



VRAAGBAAK
RIOOL-WATERZUIVERINGSINSTALLATIES

Door

De Bont, R., Van Larebeke, N.

2002

Luik 1: Beleidsondersteuning

Overdracht van menselijke pathogenen via aërosolen afkomstig van een RWZI

Na diverse telefoontjes (Mr. Hoet, pneumologie KUL; Prof. Anné, Bacteriologie KUL; Prof. Vanimpe, Landbouw KUL; Prof. Ieven, Microbiologie UZA; Prof. Nolard, Mycologie Inst. Louis-Pasteur; Prof. Collard, bacteriologie Inst. Louis-Pasteur; Prof. Vranckx, Virologie Inst. Louis-Pasteur; Carla Dinne, WTCB; Mr. Gemoeds, Waterzuivering VITO; Mvr. De Weere, Waterzuivering VITO) werd het duidelijk dat er over dit onderwerp in België nog niet veel geweten is. Ik heb me dus toegelegd op de buitenlandse literatuur die hierover bestaat en op opmerkingen van Prof. Verstraete (Labo microbiële Ecologie en Technologie, RUG).

1. Pathogenen verspreid door aërosolen (en schuim):

Door natuurlijke processen en menselijke activiteit kunnen aërosolen gevormd worden die micro-organismen bevatten. Er werd reeds aangetoond dat aërosolen in staat zijn om micro-organismen over lange afstand te transporteren en dat ze naargelang hun bron infecties, asmatische problemen en andere gezondheidseffecten kunnen veroorzaken (Brandi *et al.*, 2000). De aërietanks van RWZIs zijn mogelijk een belangrijke bron voor microbiële aërosolen. Het is inderdaad zo dat in bepaalde waterzuiveringsinstallaties aërosolen en schuim met de wind worden verspreid. Men heeft in het verleden daar behoorlijk werk op verricht, doch steeds kwam daaruit dat er geen nadrukkelijke gevaren waren aan verbonden. Wel bleken her en der de werklui iets meer onderhevig te zijn aan ziekten (Gregersen *et al.*, 1999; Nethercott & Holness, 1988; Scarlett-Kranz *et al.*, 1987). Tot dusver neemt men nergens specifieke maatregelen tegen bacteriële besmetting via de afgassen van waterzuiveringsinstallaties.

1.1 Bacteriën:

1.1.1 Totale bacterie-tellingen:

Totale bacterie-tellingen in de lucht werden reeds voorgesteld als indicator voor het evalueren van aërosolen (Higgins, 1964; Kenline, 1968). Het is echter niet representatief voor de pathogeniciteit van de aërosol. Bovendien is het dan onduidelijk of er interferentie is van een andere bron dan de RWZI (Hickey & Reist, 1975).

Het gebruiken van totale bacterie-tellingen als indicator voor virale aërosolen is onbetrouwbaar. Volgens Carducci *et al.* (1999) waren totale bacteriën en fecale streptococci-tellingen positief geassocieerd met virale aanwezigheid maar omdat het verschil tussen virus-positieve en -negatieve stalen laag was en omdat viruscontaminatie niet altijd geassocieerd leek met hoge bacterietellingen zou het gebruiken van deze parameters als virale indicators waarschijnlijk onbetrouwbare resultaten geven.

1.1.2 Totale coliformen:

Coliformen zijn een facultatief anaëroobe, gram-negatieve, niet-spore-vormende, staafvormige bacteriën die lactose fermenteren. Deze groep bestaat uit *Escherichia coli*, een algemeen intestinaal organisme, *Klebsiella pneumoniae*, een minder algemene intestinale bewoner die ook op de bodem voorkomt en *Enterobacter aerogenes* die normaal gezien niet met het spijsverteringsstelsel wordt geassocieerd.

De coliformgroep wordt gebruikt als indicator voor watercontaminatie door bacteriën, virussen en protozoa. Omdat de coliformen geassocieerd zijn met het spijsverteringsstelsel geeft hun aanwezigheid in water aan dat het water gecontamineerd werd door organismen van intestinale oorsprong. Ze zijn geschikt doordat ze in grote hoeveelheden het spijsverteringsstelsel van mensen en andere warmbloedige dieren bewonen. Wanneer ze worden uitgescheiden in water, zullen de coliformen uiteindelijk sterven maar niet sneller dan de pathogene bacteriën *Salmonella* en *Shigella*. Bovendien gedragen de coliformen en de pathogenen zich gelijkaardig gedurende de waterzuivering. Het is dus waarschijnlijk dat als men coliformen in het water vindt, het water besmet is met fecale pathogenen. Ten slotte bevatten de coliformen niet alleen organismen afkomstig van de mens maar ook organismen afkomstig van andere warmbloedige dieren. Veel pathogenen (*Salmonella*, *Leptospira*) die gevonden worden in warmbloedige dieren infecteren immers ook mensen.

Er is reeds aangetoond dat coliformen zich kunnen verspreiden via aërosolen die afkomstig zijn van RWZIs (Adams & Spendlove, 1970; Brandi *et al.*, 2000; Fannin *et al.*, 1985; Goff *et al.*, 1973). De coliform-groep kan dus een indicator zijn van de verspreiding van pathogenen afkomstig van RWZIs door aërosolvorming.

Fecale coliformen zijn coliformen die met de faeces van mensen en warmbloedige dieren worden uitgescheiden. Ze kunnen zich ook in de lucht verspreiden via aërosolen afkomstig van RWZIs (Fannin *et al.*, 1985).

1.1.3 Fecale streptococci:

Fecale streptococci werden reeds voorgesteld als indicatoren voor microbiële aërosolcontaminatie als gevolg van RWZIs (Crawford *et al.*, 1979). In deze studie bleek ook dat fecale streptococci een hoge stabiliteit vertonen. Ze bleken echter een sterke dag-nacht variatie te vertonen en bovendien bleek de achtergrondconcentratie vooral 's nachts al hoog te zijn.

Fecale streptococci-tellingen waren positief geassocieerd met virale aanwezigheid maar omdat het verschil tussen virus-positieve en -negatieve stalen laag was zou het gebruiken van deze parameter als virale indicator waarschijnlijk onbetrouwbare resultaten geven (Carducci *et al.*, 1999).

1.1.4 Legionella spp.:

Legionella is een bacterie die bij mensen de veteranenziekte kan veroorzaken. *Legionella* infecteert de mens langs respiratoire weg, door het inademen van besmette aërosoldruppels. Het werd reeds aangetoond in afvalwater (Catalan *et al.*, 1997; Cherry *et al.*, 1982; Palmer *et al.*, 1993) maar niet in grote hoeveelheden. Men heeft echter nog nooit metingen gedaan van *Legionella* in lucht nabij RWZIs maar dit zou misschien niet slecht zijn. Om *Legionella* te detecteren in lucht kan men gebruik maken van een

impinger of six-stage impactor. Via PCR kan men ze dan identificeren (Ishimatsu *et al.*, 2001).

1.1.5 Enterobacteriaceae:

Klebsiella pneumoniae:

Deze bacterie komt voor in de bodem en in water als een vrij-levend organisme. Men vindt ze ook terug in het spijsverteringsstelsel van mensen. Alleen wanneer ze voorkomen in het ademhalingsstelsel kunnen ze infectueus zijn. Randall & Ledbetter (1966) concluderen dat *Klebsiella* de beste indicator is voor bacteriële luchtverontreiniging door afvalwater. Ze besloten ook dat ingekapselde organismen zoals *Klebsiella* en *Aerobacter* gemakkelijker kunnen overleven in de lucht dan niet-gekapselde organismen zoals *Escherichia*.

Acinetobacter calcoaceticus:

Het zijn bewoners van bodem, riool en water en ze worden vaak in mensen teruggevonden als biologische contaminanten. Ze kunnen meningitis en septische infecties veroorzaken, vooral in mensen met een verminderde weerstand.

Escherichia coli:

Goff *et al.* (1973) bepaalden met de Andersen six-stage impactor het aantal bacteriën en het aantal coliformen in de lucht bij een WZI. Ze rapporteerden dat zonnestralen, lage relatieve vochtigheid en lage windsnelheid de bacteriële aerosolmissie significant doen dalen en ze concludeerden dat *E. coli* kan gebruikt worden als indicator voor luchtverontreiniging door RWZI.

1.1.6 *Gordona amarae:*

Gordona (Nocardia) amarae wordt beschouwd als één van de dominante organismen in schuim van waterzuiveringsinstallaties. Ook *Microthrix parvicella* en *Nocardia pinensis* worden frequent aantgetoond (Seviour *et al.*, 1990). Fiorella de los Reyes *et al.* (1998) beschouwen cultuur-gebaseerde technieken om *G. amarae* te detecteren als onbetrouwbaar. Zij gebruiken oligonucleotide probes die rRNA targetten.

1.1.7 Anderen:

King *et al.* (1973) deden met de Andersen drum sampler metingen van bacteriën in de lucht nabij afvalwater-aëratietanks. *Staphylococcus aureus* bleek 5 maal meer voor te komen benedenwinds dan bovenwinds. *Alcaligenes faecalis* werd frequent gemeten benedenwinds maar niet bovenwinds. Deze laatste werd door King *et al.* voorgesteld als indicatororganisme voor bacteriële luchtvervuiling door afvalwater.

Mycobacteria zijn gram-positieve, staaf- tot filamentvormige bacteriën. Een voorbeeld is het zeer virulente *M. tuberculosis*. Het veroorzaakt tuberculose en kan worden overgedragen door de lucht. Pereira & Benjaminson (1973) vonden deze bacterie terug in de lucht nabij een RWZI.

1.2 virussen:

1.2.1 Enterische virussen:

Dit zijn virussen van het spijsverteringsstelsel. Voorbeelden zijn: picornavirus, enterovirussen, reovirussen, Rotavirus, Norwalk en Norwalk-achtige virussen. Door hun hoge stabiliteit, lage minimum infectueuze dosis en gemakkelijke transmissie door aërosolen kunnen ze een effect hebben op de gezondheid van werkers van een RWZI en omwondenden ervan.

Het is technisch moeilijk om virussen te isoleren uit stalen van de omgeving. Dit heeft vele onderzoekers ertoe gebracht om andere organismen voor te stellen als indicator van virale contaminatie (vb. Fecale streptococci en bacteriofagen). Virussen blijken zich wel verder te kunnen verspreiden dan totale bacteriën, faecale streptococci en coliphagen (Carducci *et al.*, 1999).

Enterovirussen:

Deze groep bestaat uit poliovirussen, coxsackievirussen en echovirussen. Ze komen voor in respiratoire secreties en in de stoelgang. Door deze laatste komen ze in afvalwater terecht.

Reovirussen:

Deze worden gevonden in water. Ze infecteren het ademhalingsstelsel en het zijn mogelijke enterische pathogenen. Het is tot op heden nog echter nog geen onomkeerbare associatie aangetoond tussen reovirussen en menselijke pathologie. Er zijn wel goede gekende methodes om hun aanwezigheid aan te tonen (isolatie in een gemodificeerde celcultuur MA 104 of biomoleculaire technieken zoals PCR: Muscillo *et al.*, 1998) en ze zijn ook zeer resistent tegen drogen. Door deze kenmerken en doordat enterovirussen zelden alleen worden aangetroffen in aërosolen zijn reovirussen een goede kandidaat als indicator voor virale aanwezigheid in aërosolen.

1.2.2 Colifagen:

Dit zijn bacteriofagen wiens gastheer E.coli stammen zijn. Ze komen voor in het spijsverteringsstelsel van de mens en ze worden met de faeces uitgescheiden. Colifagen werden reeds voorgesteld als indicatoren voor microbiële aërosolcontaminatie als gevolg van RWZIs. Colifagen blijken stabiel te zijn dan coliformen op lokaties verder van de bron (Fannin *et al.*, 1977) en dan bacteriën gedurende chlorinatie (Bausum *et al.*, 1982). Ook zijn ze stabiel in afvalwateraërosolen dan het Poliovirus (Fannin *et al.*, 1981) en wordt er gesuggereerd dat ze via aërosolen verder kunnen verspreid worden dan enterovirussen. Ze zouden dus kunnen dienen als indicator voor virale contaminatie van afvalwateraërosolen. Carducci *et al.* (1995) detecteerden colifagen en enterovirussen en de gemiddelde telling van fagen in enterovirus-positieve stalen bleek niet significant verschillend van die in enterovirus-negatieve stalen (3.5 PFU/m₃ t.o.v. 5.5 PFU/m₃). Colifagen zijn dus toch niet noodzakelijk een goede indicator voor enterovirussen in riool en aërosolen.

1.3 Parasieten:

Een veel voorkomende parasiet in afvalwater is *Giardia*. Het haalt echter niets uit om hiervan luchtmetingen te doen want er bestaan geen gegevens die indiceren dat Giardia-cysten in de lucht worden vrijgesteld en getransporteerd (EPA, 1998). Hetzelfde geldt voor een andere veel voorkomende parasiet *Cryptosporidium* (EPA, 2001).

2. Meettechnieken:

2.1 Agar settling plates:

Deze meten 'settleable viable particles' per unit agaroppervlakte en per tijdseenheid.

2.2 Solid media impactors:

Voorbeelden zijn de Wells centrifuge en de Andersen drum en six-stage impactors. Deze meten 'viable' partikels per volume-eenheid lucht. De drum sampler kan variaties onderscheiden in partikelconcentraties met de tijd en de six-stage impactor kan een onderscheid maken in partikelgrootte van de 'viabel' aërosol. Over het algemeen resulteert elk 'viable' partikeltje gerecupereerd door de impactor bij incubatie in een kolonie ook al bevat dit partikeltje meer dan één 'viable' cel.

2.3 Liquid impingers:

Deze meten 'viable' partikels per volume-eenheid lucht. De partikels kunnen echter opbreken in de vloeistof gedurende staalname en de getelde kolonies na incubatie kunnen groter zijn dan het aantal 'viable' partikels.

2.3 Surface Air System:

Deze impactor zuigt gedurende een variabele tijd met een constante snelheid lucht op tegen een 55 mm contactplaatje, gevuld met agar. Deze methode blijkt minder efficiënt te zijn dan de Andersen Impactor.

3.4 Andere:

Het labo van Prof. W. Verstraete (RUG) werkt momenteel aan het opsporen van fecale contaminatie in het milieu doormiddel van moleculaire methodes en merkers. Over omgevingslucht hebben ze o.a. een publicatie t.a.v. de kiembelasting rond compostinstallaties gemaakt: *H. MARICOU, W. VERSTRAETE and K. MESUERE. 1998. Hygienic aspects of biowaste composting: airborne microbial concentrations as a function of feedstock, operation and season. Waste Manage. Res. 16, 304-311.*

Ze zijn graag bereid om zo'n studie te doen m.b.t. de omgevingslucht rond RWZI's. Evenwel zouden ze deze vandaag de dag doorvoeren met de moleculaire methodologie en hierbij bijzonder aandacht geven aan de Mycobacteriën. Immers, deze laatste blijken aan

te rijken in de lucht, zijn aan zich moeilijk te kweken en kunnen toch belangrijk zijn m.b.t. de gezondheid (denk aan *M. tuberculosis*).

Een voorbeeld van een techniek die kan gebruikt worden is **DGGE** (denaturerende gradiënt gel electroforese). Hierbij krijgt men vingerafdrukken van ribosomale RNA genen die een idee geven van verschuivingen in de microbiële biodiversiteit in bodem, water, fecaal materiaal, etc. zonder dat de cellen moeten gekweekt worden. Tellingen van kolonies zijn onderworpen aan fouten omdat bacteriën die aan de lucht worden blootgesteld nog leefbaar blijven maar wel hun mogelijkheid tot kolonievorming verliezen (Heidelberg *et al.*, 1997).

In 1997 toonden Muscillo *et al.* (Italië) via **RT-PCR** het poliovirus 3 aan in aërosolen afkomstig van een RWZI. Hierbij worden specifieke genoomsequenties geïdentificeerd.

Er werden ook reeds berekeningen en schattingen gedaan naar de bacteriële aërosolmissie door RWZIs. Kenline & Scarpino (1972) berekenden op basis van een dispersiemodel en de door hun gemeten bacteriële concentraties in de lucht de emissie van bacteriën: 440 organismen/seconde/m² tankoppervlakte (ze veronderstellen 1 organisme per partikel). Sawyer *et al.* (1993) deden een schatting naar de emissiesnelheid van bacteriële aërosolen. Ze bepaalden eerst m.b.v. een Andersen six-stage impactor de hoeveelheid aërosolen nabij een aëratietank. De stalen werden geanalyseerd voor 'Standard plate counts' (SPC), totale coliformen (TC), fecale coliformen (FC) en fecale streptococci (FS). Twee berekeningswijzen werden gehanteerd om tot de bacteriële emissiesnelheid te komen. Bij de eerste werd de bacteriële luchtconcentratie vermenigvuldigd met 'air flow rate' afkomstig van de tank. De tweede methode tracht het aantal bacteriën te berekenen dat wordt uitgestoten door een bepaalde oppervlakte van de tank gedurende een bepaalde tijd. Uit de eerste methode kwamen de volgende resultaten: 1.61 SPC/m³/sec, 0.20 TC/m³/sec. De tweede methode berekende de volgende waarden: 2.18 SPC/m³/sec en 0.27 TC/m³/sec.