppervlaktewater en de bijdrage van afvalwater daaraan is moeilijk in te schatten. Mogelijke routes waardoor mensen via oppervlaktewater kunnen worden blootgesteld aan *Campylobacter* zijn recreatieve activiteiten of via irrigatie van gewassen. Ook kan indirect transmissie plaatsvinden doordat dieren *Campylobacter* vanuit oppervlaktewater opnemen en deze, na kolonisatie van hun darmstelsel, weer (mogelijk gedurende langere periode) uitscheiden.

Gesteld kan worden dat het effluent van de onderzochte rwzi kan bijdragen aan de hoeveelheid *Campylobacter* in oppervlaktewater, zoals ook andere studies hebben laten zien (Bolton et al. 1987; Jones, Betaieb, and Telford 1990a). Van sommige auteurs is de inschatting dat rioolwater geen belangrijke omgevingsbron vormt voor (humane) besmettingen met *Campylobacter*, vanwege de verdunning vanaf het lozingspunt en de korte overleving van *Campylobacter* in oppervlaktewater, en omdat ze vrijwel niet worden aangetoond in slib afkomstig van de rwzi (Obiri-Danso and Jones 1999b; Jones, Betaieb, and Telford 1990a; 1990b). In tegenstelling hiermee heeft Koenraad et al. (1997) gesteld dat blootstelling aan gecontamineerd water kan leiden tot een schatting van 1.2 tot 170 *Campylobacter* infecties per 100 000 inwoners en dat besmet recreatiewater een hogere bijdrage zou kunnen leveren aan *Campylobacter* besmettingen bij de mens dan eerder aangenomen (P. M. F. J. Koenraad, Rombouts, and Notermans 1997). Een recente risicoanalyse op basis van WGS genotypering van *Campylobacter* uit diverse bronnen in combinatie met blootstellingsgegevens van patiënten wees eveneens op het belang van oppervlaktewater als bron van besmetting voor de mens (Mughini-Gras et al. 2021). Ondanks dat de verschillende zuiveringsprocessen van afvalwater de concentratie *Campylobacter* met meer dan 99,99% kunnen reduceren, kan het proceswater van pluimveeslachterijen bijdragen aan besmetting van oppervlaktewater. Onbekend is echter wat de relatieve bijdrages uit andere bronnen en sectoren zijn.

Literatuur

- Arimi, S. M., C. R. Fricker, and R. W.A. Park. 1988. "Occurrence of 'Thermophilic' Campylobacters in Sewage and Their Removal by Treatment Processes." *Epidemiology and Infection* 101 (2).
<https://doi.org/10.1017/S0950268800054194>.
- Baffone, Wally, Annalisa Casaroli, Barbara Citterio, Lucia Pierfelici, Raffaella Campana, Emanuela Vittoria, Emilio Guaglianone, and Gianfranco Donelli. 2006. "Campylobacter Jejuni Loss of Culturability in Aqueous Microcosms and Ability to Resuscitate in a Mouse Model." *International Journal of Food Microbiology* 107 (1). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.015>.
- Bates, D, M Maechler, B Bolker, S Walker, R H B Christensen, H Singmann, and G Grothendieck. 2015. "LME4: Linear Mixed-Effects Models Using 'Eigen' and S4. R Package Version 1.1-10. [Http://lme4.r-forge.r-project.org/](http://lme4.r-forge.r-project.org/)." Available at: [Http://CRAN.R-project.org/package=lme4](http://CRAN.R-project.org/package=lme4).
- Betaieb, M., and K. Jones. 1990. "Thermophilic Campylobacters in Two Sewage Treatment Plants in Libya." *Letters in Applied Microbiology* 11 (2). <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1990.tb01284.x>.
- Beterams, A., T. Tolksdorf, A. Martin, K. Stingl, N. Bandick, and F. Reich. 2023. "Change of Campylobacter, Escherichia Coli and Salmonella Counts in Packaged Broiler Breast Meat Stored under Modified Atmosphere and Vacuum Conditions at 4 and 10 °C Based on Cultural and Molecular Biological Quantification." *Food Control* 145. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109337>.
- Bolton, F. J., D. Coates, D. N. Hutchinson, and A. F. Godfree. 1987. "A Study of Thermophilic Campylobacters in a River System." *Journal of Applied Bacteriology* 62 (2).
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb02395.x>.
- Goot, J.A. van der, M.G.J. Koene, and Mark den Hartog. 2019. "Factoren Die van Invloed Zijn Op Het Aantal Campylobacter Op Borstvelmonsters van Vleeskuikens; Een Statistische Analyse van de NEPLUVI Monitoringsdata." <https://doi.org/10.18174/574416>.
- Holler, C. 1988. "Long-Term Study of Occurrence, Distribution and Reduction of Campylobacter Sp. in the Sewage System and Wastewater Treatment Plant of a Big Town." *Water Science and Technology* 20 (11-12). <https://doi.org/10.2166/wst.1988.0342>.
- Höller, C. 1988. "[Quantitative and Qualitative Studies of Campylobacter in a Sewage Treatment Plant]." *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie Und Hygiene. Serie B, Umwelthygiene, Krankenhaushygiene, Arbeitshygiene, Präventive Medizin* 185 (4-5).
- Jarvis, B., C. Wilrich, and P. T. Wilrich. 2010. "Reconsideration of the Derivation of Most Probable Numbers, Their Standard Deviations, Confidence Bounds and Rarity Values." *Journal of Applied Microbiology* 109 (5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04792.x>.
- Jones, K. 2001. "Campylobacters in Water, Sewage and the Environment." In *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. Vol. 90. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01355.x>.
- Jones, K., M. Betaieb, and D. R. Telford. 1990a. "Correlation between Environmental Monitoring of Thermophilic Campylobacters in Sewage Effluent and the Incidence of Campylobacter Infection in the Community." *Journal of Applied Bacteriology* 69 (2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01514.x>.
- . 1990b. "Thermophilic Campylobacters in Surface Waters around Lancaster, UK: Negative Correlation with Campylobacter Infections in the Community." *Journal of Applied Bacteriology* 69 (5).
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01573.x>.
- Knipper, Anna Delia, Carolina Plaza-Rodríguez, Matthias Filter, Imke F. Wulsten, Kerstin Stingl, and Tasja Crease. 2023. "Modeling the Survival of Campylobacter Jejuni in Raw Milk Considering the Viable but Non-Culturable Cells (VBNC)." *Journal of Food Safety*. <https://doi.org/10.1111/jfs.13077>.
- Koene, M.G.J., J.A. van der Goot, Ingrid de Jong, and Mark den Hartog. 2019. "Bevuiling En Campylobacter : Onderzoek Naar Een Mogelijke Relatie Tussen de Mate van Bevuiling van Levend Aangevoerde Vleeskuikens En Campylobacter Besmettingen Tijdens En Na Het Slachtproces." <https://doi.org/10.18174/574412>.
- Koenraad, P. M. F. J., F. M. Rombouts, and S. H. W. Notermans. 1997. "Epidemiological Aspects of Thermophilic Campylobacter in Water-related Environments: A Review ." *Water Environment Research* 69 (1). <https://doi.org/10.2175/106143097x125182>.

-
- Koenraad, P. M.F.J., W. C. Hazeleger, T. van der Laan, R. R. Beumer, and F. M. Rombouts. 1994. "Survey of Campylobacter Spp. in Sewage Plants in the Netherlands." *Food Microbiology* 11 (1). <https://doi.org/10.1006/fmic.1994.1009>.
- Koenraad, Petra M.F.J., Wilma F. Jacobs-Reitsma, Rijkelt R. Beumer, and Frank M. Rombouts. 1996. "Short-term Evidence of Campylobacter in a Treatment Plant and Drain Water of a Connected Poultry Abattoir." *Water Environment Research* 68 (2). <https://doi.org/10.2175/106143096x127370>.
- Koutsoumanis, Konstantinos, Ana Allende, Avelino Alvarez-Ordóñez, Declan Bolton, Sara Bover-Cid, Robert Davies, Alessandra De Cesare, et al. 2020. "Update and Review of Control Options for Campylobacter in Broilers at Primary Production." *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6090>.
- Mughini-Gras, Lapo, Christian Penny, Catherine Ragimbeau, Franciska M. Schets, Hetty Blaak, Birgitta Duim, Jaap A. Wagenaar, et al. 2016. "Quantifying Potential Sources of Surface Water Contamination with Campylobacter Jejuni and Campylobacter Coli." *Water Research* 101. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.069>.
- Mughini-Gras, Lapo, Roan Pijnacker, Claudia Coipan, Annemieke C. Mulder, Adriana Fernandes Veludo, Sharona de Rijk, Angela H.A.M. van Hoek, et al. 2021. "Sources and Transmission Routes of Campylobacteriosis: A Combined Analysis of Genome and Exposure Data." *Journal of Infection* 82 (2). <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.09.039>.
- Mulder, Annemieke C., Eelco Franz, Sharona de Rijk, Moyke A.J. Versluis, Claudia Coipan, Ralph Buij, Gerard Müskens, et al. 2020. "Tracing the Animal Sources of Surface Water Contamination with Campylobacter Jejuni and Campylobacter Coli." *Water Research* 187. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116421>.
- Obiri-Danso, K., and K. Jones. 1999a. "Distribution and Seasonality of Microbial Indicators and Thermophilic Campylobacters in Two Freshwater Bathing Sites on the River Lune in Northwest England." *Journal of Applied Microbiology* 87 (6). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00924.x>.
- Obiri-Danso, K., and Keith Jones. 1999b. "The Effect of a New Sewage Treatment Plant on Faecal Indicator Numbers, Campylobacters and Bathing Water Compliance in Morecambe Bay." *Journal of Applied Microbiology* 86 (4). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00703.x>.
- Obiri-Danso, K., N. Paul, and K. Jones. 2001. "The Effects of UVB and Temperature on the Survival of Natural Populations and Pure Cultures of Campylobacter Jejuni, Camp. Coli, Camp. Lari and Urease-Positive Thermophilic Campylobacters (UPTC) in Surface Waters." *Journal of Applied Microbiology* 90 (2). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01239.x>.
- Pacholewicz, E., P.A. Luning, C.B. Smits, M.G.J. Koene, and Mark den Hartog. 2019. "Developing Nudges as an Intervention to Improve Compliance of Food Handlers to Procedures during Broiler Processing." <https://doi.org/10.18174/574413>.
- Rechenburg, Andrea, and Thomas Kistemann. 2009. "Sewage Effluent as a Source of Campylobacter Sp. in a Surface Water Catchment." *International Journal of Environmental Health Research* 19 (4). <https://doi.org/10.1080/09603120802460376>.
- Reichelt, Benjamin, Vanessa Szott, Kerstin Stingl, Uwe Roesler, and Anika Friese. 2023. "Detection of Viable but Non-Culturable (VBNC)-Campylobacter in the Environment of Broiler Farms: Innovative Insights Delivered by Propidium Monoazide (PMA)-v-QPCR Analysis." *Microorganisms* 11 (10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102492>.
- Rollins, D. M., and R. R. Colwell. 1986. "Viable but Nonculturable Stage of Campylobacter Jejuni and Its Role in Survival in the Natural Aquatic Environment." *Applied and Environmental Microbiology* 52 (3). <https://doi.org/10.1128/aem.52.3.531-538.1986>.
- Santos, Leticia Silva, Daise Aparecida Rossi, Raquelline Figueiredo Braz, Belchiolina Beatriz Fonseca, Micaela Guidotti-Takeuchi, Rosiane Nascimento Alves, Marcelo Emílio Beletti, et al. 2023. "Roles of Viable but Non-Culturable State in the Survival of Campylobacter Jejuni." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1122450>.
- Silva, Joana, Daniela Leite, Mariana Fernandes, Cristina Mena, Paul Anthony Gibbs, and Paula Teixeira. 2011. "Campylobacter Spp. As a Foodborne Pathogen: A Review." *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200>.
- Stampi, S., G. De Luca, O. Varoli, and F. Zanetti. 1999. "Occurrence, Removal and Seasonal Variation of Thermophilic Campylobacters and Arcobacter in Sewage Sludge." *Zentralblatt Für Hygiene Und Umweltmedizin = International Journal of Hygiene and Environmental Medicine* 202 (1). [https://doi.org/10.1016/s0934-8859\(99\)80048-0](https://doi.org/10.1016/s0934-8859(99)80048-0).

- Stampi, S., O. Varoli, G. de Luca, and F. Zanetti. 1992. "Occurrence, Removal and Seasonal Variation of 'Thermophilic' Campylobacters in a Sewage Treatment Plant in Italy." *Zentralblatt Für Hygiene Und Umweltmedizin = International Journal of Hygiene and Environmental Medicine* 193 (3).
- Stampi, S., O. Varoli, F. Zanetti, and G. de Luca. 1993. "Arcobacter Cryaerophilus and Thermophilic Campylobacters in a Sewage Treatment Plant in Italy: Two Secondary Treatments Compared." *Epidemiology and Infection* 110 (3). <https://doi.org/10.1017/S0950268800051050>.
- Stern, N. J., D. M. Jones, I. V. Wesley, and D. M. Rollins. 1994. "Colonization of Chicks by Non-culturable Campylobacter Spp." *Letters in Applied Microbiology* 18 (6). <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1994.tb00882.x>.
- Stingl, Kerstin, Janine Heise, Maja Thieck, Imke F. Wulsten, Ewa Pacholewicz, Azuka N. Iwobi, Janani Govindaswamy, et al. 2021. "Challenging the 'Gold Standard' of Colony-Forming Units - Validation of a Multiplex Real-Time PCR for Quantification of Viable Campylobacter Spp. in Meat Rinses." *International Journal of Food Microbiology* 359. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109417>.
- Surampalli, R. Y., S. K. Banerji, and J. C. Chen. 1994. "Microbiological Stability of Wastewater Sludges from Activated Sludge Systems." *Bioresource Technology* 49 (3). [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90040-X).
- Thomas, C., H. Gibson, D. J. Hill, and M. Mabey. 1999. "Campylobacter Epidemiology: An Aquatic Perspective." In *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. Vol. 85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.tb05296.x>.
- Thomas, C., D. J. Hill, and M. Mabey. 1999. "Evaluation of the Effect of Temperature and Nutrients on the Survival of Campylobacter Spp. in Water Microcosms." *Journal of Applied Microbiology* 86 (6). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00789.x>.
- Wulsten, Imke F., Alibek Galeev, and Kerstin Stingl. 2020. "Underestimated Survival of Campylobacter in Raw Milk Highlighted by Viability Real-Time PCR and Growth Recovery." *Frontiers in Microbiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01107>.
- Wulsten, Imke F., Maja Thieck, André Göhler, Elisabeth Schuh, and Kerstin Stingl. 2022. "Chicken Skin Decontamination of Thermotolerant Campylobacter Spp. and Hygiene Indicator Escherichia Coli Assessed by Viability Real-Time PCR." *Pathogens* 11 (6). <https://doi.org/10.3390/pathogens11060706>.

5 Bijlages

Bijlage 1 Procesbeschrijvingen zuiveringsinstallaties

Procesbeschrijving slachterij

1.1. Pompput en filtratie

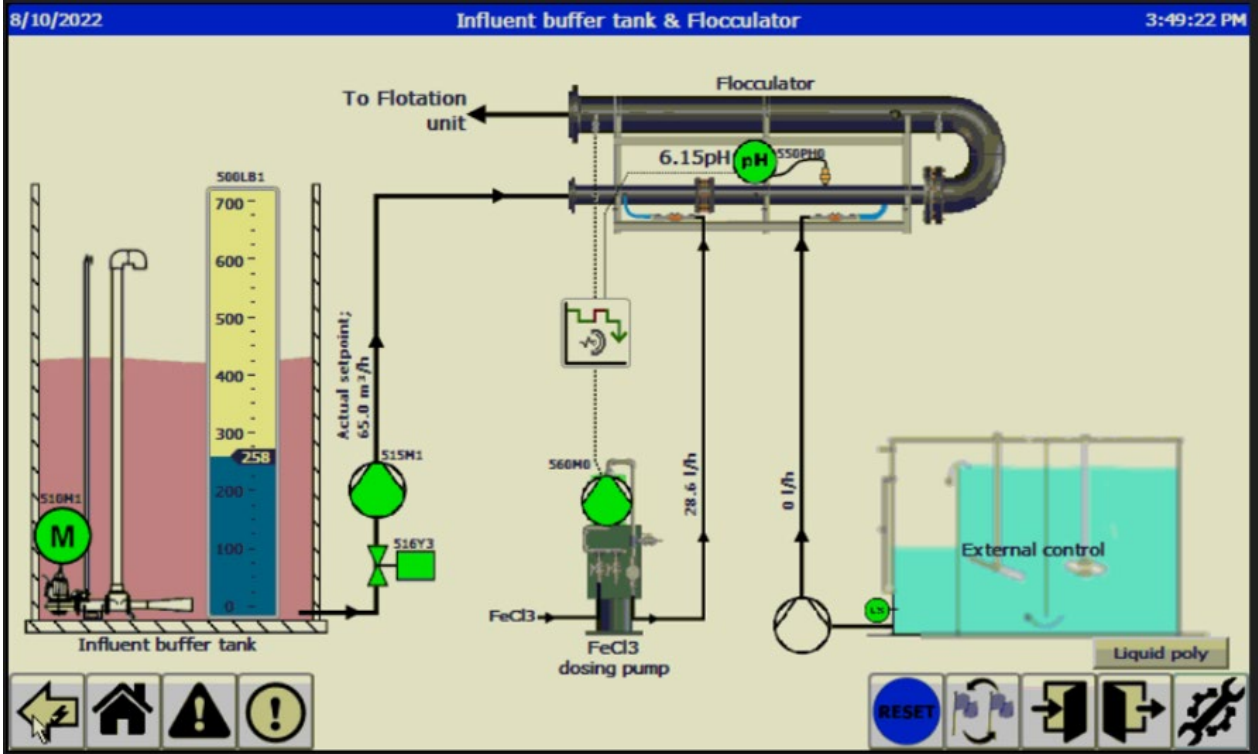
Het ruwe afvalwater stroomt naar een pompput, van waar het naar een filterinstallatie wordt gepompt. Het filter verwijdert delen groter dan 1 mm, dit voorkomt verstoppingen in het verdere proces. Het gefilterde water valt vervolgens onder vrij verval in een gemengde buffer tank met een volume van 300 m³. De buffer tank egaliseert pieken in het debiet en de vervuiling, waardoor de opvolgende processen stabiel verlopen. Vanuit de buffer tank wordt het water met een constant debiet naar het flocculatie / flotatie systeem gepompt door middel van een dompelpomp. Om stankvorming te voorkomen wordt de buffertank gemengd en belucht.

1.2. Coagulatie/flocculatie

Vanuit de buffertank wordt het water eerst naar een zogenaamde flocculator gepompt, waarin de diverse chemicaliën worden gedoseerd en gemengd met het afvalwater. In de flocculator wordt een coagulant aan de inlaatzijde van de flocculator in het afvalwater gedoseerd en gemengd met het afvalwater. Coagulatie vindt plaats door destabilisatie van de verontreinigende stoffen in het afvalwater. Er worden fijne deeltjes ("pinpoints") gevormd, die nog niet ideaal zijn voor de scheiding. Om deze zeer kleine vlokjes te vergroten en daarmee de afscheidbaarheid sterk te verbeteren, wordt een flocculatiemiddel (ook wel polymeer genoemd) aan het water toegevoegd nadat de coagulatie is voltooid. In een tweede menigeenheid wordt het water met het flocculatiemiddel gemengd. Hierdoor vindt vloggroei plaats. Op deze wijze worden vlokken gevormd die geschikt zijn voor de scheiding vanuit het water. Aangezien het coagulatiemiddel meestal leidt tot een te sterke daling van de pH (verzuring), wordt als laatste stap in het proces de pH van het water gemeten en eventueel gecorrigeerd met natronloog.

1.3. Flotatie

De in de flocculator gevormde vlokken worden vervolgens afgescheiden in een flotatie afscheider. De flotatie afscheider is opgebouwd uit een flotatie tank met een stroomverdelingselement, schraperinrichting met statische indikker, roestvast stalen bodemschroef en een beluchtingssysteem. Een deelstroom van het behandelde water wordt daartoe gerecirculeerd en met een pomp onder druk gebracht. Na deze pomp wordt lucht gedoseerd in deze deelstroom. Onder druk lost meer lucht op dan onder atmosferische omstandigheden. Deze lucht komt vervolgens weer vrij onder gecontroleerde omstandigheden door middel van automatische ontspanafsluiters welke aan de voor- en onderzijde van de flotatie unit bevestigd zijn. De lucht komt vrij onder vorming van zeer kleine colloïdale luchtbelletjes, welke zich hechten aan de af te scheiden materialen en daarmee conglomeraten vormen. Deze conglomeraten worden afgescheiden en worden verzameld in een compacte drijf laag, welke door middel van het schraper / indik mechanisme wordt verwijderd. Zware deeltjes bezinken in de flotatie unit. Deze deeltjes worden via een roestvast stalen bodemschroef en vervolgens via een tijdgeschakelde pneumatisch gestuurde afsluiter afgelaten. Het behandelde water wordt via een instelbare overstort afgevoerd. Na het flotatie proces wordt het water opgevangen in een tweede tank van circa 300 m³. Doel van deze tank is het water met een gelijkmatig debiet af te kunnen laten in het gemeentelijke rioolstelsel.



Schematische procesbeschrijving (exclusief flotatie-unit en effluent buffertank)



Procesbeschrijving rwzi

De onderzochte rwzi maakt gebruik van een ultra laagbelaste actief-slibinstallatie. Het actief-slibproces is de meest toegepaste methode voor biologische waterzuivering. Het zuiveringsproces bestaat uit een aantal processtappen; voorbezinking (primaire zuivering is gericht op verwijdering van deeltjes op basis van hun grootte en soortelijke massa, gevolgd door biologische zuivering (secundaire en tertiaire zuivering) die is gericht op verwijdering van organische stoffen, nutriënten en zwevende stof

1.1. Primaire zuivering

Gedurende de primaire zuivering wordt het afvalwater gezuiverd van (vaste) stoffen. Het influent wordt via een influentgemaal opgepompt naar het hoogste punt in de installatie, waarna het door de werking van de zwaartekracht langs een aantal tanks wordt geleid. Eerst worden de grove deeltjes met roosters verwijderd, waarna met een voorbezinktank kleinere deeltjes verwijderd worden.

1.2. Secundaire en tertiaire zuivering

Na de fysische zuivering van het afvalwater volgt de biologische zuivering, waarbij diverse soorten micro-organismen organisch materiaal afbreken en nutriënten uit het afvalwater worden verwijderd. De micro-organismen gebruiken het organisch materiaal als voedsel. Door de groei van de micro-organismen wordt biologisch actief slib gevormd wat behalve uit micro-organismen bestaat uit een soort slijm laag die door de micro-organismen wordt gevormd en die zwevende organische deeltjes absorbeert. Het actief slibsysteem bestaat uit verschillende deelprocessen; een anaerobe tank voor fosfaatverwijdering, anoxische tank voor denitrificatie, daarna een beluchtingstank, die vooral gericht is op omzetting van ammonium in nitraat en daarna retourstroom terug naar anoxisch. De meeste omzetting van organisch materiaal vindt plaats parallel aan denitrificatie. De laatste stap bestaat uit een nabezinktank, waar water en slib worden gescheiden vergelijkbaar met het principe in de voorbezinktank. Het water dat over de overstortrand van de nabezinktank loopt, is het gezuiverde afvalwater. Uit de nabezinktank wordt een deel van het slib teruggepompt naar het begin van de biologische zuivering waar het gemengd wordt met nieuw afvalwater (retourslib). Het overtollige slib wordt afgevoerd voor indikking en verdere slibbehandeling.

Wageningen Bioveterinary Research
Postbus 65
8200 AB Lelystad
T 0320 23 82 38
info.bvr@wur.nl
wur.nl/bioveterinary-research

Wageningen Bioveterinary Research
Report 2401518

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 7.200 medewerkers (6.400 fte) en 13.200 studenten en ruim 150.000 Leven Lang Leren-deelnemers behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.