

**BTO 2006.028**  
Juni 2006

# **Het gebruik van alternatieve indicatororganismen voor de detectie van fecale verontreiniging in water**

**BTO 2006.028**  
Juni 2006

# Het gebruik van alternatieve indicatororganismen voor de detectie van fecale verontreiniging in water

© 2006 Kiwa N.V.  
Alle rechten voorbehouden.  
Niets uit deze uitgave mag  
worden verveelvoudigd,  
opgeslagen in een  
geautomatiseerd  
gegevensbestand, of  
openbaar gemaakt, in enige  
vorm of op enige wijze,  
hetzij elektronisch,  
mechanisch, door  
fotokopieën, opnamen, of  
enig andere manier, zonder  
voorafgaande schriftelijke  
toestemming van de  
uitgever.

**Kiwa N.V.**  
**Water Research**  
Groningehaven 7  
Postbus 1072  
3430 BB Nieuwegein

Tel. (030) 606 95 11  
Fax (030) 606 11 65  
[www.kiwa.nl](http://www.kiwa.nl)

# Colofon

**Titel**

Het gebruik van alternatieve indicatororganismen  
voor de detectie van fecale verontreiniging in water

**Projectnummer**

111571.100.005

**Projectmanager**

Wiel Senden

**Opdrachtgever**

BTO

**Kwaliteitsborger(s)**

Gertjan Medema en Dick van der Kooij

**Auteur(s)**

Paul W. J. J. van der Wielen en Stefan Voost

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar

# Samenvatting

Fecale verontreiniging van drinkwater is een potentiële bedreiging voor de volksgezondheid, vanwege de mogelijke aanwezigheid van pathogene micro-organismen in fecaliën. Daarom worden fecale indicatororganismen gebruikt om verontreiniging van water met fecaliën op te sporen. Op dit moment worden voornamelijk bacteriën die behoren tot de coligroep, *Escherichia coli*, enterococci en sulfietreducerende clostridia gebruikt als indicatororganismen. Deze indicatororganismen hebben echter een aantal beperkingen: (i) ze komen in relatief lage aantallen voor in fecaliën van mens en dier, (ii) ze kunnen niet gebruikt worden om de bron van de fecale verontreiniging te duiden en (iii) ze kunnen onder bepaalde condities groeien in het natuurlijke watermilieu.

Mogelijke alternatieve indicatororganismen zijn enkele groepen obligaat anaërobe bacteriën die de fecale microbiële flora domineren en die door hun gevoeligheid voor zuurstof niet groeien in natuurlijke watermilieus. Het doel van de onderhavige studie was te onderzoeken of moleculaire methoden voor de detectie van deze obligaat anaërobe bacteriën, kunnen worden toegepast om fecale verontreiniging van water aan te tonen. Daarnaast werd ook onderzocht of met deze alternatieve indicatororganismen ook de bron van de fecale verontreiniging kan worden aangeduid en hoe lang de alternatieve indicatororganismen detecteerbaar waren in feacaal besmet leiding- en oppervlaktewater.

In de eerste fase van het onderzoek zijn verschillende primerparen getest op DNA geïsoleerd uit Lekkanaalwater, water uit de spaarbekkens van Loenen en de Biesbosch, influent en effluent van een rioolwaterzuiveringsinstallatie (RWZI) en afvalwater van een rundveeslachterij. De primerparen die werden gebruikt zijn gepubliceerd in de literatuur en zouden specifiek DNA van *Bacteroides spp.*, een huumaanspecifieke *Bacteroides*-stam, rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen, *Bifidobacterium spp.*, *Faecalibacterium prausnitzii* en *Clostridium clostridiiforme* moeten amplificeren. De resultaten lieten zien dat de primerparen voor *Bacteroides spp.*, huumaanspecifieke *Bacteroides*-stam en rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen het gewenste stuk DNA amplificeerde, terwijl de primerparen voor de andere indicatororganismen ook DNA van andere niet-fecale bacteriën amplificeerde. In het verdere traject zijn daarom alleen *Bacteroides spp.*, huumaanspecifieke *Bacteroides*-stam HF183 en de rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen CF123 als alternatieve indicatororganismen onderzocht.

*Bacteroides spp.* werd gedetecteerd in influent en effluent van de RWZI, afvalwater van een rundveeslachterij, Lekkanaalwater en in water uit de spaarbekkens van Loenen en de Biesbosch. De huumaanspecifieke *Bacteroides*-stam werd gedetecteerd in influent en effluent van de RWZI en in Lekkanaalwater, maar werd niet gedetecteerd in de andere monsters. De rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen werden alleen gedetecteerd in afvalwater van de rundveeslachterij. Alledrie de oppervlaktewatermonsters

waren dus fecaal besmet, waarbij het Lekkanaal in ieder geval met een humane fecale bron was besmet. De fecale bron(nen) die de spaarbekkens besmette(n) kon(den) niet worden achterhaald.

De periode waarin kweekbare *E. coli* en het DNA van *Bacteroides spp.*, de huumaanspecifieke *Bacteroides*-stam HF183 en *E. coli* kan worden gedetecteerd na een fecale verontreiniging werd onderzocht door oppervlaktewater en leidingwater te besmetten met 10% rioolwater en de watermonsters daarna te incuberen bij 12°C en 20°C. De resultaten toonden aan dat kweekbare *E. coli* tot 15 dagen in de watermonsters bij 20°C werd gedetecteerd en tot 22 dagen in de watermonsters bij 12°C. Het DNA van *E. coli* werd tot 15 (12°C) of 22 dagen (20°C) in het oppervlaktewater en tot 29 dagen in het leidingwater (12°C en 20°C). De periode waarin het DNA van *Bacteroides*-stam HF183 werd gedetecteerd was gelijk met het DNA van *E. coli* voor de watermonsters geïncubeerd bij 12°C. Bij 20°C was het DNA van stam HF183 maar acht dagen detecteerbaar. Het DNA van *Bacteroides spp.* werd in alle watermonsters gedurende de gehele incubatietijd van het experiment (100 dagen) gedetecteerd. De detectie van DNA van *Bacteroides spp.* lijkt dus een gevoeliger methode te zijn om fecale verontreiniging van water mee te detecteren dan de detectie van kweekbare *E. coli* of DNA van *E. coli*.

Er wordt geconcludeerd dat de moleculaire methoden om *Bacteroides*-soorten in water te detecteren, potentie hebben om fecale verontreiniging van water aan te tonen. Daarom wordt aanbevolen om de PCR-methode voor de detectie van *Bacteroides* verder te kwantificeren. Tevens wordt aanbevolen om het ruwwater en reinwater van enkele kwetsbare grondwaterwinningen en monsters genomen door de zuivering van een oppervlaktewaterwinning te onderzoeken op de aanwezigheid van *E. coli* en *Bacteroides*, zodat verder onderzocht kan worden of *Bacteroides* mogelijk een beter fecaal indicatororganisme is dan *E. coli*.

# Inhoud

	<b>Samenvatting</b>	<b>1</b>
	<b>Inhoud</b>	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>Introductie</b>	<b>5</b>
1.1	Fecale indicatororganismen	5
1.2	<i>Bacteroides spp.</i>	7
1.3	<i>Bifidobacterium spp.</i>	7
1.4	Andere fecale indicatororganismen	8
1.5	Doel	8
<b>2</b>	<b>Vergelijking van methoden voor de detectie van verschillende indicatororganismen in water</b>	<b>11</b>
2.1	PCR-reacties	11
<b>3</b>	<b>De aanwezigheid van <i>Bacteroides</i> in verscheidene watermonsters</b>	<b>17</b>
3.1	Resultaten PCR-reacties	17
3.2	Sequentieanalyse	19
<b>4</b>	<b>Detectieperiode van <i>E. coli</i>, <i>Bacteroides spp.</i> en <i>Bacteroides</i> HF183 in watermonsters besmet met rioolwater</b>	<b>23</b>
4.1	Introductie	23
4.2	Methode	23
4.3	Resultaten	25
4.4	Discussie	29
<b>5</b>	<b>Conclusies</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>Aanbevelingen</b>	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>Referenties</b>	<b>35</b>



# 1 Introductie

## 1.1 Fecale indicatororganismen

Fecale verontreiniging van drinkwater en watersystemen die worden gebruikt voor de bereiding van drinkwater vormt een potentieel gezondheidsrisico door de mogelijke aanwezigheid van pathogene micro-organismen afkomstig uit fecaliën. Daarom is het belangrijk om de microbiologische waterkwaliteit te monitoren zodat bij waarnemen van fecale verontreiniging direct actie kan worden ondernomen. De beste manier om de microbiologische waterkwaliteit te bepalen is de aanwezigheid van alle fecale pathogene micro-organismen in het water te meten. In de praktijk is dit echter niet uitvoerbaar omdat (i) de diversiteit aan fecale pathogene micro-organismen erg hoog is, (ii) sommige van deze pathogenen al risicovol kunnen zijn bij zeer lage (niet detecteerbare) aantallen, (iii) voor sommige pathogene micro-organismen geen methode voor handen is om ze aan te tonen en (iv) voor andere pathogene de methoden complex zijn, de tijd tot resultaat lang is en de kosten hoog zijn. Deze bezwaren hebben er voor gezorgd dat er onderzoek is verricht naar fecale indicatororganismen die aantonen of water fecaal verontreinigd is.

Een ideaal fecaal indicatororganisme moet (6):

- alleen aanwezig zijn wanneer fecale pathogene organismen aanwezig zijn.
- voorkomen in veel hogere aantallen dan de pathogene organismen.
- meer resistent zijn tegen het watermilieu en desinfecterende middelen dan de pathogene organismen.
- snel en eenvoudig te detecteren zijn.
- makkelijk te bevestigen zijn.
- willekeurig verdeeld zijn in het te onderzoeken monster, of gemakkelijk uniform verdeelt te krijgen in het monster.
- niet geremd worden door andere organismen in het monster.

De meest gebruikte indicatororganismen die wereldwijd worden toegepast om fecale verontreiniging van water op te sporen zijn: bacteriën die behoren tot de coligroep, *Escherichia coli*, enterococci, sulfietreducerende clostridia en F-specifieke en somatische colifagen (20, 50). De bacteriële indicatororganismen worden gebruikt als indicatie voor fecale bacteriële pathogenen, terwijl de colifagen worden gebruikt als indicatie voor fecale virale pathogenen. De toegepaste indicatororganismen voldoen echter niet aan alle wensen van een ideaal fecaal indicatororganisme. Zo is bijvoorbeeld aangetoond dat bacteriën die tot de coligroep behoren, kunnen groeien in mariene en zoetwatermilieus wanneer predatoren zijn geremd (11), terwijl andere onderzoekers hebben laten zien dat *E. coli* kan groeien in natuurlijke watermilieus (12, 19, 44). Ook enterococci zijn in staat om zich in watermilieus te vermeerderen en kunnen er zelfs van nature in voorkomen (12, 15). Tot slot is er een controverse om sulfietreducerende clostridia te gebruiken als indicatororganisme, vanwege de hoge persistentie in het milieu (15, 47).



Naast het aantonen van fecale besmetting is ook bestudeerd of de hierboven genoemde indicatororganismen gebruikt kunnen worden om de fecale besmettingsbron te duiden (humaan versus dierlijk). Er is onderzocht of de besmettingsbron bepaald kan worden aan de hand van de ratio tussen aantallen aanwezige bacteriën van de coligroep en enterococcen (16, 41), door middel van genotypering van *E. coli* (10, 14, 21, 26, 46) of door antibioticaresistentiepatronen te bepalen van bacteriën van de coligroep of enterococcen (27, 31, 52). De ratio tussen aantallen bacteriën van de coligroep en enterococcen bleek echter een onbetrouwbare maat om de besmettingsbron vast te stellen (7). Antibioticaresistentiepatronen van enterococcen classificeerde 64 tot 78% van de geïsoleerde enterococcen in de 4 juiste groepen (fecaliën van mens, groot vee, pluimvee en wild; 52). Genotypering van *E. coli* resulteerde in juiste classificatie van 78 tot 100% van de watermonsters (10, 14, 21) en lijkt de meeste potentie van deze drie methoden te hebben. Er kan echter geconcludeerd worden dat geen van deze methoden de fecale verontreiniging met 100% zekerheid toe kan kennen aan de juiste bron, wat een andere tekortkoming is van de hierboven beschreven indicatororganismen.

Tabel 1.1 De dominante groepen bacteriën in humane feces in Nederland en hun relatieve aantal ten opzichte van de totale bacteriële fecale flora. Uit 33

Groep	Percentage
<i>Clostridium coccooides/Eubacterium rectale</i>	30.9 ± 10.1
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	17.6 ± 6.6
<i>Bacteroides spp.</i>	9.5 ± 5.6
<i>Ruminococcus bromii</i>	4.8 ± 4.6
<i>Bifidobacterium spp.</i>	3.6 ± 2.6
<i>Atopobium spp.</i>	2.6 ± 2.6
<i>Clostridium viride</i>	2.6 ± 1.9
<i>Veilonella spp.</i>	2.5 ± 1.3
<i>Eubacterium cylindroides</i>	1.7 ± 2.3
<i>Lactobacillus/Enterococcus</i>	1.4 ± 0.9
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	1.0 ± 1.1
<i>Enterobacteriaceae</i> (inclusief <i>E. coli</i> )	0.1 ± 0.1

In Tabel 1.1 zijn de relatieve aantallen van de verschillende groepen micro-organismen weergegeven die in humane feces voorkomen. Uit deze tabel blijkt dat het huidige indicatororganisme *E. coli* slechts een zeer kleine fractie is (~0.1%) van de totale fecale bacteriële populatie. Obligaat anaërobe bacteriën zoals *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Faecalibacterium prausnitzii* en *Clostridium clostridiiforme* (behorende tot de *C. coccooides* groep) zijn het meest dominant in humane feces (3, 23, 25, 33, 49, 51, 53). Er bestaat een gereede kans dat een fecale verontreiniging langer detecteerbaar is wanneer één van de dominante fecale bacteriën als indicatororganisme wordt gebruikt. Het gebruik van deze dominante oblige anaërobe bacteriën als fecaal indicatororganisme stuitte in het verleden op bezwaar omdat deze bacteriën

zuurstofgevoelig zijn en daardoor moeilijk te kweken in het laboratorium. De recente era van moleculaire biologie biedt nieuwe mogelijkheden om moeilijk of niet te kweken micro-organismen aan te tonen. Recent is er dan ook een aantal studies verschenen waarin is onderzocht of alternatieve indicatororganismen in combinatie met moleculaire technieken gebruikt kunnen worden om fecale verontreiniging in water aan te tonen (4, 7, 17, 29, 30, 39).

## 1.2 *Bacteroides spp.*

Post et al. (40) waren de eerste die postuleerde om *Bacteroides spp.* als fecaal indicatororganisme te gebruiken. Vervolgstudies lieten zien dat bacteriën die behoren tot de *Bacteroides fragilis* groep specifiek aangetoond kunnen worden uit watermonsters met behulp van een selectief medium (1, 2). Wel werden vals-positieve kolonies waargenomen op het selectieve agarmedium en moesten aparte labfaciliteiten voor anaëroob kweken aanwezig zijn om de bacteriën te kunnen kweken.

Meer recent zijn er PCR-protocollen ontwikkeld die specifiek *Bacteroides spp.* kunnen aantonen in watermonsters (3, 4, 9, 13, 48). Hierbij zijn er zowel primers ontwikkeld die alle *Bacteroides*-soorten amplificeren alsook primersequenties die *Bacteroides*-soorten amplificeren die specifiek voorkomen in een bepaalde diersoort (inclusief de mens). Wanneer de primersequenties voor mens- en/of dierspecifieke *Bacteroides*-soorten succesvol zijn dan is het gebruik van deze primers niet alleen een indicatie voor fecale verontreiniging maar kan ook de bron van de fecale verontreiniging worden geduid. In een vervolgstudie is onderzocht wat de persistentie van DNA van *Bacteroides distasonis* is in het watermilieu (30). Uit deze studie kwam naar voren dat bij lage temperaturen (4°C) *Bacteroides distasonis* ten minste 14 dagen gedetecteerd kon worden; bij 28°C was dit slechts 1 dag.

## 1.3 *Bifidobacterium spp.*

Mossel (38) was de eerste die voorstelde om *Bifidobacterium spp.* als indicatororganisme te gebruiken. Net als *Bacteroides spp.* komen bifidobacteriën voor in hoge aantallen in feces van mens en dier (22, 32, 37). Selectieve agarmedia zijn vervolgens ontwikkeld om *Bifidobacterium spp.* aan te tonen in watermilieus (8, 43). Tevens is een selectief agarmedium ontwikkeld om een huamspecifieke *Bifidobacterium*-soort specifiek te kunnen kweken (36), wat het mogelijk maakt om water verontreinigd met humane fecaliën te traceren. De ontwikkelde agarmedia waren echter niet selectief genoeg en veel vals-positieve kolonies werden waargenomen op de agarplaten (45). Ook moeten voor *Bifidobacterium spp.* aparte labfaciliteiten voor het anaëroob kweken aanwezig zijn, wat een andere beperking is. De overleving van kweekbare bifidobacteriën in het watermilieu is kort; na 10 tot 24 uur waren ze niet meer detecteerbaar (34, 35). Door al deze beperkingen worden kweekbare bifidobacteriën niet gebruikt als fecaal indicatororganisme.

Net als bij *Bacteroides spp.* gelden de genoemde beperkingen mogelijk niet wanneer gebruik wordt gemaakt van moleculaire technieken. *Bifidobacterium spp.* wordt aangetoond door gebruik te maken van fluorescentie *in situ* hybridisatie (FISH) met genus- en soortspecifieke probes of door gebruik te maken van PCR-technieken met genus- en soortspecifieke primers (7, 22, 28, 32, 37, 39, 42). De meeste van deze studies bestudeerden de aantallen bifidobacteriën die aanwezig zijn in menselijke en dierlijke feces. Een opmerkelijk resultaat uit deze studies was dat sommige *Bifidobacterium*-soorten alleen voorkomen in menselijke feces en niet in dierlijke feces en omgekeerd. De mensspecifieke *Bifidobacterium*-soorten hebben dan ook potentie als indicatororganisme voor humaan fecale verontreiniging.

Nebra et al. (39) ontwikkelden probes voor de mensspecifieke *Bifidobacterium dentium* en voor verschillende *Bifidobacterium*-soorten die specifiek zijn voor dieren. Deze probes werden vervolgens getest op monsters van menselijke en dierlijke feces en op monsters van menselijk en dierlijk afvalwater. De probe voor dierlijke *Bifidobacterium*-soorten was niet succesvol, maar de probe voor *B. dentium* hybridiseerde met 25 van de 27 monsters uit menselijk afvalwater. Meer recent is een nested-PCR methode ontwikkeld waarmee het 16S rRNA gen van *B. dentium* en *Bifidobacterium adolescentis* (ook een mensspecifieke *Bifidobacterium*-soort) kan worden geamplificeerd (7). Wanneer dit PCR-protocol werd toegepast op DNA uit verschillende afvalwatermonsters dan werd er een PCR-product verkregen met alle monsters van menselijk afvalwater terwijl bijna alle monsters van dierlijk afvalwater negatief testte; alleen afvalwater van één pluimveeslachterij testte positief.

#### 1.4 Andere fecale indicatororganismen

De hypothese dat *Bacteroides spp.* en *Bifidobacterium spp.* goede indicatorbacteriën voor fecale verontreiniging zijn, werd gesteld omdat beide bacteriën in veel hogere aantallen in fecaliën voorkomen dan de traditionele indicatororganismen (Tabel 1.1; 25, 33, 40). Recente karakterisatie van de dominante microflora in menselijke feces heeft aangetoond dat andere bacteriën zoals *Faecalibacterium prausnitzii* en *Clostridium clostridiiforme* ook in hoge aantallen aanwezig zijn (3, 23, 33) en er is geopperd dat deze bacteriën ook potentie hebben als indicatororganisme voor fecale verontreiniging (51). Tot nu toe zijn er echter nog geen studies verschenen over het voorkomen van deze bacteriën in verschillende watermilieu's.

#### 1.5 Doel

Uit bovenbestaande beschouwing blijkt dat *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.* of andere obligaat anaërobe bacteriën die dominant aanwezig zijn in fecaliën potentie hebben als fecaal indicatororganisme. Het doel van de onderhavige studie was te onderzoeken of de moleculaire methoden, voor de detectie van alternatieve indicatororganismen, kunnen worden toegepast om fecale verontreiniging in water aan te tonen. Daarnaast werd onderzocht of met alternatieve indicatororganismen ook de bron van de fecale verontreiniging kan worden geduid. En als laatste werd onderzocht hoe lang

alternatieve indicatororganismen gedetecteerd kunnen worden in fecaal verontreinigd oppervlakte- en leidingwater en hoe deze detectietijd zich verhoudt tot de detectietijd van het traditionele indicatororganisme *E. coli*.



## 2 Vergelijking van methoden voor de detectie van verschillende indicatororganismen in water

### 2.1 PCR-reacties

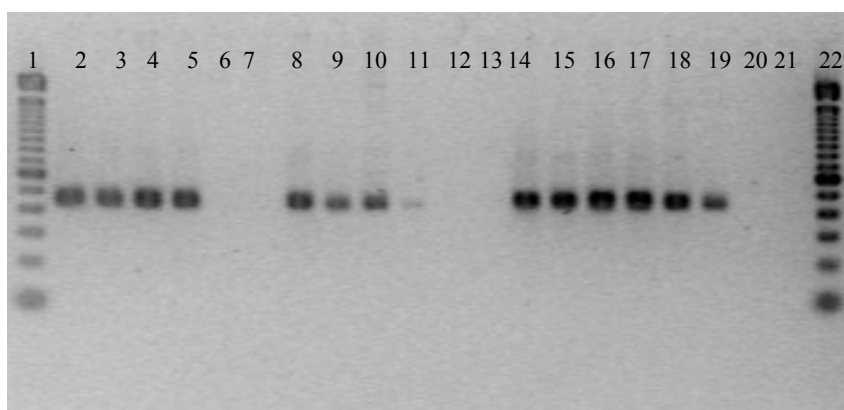
In de eerste fase van onze studie werd onderzocht of de in de literatuur beschreven specifieke PCR-primers en PCR-reacties voor verschillende alternatieve fecale indicatororganismen resulteerde in de succesvolle detectie van het indicatororganisme in verscheidene watermonsters. De onderzochte watermonsters waren: influent en effluent van de rioolwaterzuiveringsinstallatie (RWZI) Houten, oppervlaktewater uit het Lekkanaal, oppervlaktewater uit het spaarbekken bij Loenen, oppervlaktewater uit het spaarbekken van de Brabantse Biesbosch en twee watermonsters uit het rundveeslachthuis te Oudewater (één watermonster uit de wachtruimte waar de levende dieren tijdelijk worden gestald, en één watermonster uit de slachthal). Van elk monster werd een bepaald volume water gefiltreerd: 2 ml van het rioolinfluent en de watermonsters uit het slachthuis; 50 ml van het riooleffluent en het Lekkanaalwater ; 100 ml van de watermonsters uit de twee spaarbekkens. Alle monsters werden gefiltreerd over een 0.2 µm polycarbonaatfilter. Uit de filters werd daarna het DNA geïsoleerd met behulp van de FastDNA spin kit (QBio-Gene, USA) volgens het protocol van de leverancier.

Voor de alternatieve fecale indicatororganismen *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Faecalibacterium prausnitzii* en *Clostridium clostridiiforme* zijn specifieke primers beschreven in de literatuur (Tabel 2.1). Zes primerparen zijn beschreven voor *Bacteroides*; twee daarvan zijn specifiek voor *Bacteroides spp.* (*spp.* betekent alle *Bacteroides*-soorten), drie zijn specifiek voor huamanspecifieke *Bacteroides*-soorten en één primerpaar is specifiek voor rundveespecifieke *Bacteroides*-soorten. Vier primerparen zijn beschreven om bifidobacteriën aan te tonen: twee voor *Bifidobacterium spp.*, één voor *Bifidobacterium adolescentis* (huamanspecifieke soort) en één primerpaar voor *Bifidobacterium dentium* (huamanspecifieke soort). Ten slotte is er een primerpaar voor *F. prausnitzii* en een primerpaar voor *C. clostridiiforme* gepubliceerd. In onze studie zijn de primers beschreven in Tabel 2.1 getest op het geïsoleerde DNA van zeven watermonsters. Het DNA werd hierbij geamplificeerd met het volgende PCR-programma: 5 min 95°C; 35 cycli met 1 min 94°C, 1 min 53, 55, 58 of 60°C (afhankelijk van het primerpaar), 2 min 72°C; en ten slotte 7 min 72°C. Nadien werd zowel de aanwezigheid van een PCR-product als de grootte van het PCR-product gecontroleerd met behulp van agarosegelelektroforese.

Tabel 2.1 Primersequenties van de onderzochte alternatieve fecale indicatororganismen.

Organisme	Primernaam	Primersequentie	Referentie
<i>Bacteroides spp.</i>	Bac32F	AACGCTAGCTACAGGCTTAACA	(13)
	Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG	
<i>Bacteroides spp.</i>	Bac303F	GAAGGTCCCCACATTG	(3)
	Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG	
Humaanspecifieke <i>Bacteroides</i> stam	HF183F	ATCATGAGTTCACATGTCCG	(48)
	HF183R	TACCCCGCCTACTATCTAATG	
Humaanspecifieke <i>Bacteroides</i> stam	HF183F	ATCATGAGTTCACATGTCCG	(4, 48)
	Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG	
Humaanspecifieke <i>Bacteroides</i> stam	B.thetaF	AACAGGTGGAAGCTGCCGA	(9)
	B.thetaR	AGCCTCCAACCGCATCAA	
Rundveespecifieke <i>Bacteroides</i> stam	CF128F	CCAACYTCCCGWTACTC	(4)
	Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG	
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Im 26	GATTCTGGCTCAGGATGAACG	(28, 39)
	Im 3	CGGGIGCTCCCACITTCATG	
<i>Bifidobacterium spp.</i>	TAQfor	GCGTCCGCTGTGGGC	(42)
	TAQrev	CTTCTCCGGCATGGTGTG	
<i>B. adolescentis</i>	Bi-Ado1	CTCCAGTTGGATGCATGT	(7)
	Bi-Ado2	CGAAGGTTGCTCCCAGT	
<i>B. dentium</i>	Bi-Den1	ATCCCGGGGGTTCGCCT	(7)
	Bi-Den2	GAAGGGCTTGCTCCCGA	
<i>F. prausnitzii</i>	Fprau223F	GATGGCCTCGCGTCCGATTAG	(3)
	Fprau420R	CCGAAGCCTTCTTCCTCC	
<i>C. clostridiiforme</i>	Cclos99F	AATCTTGATTGACTGAGTGGCGGAC	(3)
	Cclos247R	CCATCTCACACTACCGGAGTTTTTC	

In de PCR-reactie wordt een stukje DNA dat specifiek is voor een organisme of groep van organismen exponentieel vermeerderd zodat het na de PCR-reactie in hoge concentratie aanwezig is. Vervolgens kan dit specifieke stukje DNA zichtbaar worden gemaakt op een agarosegel met behulp van een kleurstof die bindt aan het DNA. Een specifieke PCR-reactie is succesvol verlopen wanneer er een PCR-product is gevormd met één grootte die overeenkomt met de verwachte grootte. Een PCR-product met verschillende grootte of met een andere grootte dan verwacht geeft aan dat een ander stukje DNA dan gewenst is geamplificeerd. Dit ander stuk DNA is (vaak) afkomstig van andere micro-organismen en betekent dus dat niet het gewenste organisme is aangetoond. In Figuur 2.1 is een agarosegel weergegeven waarin de PCR-producten te zien zijn als een zwart bandje. De PCR-producten in Figuur 2.1 werden verkregen met de specifieke primers voor *Bacteroides spp.* (Bac303F en Bac708R). In dit geval is in elke reactie één PCR-product ontstaan met een grootte van ongeveer 400 basenparen wat in overeenstemming is met de verwachting. Geconcludeerd wordt dat deze PCR-reactie succesvol is verlopen.



Figuur 2.1 Agarosegel met de producten van de *Bacteroides* spp. (primers Bac303F en Bac708R) gevisualiseerd. Laan 1 en 22, DNA-marker; laan 2 en 3, influent riool; laan 4 en 5, effluent riool; laan 6 en 7, blanco's; laan 8 en 9, spaarbekken Loenen; laan 10 en 11, spaarbekken Biesbosch; laan 12 en 13, blanco's; laan 14 en 15, slachthal runderslachterij; laan 16 en 17, wachtruimte runderslachterij; laan 18 en 19, Lekkanaal; laan 20 en 21 blanco's.

Voor elk van de primerparen van Tabel 2.1 is nagegaan of de verschillende watermonsters resulteerden in een PCR-product van één grootte en of de grootte van het PCR-product overeenkwam met de verwachting (Tabel 2.2). Het doel hierbij was om te bepalen welke primerparen succesvol lijken in de detectie van alternatieve fecale indicatororganismen in verschillende watermonsters. Hierbij werden de resultaten niet gesplitst naar ieder afzonderlijk watermonster, maar wanneer de PCR-reactie op het DNA van één van de watermonsters resulteerde in een PCR-product met verschillende grootte of in een product met een niet-verwachte grootte dan werd dat resultaat weergegeven. Primerparen die resulteerden in een PCR-product met verschillende groottes of met een niet verwachte grootte kunnen niet gebruikt worden om alternatieve fecale indicatororganismen aan te tonen in watermonsters.

Uit Tabel 2.2 blijkt dat zes van de twaalf onderzochte primerparen resulteerden in PCR-producten van verschillende groottes bij ten minste één van de watermonsters en deze kunnen dus niet worden toegepast om fecale indicatororganismen in water aan te tonen. De overige zes primerparen resulteerden wel in PCR-producten met één grootte en de grootte van ieder PCR-product was ook volgens verwachting. Met de primers HF183F en HF183R wordt de huamspecifieke *Bacteroides*-stam HF183 gedetecteerd. De PCR-reactie met de primers HF183F en HF183R resulteerde in een PCR-product van één grootte maar de hoeveelheid gevormd PCR-product was laag. Met de primers HF183F en Bac708R wordt ook stam HF183 gedetecteerd en de PCR-reactie met deze primers resulteerde in een hoge concentratie PCR-product. Het primerpaar HF183F en HF183R is dus minder geschikt dan het primerpaar HF183F en Bac708R om de huamspecifieke *Bacteroides*-stam HF183 in water te detecteren.



Tabel 2.2 Resultaten van de PCR-reacties met primerparen voor verschillende alternatieve indicatororganismen.

Indicatororganisme	Primers	Grootte PCR-product		Correcte grootte
		Één	Meerdere	
<i>Bacteroides spp.</i>	Bac303F-708R	+		+
<i>Bacteroides spp.</i>	Bac32F-708R		+	+/-
Humane <i>Bacteroides</i> -stam	HF183F-183R	+/-		+
Humane <i>Bacteroides</i> -stam	HF183F-Bac708R	+		+
Humane <i>Bacteroides</i> -stam	B.thetaF-R		+	+/-
Rund <i>Bacteroides</i> -stam	CF128F-Bac708R	+		+
<i>Bifidobacterium spp.</i>	lm26-lm3	+		+
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Taqfor-rev		+	+/-
<i>B. adolescentis</i>	Bi-Ado1-2		+	+/-
<i>B. dentium</i>	Bi-Den1-2		+	+/-
<i>F. prausnitzii</i>	Fprau223F-420R	+		+
<i>C. clostridiiforme</i>	Cclos99F-247R		+	+/-

Op basis van de PCR-resultaten lijken vijf van de in totaal twaalf onderzochte primerparen geschikt om alternatieve fecale indicatororganismen in watermonsters te detecteren. Met behulp van de vijf primerparen wordt een stuk van het 16S rRNA gen geamplificeerd. Dit gen komt voor in alle bacteriën en bevat stukken waar de basenparenvolgorde van het DNA weinig varieert tussen bacteriën en stukken waar de basenpaarvolgorde van het DNA een hoge variatie heeft. De primersequenties van de vijf overgebleven primerparen hechten zich specifiek aan het DNA in de variabele stukken van het 16S rRNA gen, waardoor in de PCR specifiek een groep bacteriën (bijvoorbeeld alle *Bacteroides*-soorten) wordt aangetoond. Deze methode is echter alleen succesvol wanneer de primersequenties zich enkel hechten aan 16S rDNA moleculen van een specifieke groep bacteriën (zoals alle *Bacteroides*-soorten). Wanneer de primersequenties zich ook hechten aan 16S rDNA moleculen van bacteriën die niet tot de specifieke groep behoren, dan resulteert dit in een vals-positief PCR-product. We hebben daarom onderzocht of de DNA-sequentie van de PCR-producten, die verkregen zijn met de vijf overgebleven primerparen, ook daadwerkelijk behoren tot het indicatororganisme dat ermee gedetecteerd dient te worden.

De DNA-sequentie van PCR-producten wordt verkregen door middel van kloneren en sequencen. Bij het kloneren wordt één 16S rDNA molecuul in een plasmide (circulair DNA) ingebouwd. Dit plasmide wordt vervolgens in *E. coli* vermeerderd zodat een hele hoge plasmideconcentratie van dat ene 16S rDNA molecuul wordt verkregen. Vervolgens worden de plasmiden geïsoleerd en wordt de sequentievolvergorder van het 16S rDNA molecuul bepaald met een sequence-apparaat. In onze studie werden de vijf verschillende PCR-producten met behulp van een plasmide gekloneerd in *E. coli*. Per PCR-product werden vervolgens tien verschillende *E. coli* kolonies geselecteerd die elk een plasmide hadden met een ander 16S rDNA molecuul. Deze plasmiden werden

geïsoleerd en nadien werd van elk 16S rDNA molecuul de sequentievолgorde bepaald. De zo verkregen sequenties werden vergeleken met DNA sequenties die in de wereldwijde database GenBank zijn opgeslagen om te bepalen van welk micro-organisme de DNA-sequentie afkomstig was.

De resultaten laten zien dat de sequenties verkregen met de primerparen voor *Bacteroides* (Bac303F-Bac708R; HF183F-Bac708R; CF128F-Bac708R) de hoogste overeenkomst hadden met sequenties in de GenBank-database die behoorden tot de *Bacteroides*. De sequenties verkregen met het primerpaar voor bifidobacteriën (Im26-Im3) matchten voor een gedeelte met sequenties van *Bifidobacterium*-soorten, maar een groot gedeelte van de sequenties kwam overeen met andere bacteriesoorten die geen fecale herkomst hebben. De sequenties die verkregen werden met het primerpaar voor *F. prausnitzii* kwamen niet overeen met sequenties van *F. prausnitzii*; over het algemeen waren de meest gelijkende sequenties in de Genbank database afkomstig van bacteriën die normaal in het watermilieu voorkomen en geen relatie hebben met fecaliën. Uit deze resultaten wordt duidelijk dat alleen de drie primerparen voor *Bacteroides* daadwerkelijk het gewenste organisme oppikte, terwijl de primerparen voor bifidobacteriën en *F. prausnitzii* ook 16S rRNA genen van andere niet-fecale bacteriën amplificeerden. De laatste twee primerparen zijn dan ook onbetrouwbaar om alternatieve fecale indicatororganismen in water mee aan te tonen.

De primerparen voor *F. prausnitzii* en *C. clostridiiforme* zijn tot nu toe alleen getest op materiaal uit het maagdarmkanaal of feces van mens en dier (3). Ook het primerpaar Bac32F en Bac708R voor *Bacteroides spp.* (13) en de primerparen voor *Bifidobacterium spp.*, *B. adolescentis* en *B. dentium* (28, 39) zijn alleen getest op fecale monsters van verschillende dieren of op monsters uit de rioolzuivering of slachthuizen van verschillende dieren. In fecale monsters zijn deze bacteriën dominant aanwezig, terwijl ze in watermilieus slechts een klein percentage van de bacteriële flora beslaan. Dit verschil kan er de oorzaak van zijn dat de primers niet specifiek hechten aan het DNA van *F. prausnitzii* en *C. clostridiiforme* in de watermonsters. De niet succesvolle primerparen voor *Bacteroides* en bifidobacteriën zijn echter wel getest op monsters uit verschillende waterecosystemen. Het primerpaar HF183F en HF183R, waarmee *Bacteroides*-stam HF183 wordt aangetoond, gaf een PCR-product met DNA geïsoleerd uit het influent en effluent van de RWZI. De hoeveelheid PCR-product was echter laag en in de alle andere watermonsters werd helemaal geen PCR-product waargenomen. Tot nu toe is het primerpaar HF183F en HF183R alleen getest op oppervlaktewater waaraan feces of rioolwater is toegevoegd, maar het is nooit getest op oppervlaktewater alleen (48). We concluderen uit onze studie dat het primerpaar HF183F en HF183R alleen succesvol is bij hoge aantallen *Bacteroides* HF183. Daarom is besloten om ook dit primerpaar niet verder te bestuderen. Ten slotte is het primerpaar B.thetaF en B.thetaR voor een humaan specifieke *Bacteroides*-soort wel succesvol getest op watermonsters genomen in een rivier benedenstrooms van een rioolwaterzuiveringsinstallatie in de Verenigde Staten (9). Het verschil in resultaten met dit primerpaar wordt misschien veroorzaakt door geografische

verschillen (Verenigde Staten versus Nederland) of omdat het water in de Verenigde Staten zwaar fecaal besmet was.

## 3 De aanwezigheid van *Bacteroides* in verscheidene watermonsters

### 3.1 Resultaten PCR-reacties

Van de oorspronkelijk twaalf geteste primerparen blijven er dus drie over die in staat zijn om specifiek het DNA van het alternatieve fecale indicatororganisme te amplificeren. Alledrie de primerparen amplificeren een stukje DNA van *Bacteroides*-soorten. Eén primerpaar amplificeert het DNA van alle (tot nu toe bekende) *Bacteroides*-soorten, één primerpaar het DNA van de huamspecifieke *Bacteroides* HF183 en het laatste primerpaar amplificeert het DNA van de rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen CF123. Alle *Bacteroides*-soorten die tot nu toe zijn geïsoleerd en beschreven in de literatuur werden geïsoleerd uit fecaliën van mens en warmbloedige dieren. De *Bacteroides*-soorten hebben daarom een optimumtemperatuur voor groei die tussen de 35°C en 40°C ligt, terwijl ze zijn niet in staat om te groeien onder een temperatuur van 25°C. Tevens zijn alle tot nu toe geïsoleerde *Bacteroides*-soorten obligaat anaëroob en zijn daardoor niet in staat te groeien wanneer zuurstof aanwezig is. Hierdoor is het vrijwel uitgesloten dat *Bacteroides*-soorten in staat zijn te groeien in Nederlands oppervlaktewater of in leidingwater aangezien deze watertypen oxidisch zijn en/of een te lage temperatuur hebben. De aanwezigheid van DNA van *Bacteroides* in water duidt daarom dus duidelijk op een fecale verontreiniging.

Monsters uit de RWZI en de rundveeslachterij waren positief met het primerpaar voor *Bacteroides* spp. (Tabel 3.1). Het DNA van *Bacteroides*-stam HF183 werd gedetecteerd in het influent en effluent van de RWZI maar niet in het afvalwater van de rundveeslachterij. Daarentegen werd het DNA van de rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen CF123 gedetecteerd in watermonsters uit het rundveeslachthuis, maar niet in monsters van de RWZI (Tabel 3.1). We concluderen uit deze resultaten dat de mensspecifieke soorten inderdaad niet voorkomen in runderen, terwijl de rundveespecifieke soorten niet voorkomen in mensen. Het is echter nog te vroeg om te stellen dat beide primerparen inderdaad DNA amplificeren van *Bacteroides*-soorten die specifiek zijn voor mensen of rundvee. Om die vraag te beantwoorden moeten beide primerparen in de toekomst worden getest op DNA geïsoleerd uit afvalwater van andere slachthuizen (varkens, pluimvee, paarden en schapen), fecale monsters van wilde dieren (bv watervogels) en op monsters uit andere RWZI's en rundveeslachthuizen.

Tabel 3.1 De detectie van *Bacteroides* spp, *Bacteroides* HF183 en *Bacteroides* CF123 in verscheidene watermonsters.

Primerpaar	Indicatororganisme	Rioolwater		Runderslachterij	
		Influent	Effluent	Wachthal	Slachthal
Bac303F-708R	<i>Bacteroides</i> spp.	+	+	+	+
HF183F-Bac708R	<i>Bacteroides</i> -stam HF183	+	+	-	-
CF128F-Bac708R	<i>Bacteroides</i> -stammen CF123	-	-	+	+
Primerpaar	Indicatororganisme	Oppervlaktewater			
		Lekkanaal	Loenen	Biesbosch	
Bac303F-708R	<i>Bacteroides</i> spp.	+	+	+	
HF183F-Bac708R	<i>Bacteroides</i> -stam HF183	+	-	-	
CF128F-Bac708R	<i>Bacteroides</i> -stammen CF123	-	-	-	

In de watermonsters uit het Lekkanaal en uit de spaarbekken van Loenen en de Biesbosch werd DNA van *Bacteroides* spp. gedetecteerd (Tabel 3.1). Alledrie de oppervlaktewatermonsters waren dus fecaal verontreinigd. Met het primerpaar voor de huamspecifieke *Bacteroides*-stam HF183 werd een PCR-product verkregen met het DNA geïsoleerd uit het Lekkanaalwater, terwijl geen PCR-product werd verkregen met het DNA geïsoleerd uit het water van de twee spaarbekken (Tabel 3.1). Alledrie de oppervlaktewatermonsters waren negatief voor de rundveespecifieke *Bacteroides* CF123 (Tabel 3.1). Dit betekent dat de fecale bron die (mede) verantwoordelijk is geweest voor de fecale verontreiniging van het Lekkanaal humaan van oorsprong was. Het Lekkanaal staat in open verbinding met de Lek en het Amsterdam-Rijnkanaal. In een straal van 5 kilometer rond het Lekkanaal lozen twee RWZI's hun gezuiverd afvalwater in de Lek en het Amsterdam-Rijnkanaal. Waarschijnlijk waren deze twee RWZI's dan ook verantwoordelijk voor de fecale verontreiniging van het kanaal. Dit is echter niet de enige bron van verontreiniging; andere bronnen zijn ook verantwoordelijk voor de fecale verontreiniging van het Lekkanaal (37a). We kunnen niet concluderen dat de oppervlaktewatermonsters die positief testte voor *Bacteroides* spp. maar negatief voor *Bacteroides* HF183 besmet waren met een niet-humane bron. Naast huamspecifieke *Bacteroides*-soorten bevatten menselijke fecaliën namelijk ook *Bacteroides*-soorten die niet huamspecifiek zijn. Een eerdere studie heeft laten zien dat de huamspecifieke *Bacteroides*-soorten die met primers HF183F en Bac708R werden gedetecteerd ongeveer 10% van de totale *Bacteroides*-populatie in het influent van rioolwater besloegen (4). Het is dus mogelijk dat het DNA van *Bacteroides* HF183 al in het water is afgebroken, terwijl het DNA van de dominante humane *Bacteroides*-soorten nog aanwezig is. Ook werd waargenomen dat niet alle mensen *Bacteroides*-stam HF183 bij zich dragen. Dezelfde redenering geldt ook voor de detectie van rundveespecifieke *Bacteroides*-soorten. We concluderen dat alledrie de oppervlaktewatermonsters fecaal besmet waren en dat de bron of één van de bronnen in het Lekkanaal van humane herkomst was. Voor de twee spaarbekkenmonsters kon niet worden achterhaald wat de fecale bron van de verontreiniging was.

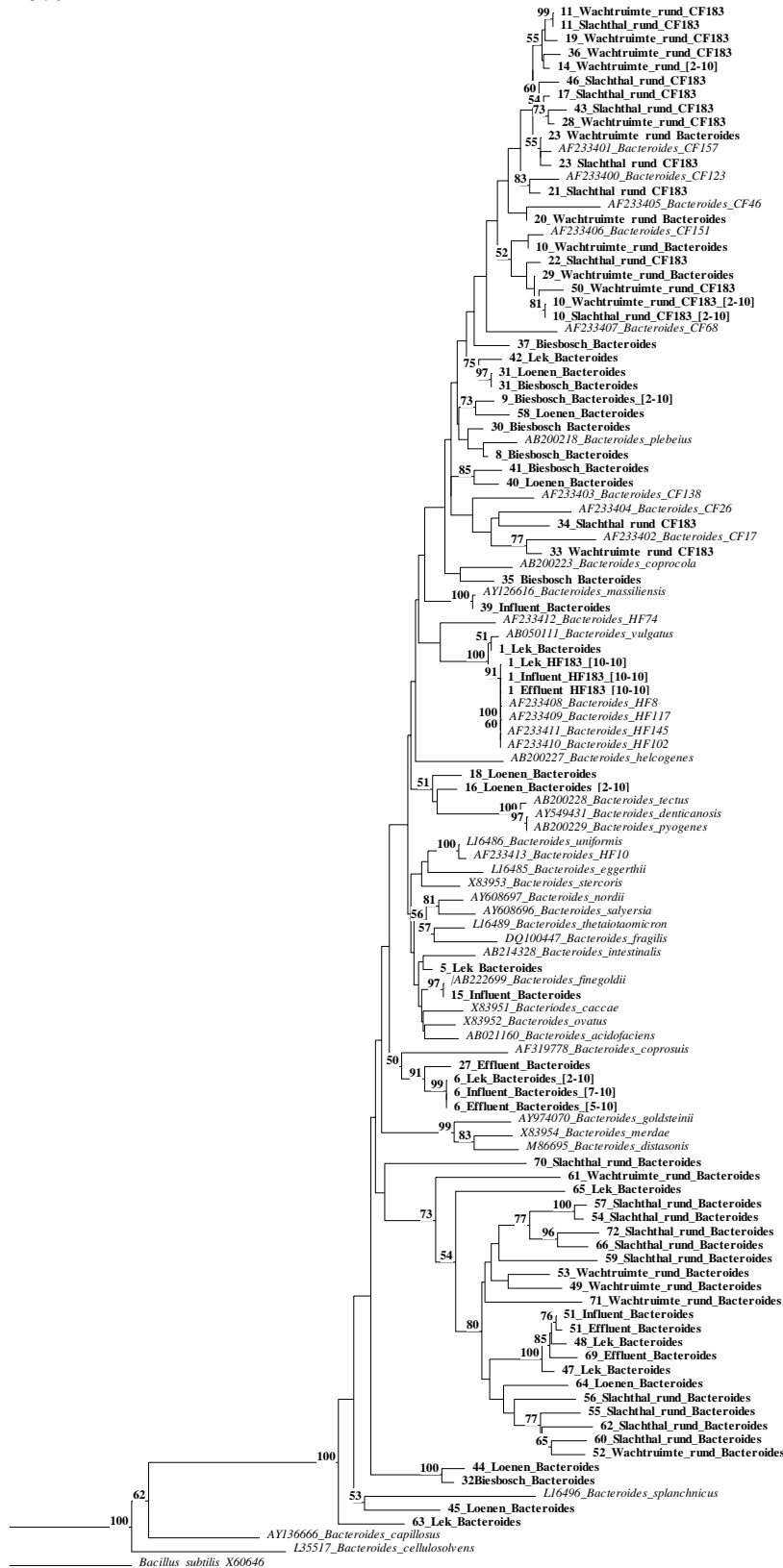
### 3.2 Sequentieanalyse

De PCR-producten verkregen met de primers voor *Bacteroides spp.*, *Bacteroides* HF183 en *Bacteroides* Cf123 werden gekloneerd in *E. coli*, waarna de DNA-sequentie werd bepaald (zie hoofdstuk 2). Per monster werden er acht tot tien sequenties bepaald en door de sequenties onderling te vergelijken werden het aantal operational taxonomic units (OTUs) bepaald. Sequenties behoorden tot één OTU wanneer de DNA-volgorde van de sequenties 99% of meer met elkaar overeenkwam. In Tabel 3.2 is het aantal geanalyseerde sequenties en OTUs weergegeven. Het aantal OTU's voor *Bacteroides spp.* sequenties was lager in rioolwater dan in oppervlaktewater of afvalwater uit de rundveeslachterij. Het oppervlaktewater bevatte dus een grotere diversiteit aan *Bacteroides*-stammen dan het influent en effluent van de RWZI. Een mogelijke oorzaak hiervoor is dat water van de RWZI fecaliën van humane oorsprong bevatte, terwijl het oppervlaktewater misschien feces van humane en dierlijke oorsprong bevatte. Wanneer de fecale verontreiniging van meerdere bronnen afkomstig is, is de kans op een hogere diversiteit aan *Bacteroides*-stammen ook groter, omdat een aantal *Bacteroides*-stammen mens- of dierspecifiek zijn. Toch kunnen fecaliën van één diersoort ook een grote verscheidenheid aan *Bacteroides*-stammen hebben, gezien het grote aantal verschillende *Bacteroides*-stammen dat werd opgepikt in afvalwater van de rundveeslachterij (Tabel 3.2). De *Bacteroides* HF183 sequenties behoorden allemaal tot één OTU en dit bevestigt uitkomsten van eerdere studies waarin werd beschreven dat slechts *Bacteroides*-stam HF183 wordt opgepikt met het primerpaar HF183F en Bac708R (4, 5). De rundveespecifieke sequenties behoorden wel tot een groot aantal OTU's en de diversiteit van rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen die wordt opgepikt met primerpaar CF123F en Bac708R is wel groot. Ook in eerdere studies werden meerdere stammen opgepikt met het primerpaar voor *Bacteroides* CF123 (4, 5).

Tabel 3.2 Het aantal onderzochte sequenties en operational taxonomic units (OTU's) van *Bacteroides spp.*, *Bacteroides* HF183 en *Bacteroides* CF123 in de verschillende watermonsters.

Monster	<i>Bacteroides spp.</i>		<i>Bacteroides</i> HF183		<i>Bacteroides</i> CF123	
	Seqs	OTU's	Sequenties	OTU's	Sequenties	OTU's
Influent	10	4	10	1	-	-
Effluent	8	4	10	1	-	-
Lek	9	8	10	1	-	-
Loenen	9	8	-	-	-	-
Biesbosch	9	8	-	-	-	-
Wachtruimte	9	9	-	-	10	8
Slachthal	10	10	-	-	9	8

5%



Figuur 3.1. Fylogenetische boom van *Bacteroides* spp., *Bacteroides*-stam HF183 en *Bacteroides*-stammen CF123 sequenties verkregen in onze studie en sequenties van alle beschreven *Bacteroides*-soorten.

Zeven *Bacteroides spp.* sequenties van het influentmonster behoorden tot één OTU; deze OTU werd tevens gevonden in het effluentmonster (5 sequenties) en in het Lekkanaalmonster (2 sequenties). Deze resultaten impliceren wederom dat het Lekkanaal fecaal besmet was met het effluent van een RWZI. Twee OTU's werden wel in het influent maar niet in het effluent van de RWZI gevonden en omgekeerd werden twee OTU's wel gedetecteerd in het effluent maar niet in het influent. Dit verschil kan veroorzaakt zijn door een populatieverandering in *Bacteroides*-stammen tijdens de zuivering van rioolwater, maar het kan ook veroorzaakt zijn doordat we te weinig klonen hebben gesequenced. Eén OTU werd waargenomen in het spaarbekkenwater van Loenen en de Biesbosch. Dit zou er op kunnen duiden dat een gedeelte van de verontreiniging van dezelfde fecale bron (bv watervogels) afkomstig was. Verder onderzoek is nodig om deze stelling te bewijzen. Alle andere *Bacteroides spp.* OTU's waren monsterspecifiek en werden dus slechts in één monster waargenomen.

De sequenties zijn ook uitgezet in een fylogenetische boom die is gebaseerd op berekende afstanden (mate van overeenkomst) tussen de sequenties (neighbor-joining methode). Naast de sequenties uit onze studie zijn ook de sequenties weergegeven van alle tot nu toe bekende *Bacteroides*-soorten, de huamspecifieke stam *Bacteroides* HF183 en de rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen CF123 en CF151 (Figuur 3.1). Alle *Bacteroides* CF123 sequenties uit onze studie clusterden samen met rundveespecifieke *Bacteroides*-sequenties uit eerdere studies (4, 5). De *Bacteroides* HF183 sequenties uit onze studie clusterden samen met gepubliceerde *Bacteroides*-sequenties die specifiek zijn voor mensen (4, 5). De primerparen voor *Bacteroides* CF123 en *Bacteroides* HF183 resulteerden dus in de verwachte sequenties. Een aantal van de *Bacteroides spp.* sequenties uit het afvalwater van de rundveeslachterij behoorden ook tot *Bacteroides* CF123. Dit betekent dat de rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen CF123 dominant voorkwamen in het afvalwater van de rundveeslachterij in Oudewater. Eén *Bacteroides spp.* sequentie uit het Lekkanaalmonster kwam overeen met de *Bacteroides* HF183 sequentie. De *Bacteroides spp.* sequenties uit het influent en effluent van de RWZI clusterden echter niet samen met *Bacteroides* HF183 sequenties, wat inhoudt dat *Bacteroides* HF183 niet tot de dominante *Bacteroides*-soorten in (on)gezuiverd rioolwater behoorde. Zeven van de negen *Bacteroides spp.* sequenties uit het Lekkanaal clusterden samen met *Bacteroides spp.* uit het influent of effluent, een nieuwe indicatie dat de fecale verontreiniging in het Lekkanaal van humane oorsprong was. De *Bacteroides spp.* sequenties uit het spaarbekken van de Biesbosch en Loenen clusterden niet samen met sequenties uit het influent en effluent van de RWZI en ook niet met sequenties uit het afvalwater van de rundveeslachterij. Het blijft daarom onduidelijk wat de fecale herkomst van de verontreiniging van de spaarbekkens was.





## 4 Detectieperiode van *E. coli*, *Bacteroides spp.* en *Bacteroides* HF183 in watermonsters besmet met rioolwater

### 4.1 Introductie

De geteste PCR-protocollen voor *Bacteroides spp.*, *Bacteroides* HF183 en *Bacteroides* CF123 zijn succesvol toegepast om fecale verontreiniging in watermonsters te detecteren. Omdat de *Bacteroides*-soorten die tot nu toe zijn geïsoleerd allemaal uit feces van warmbloedige dieren komen, heeft *Bacteroides* potentie als fecaal indicatororganisme. Van oudsher wordt *E. coli* gebruikt om fecale verontreiniging in het leidingwater op te sporen en om de kwaliteit van de grondstof in de gaten te houden. Wanneer *E. coli* uit een fecale bron in het watermilieu terechtkomt, sterft het in de tijd af. De periode dat een fecale verontreiniging met *E. coli* wordt gedetecteerd in drinkwater, oppervlaktewater en grondwater is afhankelijk van de aantallen *E. coli* die in de fecale bron aanwezig waren en de snelheid van afsterving in het water. Een alternatief indicatororganisme dat langer detecteerbaar is dan *E. coli* maakt het opsporen en aantonen van een fecale verontreiniging gemakkelijker. Daarom werd onderzocht hoe lang *Bacteroides spp.*, *Bacteroides* HF183 en *E. coli* detecteerbaar waren in watermonsters verontreinigd met het influent van een RWZI.

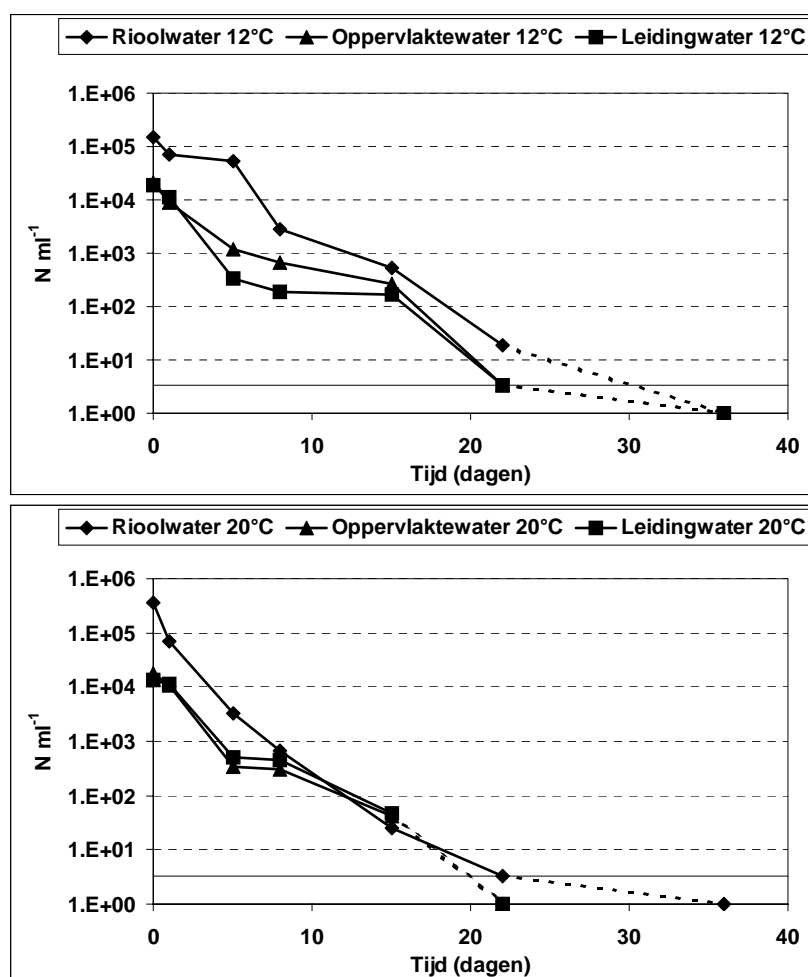
### 4.2 Methode

De detectietijd van indicatororganismen werd onderzocht in influent van RWZI, Lekkanaalwater en leidingwater. Als fecale bron voor het Lekkanaalwater en leidingwater werd influent van de RWZI Houten gebruikt. Hiervan werd in duplo 100 ml toegevoegd aan 900 ml oppervlaktewater uit het Lekkanaal en aan 900 ml leidingwater (getapt uit kraan in het Laboratorium voor Microbiologie, Kiwa Water Research). Daarna werd het influent, Lekkanaalwater en leidingwater bij 12°C en 20°C geïncubeerd. Direct na toevoegen van het influent aan het oppervlaktewater en leidingwater en na 1, 2, 5, 8, 15, 22, 29, 36, 50, ... dagen werd 5 ml influentwater en 50 ml Lekkanaalwater en leidingwater gefiltreerd. Uit het filter werd vervolgens DNA geïsoleerd en *Bacteroides spp.* en de huamspecifieke *Bacteroides*-stam HF183 werden gedetecteerd met behulp van PCR waarbij Bac303F en Bac708R (*Bacteroides spp.*) en HF183F en Bac708R (*Bacteriodes* HF183) als primers werden gebruikt (zie hoofdstuk 2).

Naast *Bacteroides* werd op dezelfde monstertijdstippen ook de aanwezigheid van het traditionele indicatororganisme *E. coli* onderzocht. De aanwezigheid van *E. coli* werd met een kweekmethode en een PCR-methode bestudeerd. Voor de kweekmethode werd een verdunningsreeks gemaakt en vervolgens werd van een aantal verdunningen 0.1 ml uitgeplaat op LSA-agar. De

agarplaten werden 20 tot 24 uur geïncubeerd bij 37°C, waarna het aantal kolonievormende eenheden werd bepaald. De PCR voor *E. coli* werd uitgevoerd op het geïsoleerde DNA. In de PCR werd het *uidA*-gen van *E. coli*, wat codeert voor  $\beta$ -D-glucuronidase, met de primers UAL1939B en UAL2105 gedetecteerd (24).

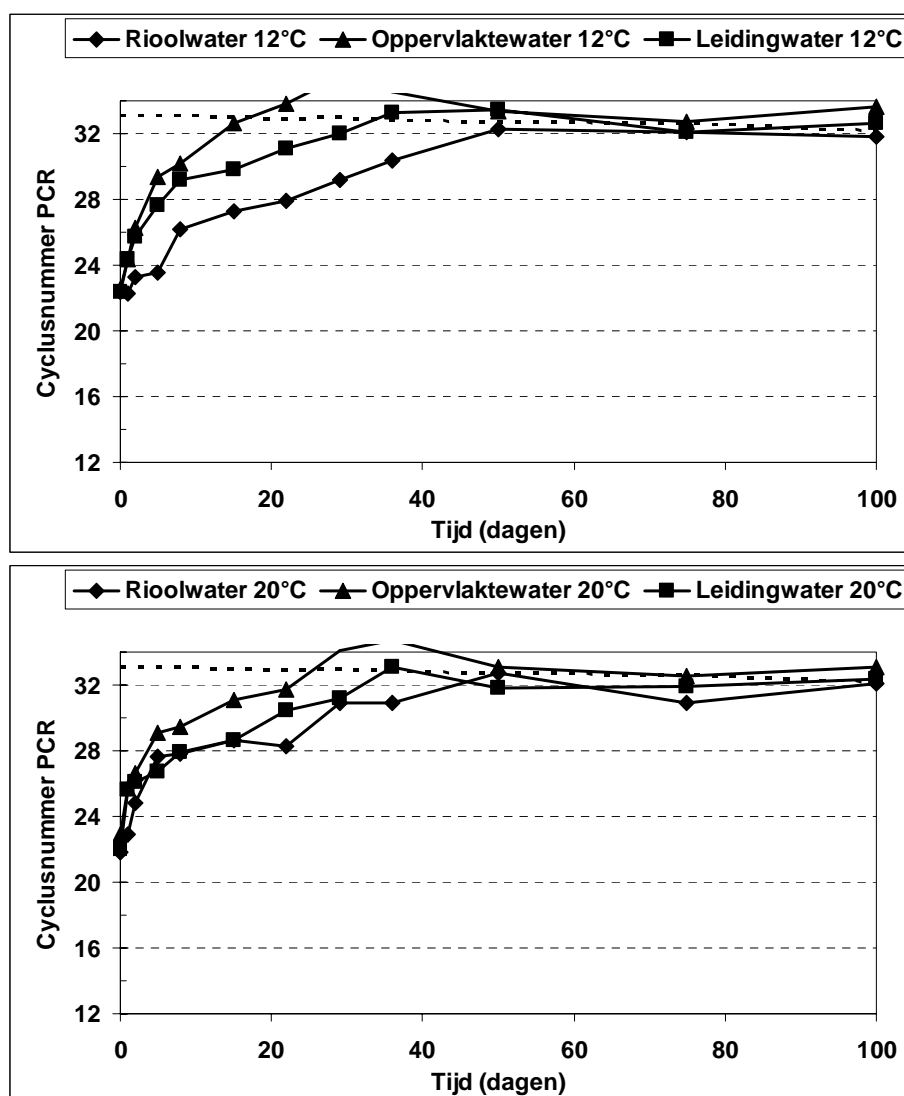
Alle PCR-reacties (*E. coli*, *Bacteroides spp.* en *Bacteroides HF183*) werden uitgevoerd met SYBR-green in de reactiemix zodat op een real-time PCR-machine de opkomst van een PCR-product kan worden gemeten. Het cyclusnummer in de PCR waarbij het PCR-product voor het eerst gedetecteerd wordt zegt iets over de hoeveelheid DNA-template in het watermonster: hoe hoger het cyclusnummer des te lager de concentratie aan DNA-template in het monster. De hoeveelheid DNA-template van een specifieke soort (*E. coli*), groep (*Bacteroides spp.*) of stam (*Bacteroides HF183*) is weer afhankelijk van de aantallen organismen in het monster, waardoor het cyclusnummer indirect een maat is voor de aantallen organismen in het monster.



Figuur 4.1 De afname van kweekbare *E. coli* bacteriën in rioolwater en fecaal besmet oppervlaktewater en leidingwater bij 12°C en 20°C.

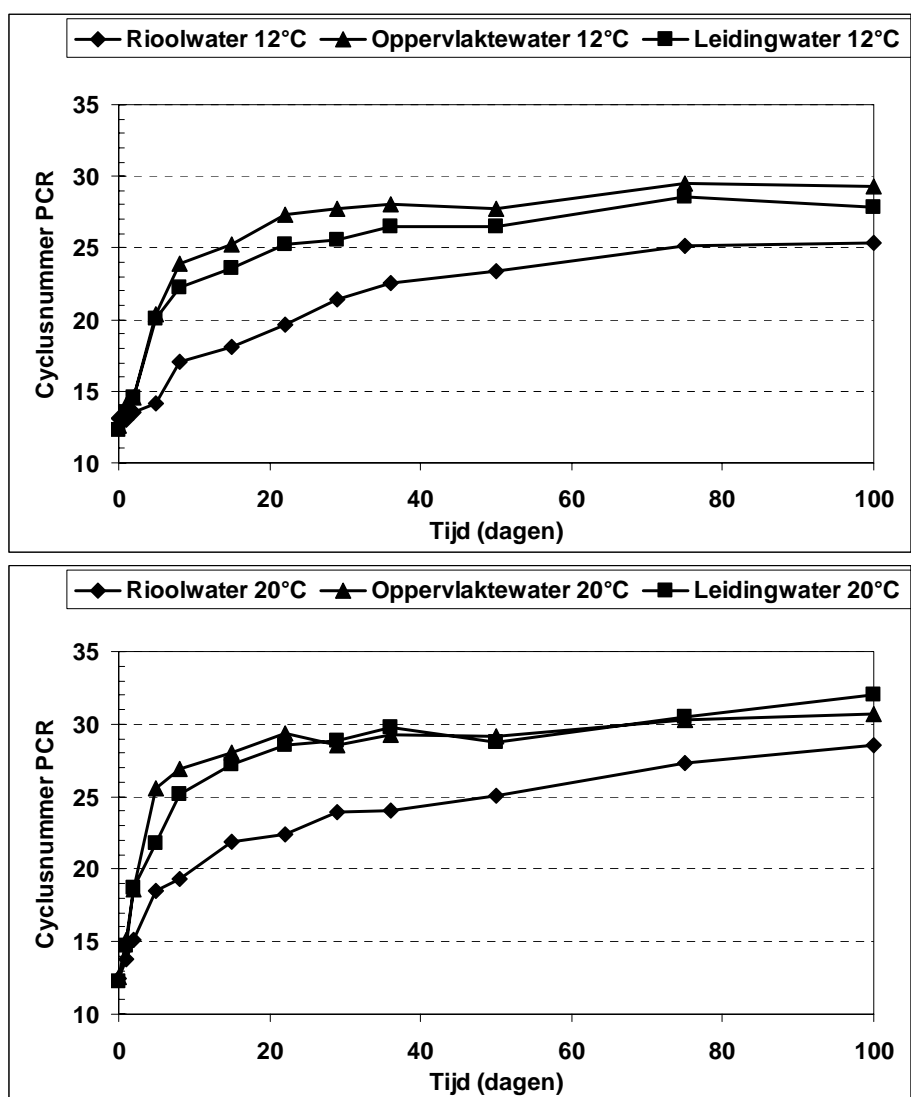
### 4.3 Resultaten

De huidige methode om een fecale verontreiniging in water te detecteren is het kweken van indicatororganisme *E. coli*. Daarom werd in onze studie onderzocht hoe lang kweekbare *E. coli* bacteriën detecteerbaar waren in fecaal verontreinigd leiding- en oppervlaktewater. In Figuur 4.1 zijn de resultaten van de afname van kweekbare *E. coli* gevisualiseerd. Op  $t=0$  waren de aantallen kweekbare *E. coli* ongeveer een factor 10 hoger in rioolwater dan in leiding- en oppervlaktewater. Aangezien het oppervlaktewater en leidingwater werd besmet met rioolwater tot een eindvolume van 10% (v/v), is dit verschil in aantallen volgens verwachting. Bij 20°C was de afname van *E. coli* in de watermonsters sneller dan bij 12°C. Na 22 dagen lagen de aantallen

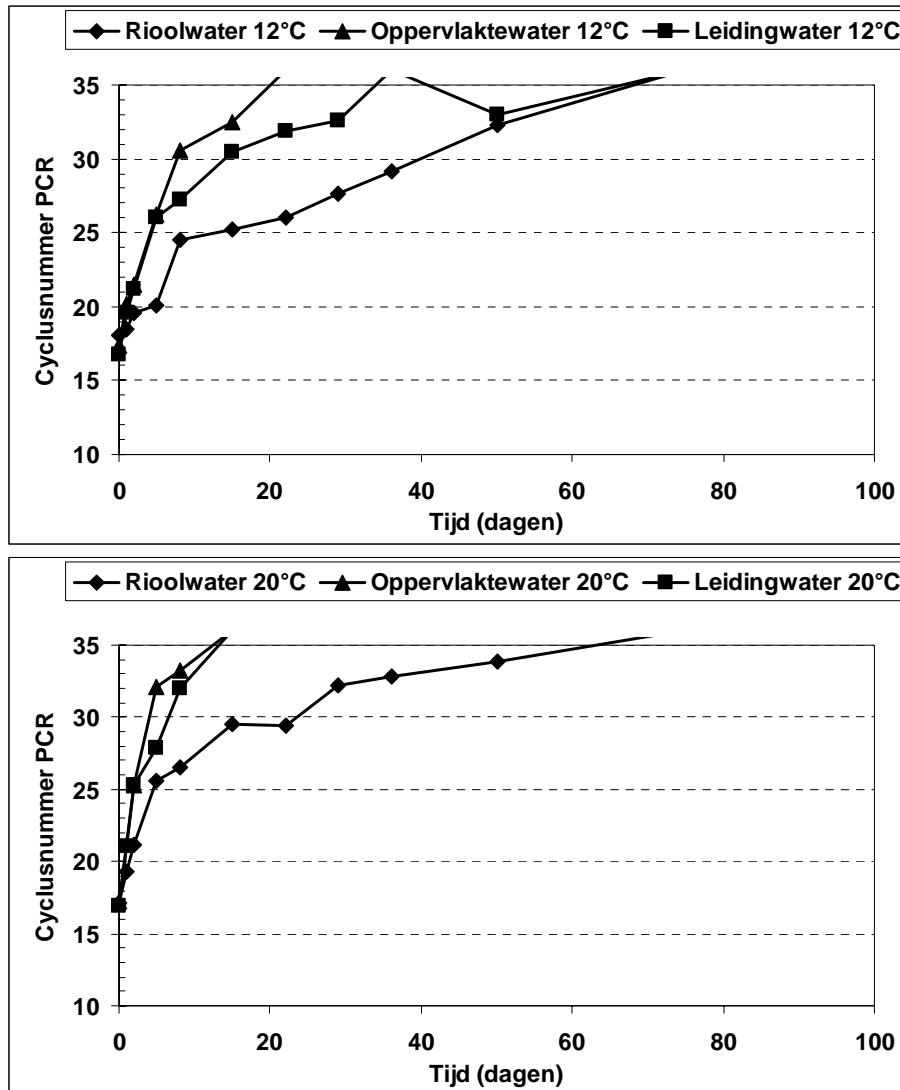


Figuur 4.2. Het cyclusernummer waarbij het PCR-product van het *uidA*-gen van *E. coli* opkomt in rioolwater en fecaal besmet oppervlaktewater en leidingwater geïncubeerd bij 12°C en 20°C.

kweekbare *E. coli* bacteriën onder de detectielimiet ( $3.33 \text{ cellen ml}^{-1}$ ) in het fecaal besmette oppervlaktewater en leidingwater geïncubeerd bij  $20^\circ\text{C}$ . Op dag 36 waren de kweekbare *E. coli* aantallen onder de detectielimiet bij het leiding- en oppervlaktewater geïncubeerd bij  $12^\circ\text{C}$ , maar tussen dag 22 en 36 werden geen monsters genomen, waardoor het onduidelijk is wanneer in de periode tussen 22 en 36 dagen kweekbare *E. coli* onder de detectielimiet kwam. In rioolwater waren kweekbare *E. coli* langer detecteerbaar, maar dit kwam omdat de beginconcentratie van *E. coli* een factor tien hoger was en niet omdat de afstervingsnelheid in rioolwater lager was.



Figuur 4.3. Het cyclonusnummer waarbij het PCR-product van het 16S rRNA gen van *Bacteroides spp.* opkomt in rioolwater en fecaal besmet oppervlaktewater en leidingwater geïncubeerd bij  $12^\circ\text{C}$  en  $20^\circ\text{C}$ .



Figuur 4.4. Het cyclusnummer waarbij het PCR-product van het 16S rRNA gen van de huamspecifieke *Bacteroides*-stam HF183 opkomt in rioolwater en fecaal besmet oppervlaktewater en leidingwater geïncubeerd bij 12°C en 20°C.

Naast kweekbare *E. coli* werd ook onderzocht hoe lang *E. coli*, *Bacteroides spp.* en *Bacteroides* HF183 met PCR detecteerbaar waren. De real-time PCR-resultaten zijn weergegeven in Figuur 4.2, 4.3 en 4.4. In deze figuren zijn niet de aantallen weergegeven op de y-as maar het cyclusnummer waarbij er een PCR-product waarneembaar werd. Uit Figuur 4.2 tot 4.4 blijkt dat op t=0 bij alle monsters het cyclusnummer waarbij de PCR-reactie van *E. coli* opkwam gelijk was, wat betekent dat de DNA-concentraties van *E. coli* in alle monsters gelijk waren. Hetzelfde gold voor *Bacteroides spp.* en huamspecifieke *Bacteroides*-stam HF183. Aangezien het oppervlaktewater en leidingwater een tien keer lagere hoeveelheid rioolwater bevatten, zouden de aantallen organismen ook een factor tien lager moeten zijn. Dit is niet het geval omdat bij leiding- en oppervlaktewater de PCR werd uitgevoerd op DNA geïsoleerd uit 50 ml water, terwijl bij rioolwater de PCR werd uitgevoerd op DNA geïsoleerd uit een tien keer lager volume van 5 ml.

De afname van het DNA van *E. coli* en *Bacteroides* verliep in twee fasen: een snelle afname in de eerste 5 tot 8 dagen, gevolgd door een langzame afname vanaf dag 5 tot 8. De afbraak van het DNA van de verschillende indicatororganismen was het snelst in oppervlaktewater, gevolgd door leidingwater en verliep het traagst in rioolwater. Voor *E. coli* was er geen verschil in afbraak van het DNA tussen 12°C en 20°C in het leidingwater en oppervlaktewater, terwijl in rioolwater de afsterving sneller verliep bij 20°C dan bij 12°C. De snelheid waarmee het DNA van *Bacteroides spp.* en *Bacteroides* HF183 afnam was in de eerste 8 dagen hoger voor de watermonsters geïncubeerd bij 20°C dan bij 12°C. De snelheid waarmee het *Bacteroides spp.* DNA afnam was na 8 dagen voor beide temperaturen wel gelijk.

De detectielimiet van de kweekbare *E. coli* was 3.3 cellen per ml. De detectielimiet bij de real-time PCR-reacties is het maximale cyclusnummer waarbij de PCR nog opkomt in monsters met zeer lage aantallen organismen. Voor *E. coli* was dit ongeveer bij cyclusnummer 32,5 omdat bij cyclusnummer 32,5 in de PCR blanco een product opkwam. Dit werd veroorzaakt doordat de enzymen die in de PCR-reactie werden gebruikt besmet zijn met *E. coli* DNA (24). Voor *Bacteroides spp.* en *Bacteroides* HF183 is de detectielimiet onbekend, maar uit ervaring met real-time PCR is bekend dat de detectielimiet meestal rond de 34 cycli ligt. In Tabel 4.1 is de dag weergegeven dat het indicatororganisme voor het laatst werd gedetecteerd in het watermonster. *Bacteroides spp.* was het langst detecteerbaar in de drie watermonsters. Gedurende de gehele incubatietijd van het experiment (100 dagen) werd in zowel rioolwater, leidingwater en oppervlaktewater *Bacteroides spp.* gedetecteerd. Dit in tegenstelling tot het traditionele indicatororganisme *E. coli*. Kweekbare *E. coli* bacteriën waren na 15 tot 22 dagen niet meer detecteerbaar in de drie watertypen, terwijl met PCR *E. coli* tot 22 dagen in het oppervlaktewater, 29 dagen in het leidingwater en 50 dagen in het rioolwater was te detecteren. Het DNA van *Bacteroides* HF183 was tot 8 dagen detecteerbaar in het fecaal besmette leiding- en oppervlaktewater geïncubeerd bij 20°C. Bij 12°C was *Bacteroides* HF183 15 (oppervlaktewater) en 29 (leidingwater) dagen detecteerbaar. In rioolwater was de huamspecifieke *Bacteroides*-stam HF183 tot 50 dagen detecteerbaar.

Tabel 4.1 De periode dat indicatororganismen *E. coli*, *Bacteroides spp.*, en *Bacteroides* HF183 detecteerbaar zijn in rioolwater en oppervlaktewater en leidingwater besmet met 10% rioolwater.

Organisme	12°C			20°C		
	Riool	Leiding	Oppervlakte	Riool	Leiding	Oppervlakte
<i>E. coli</i> kweek	22	22	22	22	15	15
<i>E. coli</i> PCR	50	29	15	36	29	22
<i>Bacteroides spp.</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Bacteroides</i> HF183	50	29	15	50	8	8

#### 4.4 Discussie

Het DNA van *E. coli* was langer detecteerbaar in de verschillende watermonsters dan kweekbare *E. coli* cellen. De *E. coli* bacteriën sterven af in het water, maar nadat de cellen zijn afgestorven is het DNA nog niet meteen afgebroken. Het DNA van *E. coli* is dus langer detecteerbaar dan de kweekbare *E. coli* cellen in water. Het verschil tussen detectietijd van kweekbare *E. coli* en het DNA van *E. coli* wordt echter ook veroorzaakt doordat het DNA werd gedetecteerd in 50 ml gefiltreerd leidingwater of oppervlaktewater, terwijl de kweekbare *E. coli* aantallen in 0.1 ml werden bepaald. Het aantal *E. coli* cellen is natuurlijk hoger in 50 ml dan in 0.1 ml, waardoor *E. coli* langer detecteerbaar is in 50 ml volume dan in 0.1 ml volume. De resultaten in onze studie tonen aan dat het DNA van het alternatieve indicatororganisme *Bacteroides spp.* veel langer detecteerbaar was dan het traditionele indicatororganisme *E. coli*. De snelheid waarmee het DNA van *E. coli* en *Bacteroides spp.* afneemt verschilde niet veel van elkaar (Figuur 4.2 en 4.3), maar de beginaantallen van *Bacteroides spp.* waren veel hoger dan van *E. coli*. Op  $t=0$  was het cyclusnummer waarbij de PCR opkomt voor *Bacteroides spp.* ongeveer 12,6, terwijl dit cyclusnummer voor *E. coli* 22,4 was. Omdat de afbraaksnelheid van het DNA van beide soorten ongeveer gelijk was, bereikte de *E. coli* PCR veel eerder de detectiegrens dan de PCR voor *Bacteroides spp.*. De humaan specifieke *Bacteroides*-stam HF183 was het kortst detecteerbaar. Bij cyclusnummer 17,2 was het PCR-signaal van *Bacteroides* HF183 boven de achtergrondruis op  $t=0$ . Omdat dit cyclusnummer lager was dan van *E. coli*, was de afbraaksnelheid van het DNA van *Bacteroides* HF183 sneller dan van het *E. coli* DNA. Het is onbekend waardoor dit veroorzaakt werd.

In eerdere studies is de tijd waarin *Bacteroides* detecteerbaar was ook bepaald. De resultaten van deze studies komen echter niet overeen met onze studie en met elkaar. Kreader (30) detecteerde DNA van *Bacteroides distasonis* tot 5 dagen in oppervlaktewater besmet met feces en geïncubeerd bij 14°C, terwijl dit slechts twee dagen was in fecaal besmet oppervlaktewater geïncubeerd bij 22 tot 24°C. Fogarty and Voytek (18) hebben de tijd bepaald dat *Bacteroides*-stammen HF183 en CF123 detecteerbaar waren in oppervlaktewater geïncubeerd bij 18°C. De incubatietijd in hun experiment was 12 dagen en gedurende deze 12 dagen waren beide stammen detecteerbaar in het water. Ten slotte heeft Seurinck et al. (48) de detectietijd van de humaan specifieke *Bacteroides*-stam HF183 bepaald in oppervlaktewater besmet met 10% influent van een RWZI en geïncubeerd bij 4°C, 12°C en 28°C. De incubatietijd was 24 dagen bij 4 en 12°C en 8 dagen bij 28°C. Gedurende deze tijd werd stam HF183 aangetoond met kwantitatieve PCR. Na 24 dagen was de DNA-marker voor stam HF183 0,6 log en 1,5 log lager in het oppervlaktewater geïncubeerd bij 4°C en 12°C, respectievelijk. Het oppervlaktewater dat bij 28°C was geïncubeerd had een 2,3 log lagere hoeveelheid stam HF183 DNA-marker dan de beginconcentratie. De afname van het DNA van *Bacteroides*-stam HF183 in de tijd was dus laag.

De opzet van de experimenten weken echter af van de opzet in onze studie. In de studie van Kreader (30) was de fecale verontreiniging slechts 0.001% van



het eindvolume oppervlaktewater en dus was de beginconcentratie aan *Bacteroides* in het oppervlaktewater 10.000 keer lager dan in onze studie. Ook was het volume waar DNA uit werd geïsoleerd een factor 50 lager in de studie van Kreader. Hierdoor is het logisch dat in de studie van Kreader de tijd waarin *Bacteroides* werd gedetecteerd veel lager was dan in onze studie. Een aanvullende studie naar de detectietijd van *Bacteroides spp.* en *E. coli* in water met een lage fecale besmettingsgraad is nodig om te onderzoeken of ook in die gevallen *Bacteroides spp.* langer detecteerbaar is dan *E. coli*. Fogarty en Voytek (18) gebruikte in hun experimenten een fecale verontreiniging in oppervlaktewater van 0.1%, wat altijd nog een factor 100 lager was dan in onze studie. Door de korte incubatietijd is het echter niet duidelijk tot hoe lang zij in staat waren om *Bacteroides* te detecteren. De studie van Seurinck et al. (48) was in opzet vergelijkbaar met onze studie. De mate van fecale verontreiniging van het oppervlaktewater (10%) was gelijk, alleen de hoeveelheid water waaruit DNA werd geïsoleerd was vijf keer zo laag in de studie van Seurinck et al.. Tevens gebruikten zij het primerpaar HF183F en HF183R voor de detectie van *Bacteroides*-stam HF183, terwijl in onze studie het primerpaar HF183F en Bac708R werd gebruikt. In de studie van Seurinck et al. was de DNA-marker van stam HF183 1,5 log afgenomen na 24 dagen incubatie bij 12°C. In onze studie was het cyclusnummer met meer dan 18 toegenomen in het oppervlaktewater na 24 dagen incubatie bij 12°C. Ervan uitgaande dat een toename van 3,3 cycli overeenkomt met 1 log afname van de DNA-marker (Bart Wullings en Leo Heijnen, pers. comm.), was de verwijdering in onze studie meer dan 5,4 log. Dit verschil kan veroorzaakt zijn door het verschil in gebruikte primers, maar ook kan het verschil in oppervlaktewater hierin een rol hebben gespeeld.

## 5 Conclusies

- Fecale verontreiniging van water kan worden aangetoond met de in deze studie beschreven methode voor de detectie van DNA van *Bacteroides spp.*, huuaanspecifieke *Bacteroides*-stam HF183 en rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen CF123.
- De methoden voor de moleculaire detectie van bifidobacteriën, *F. prausnitzii* en *C. clostridiforme* in water waren niet succesvol.
- *Bacteroides spp.* werd aangetoond in water van het influent en effluent RWZI, het Lekkanaal, de spaarbekkens van Loenen en de Biesbosch en in het afvalwater van de rundveeslachterij. Al deze watermonsters waren dus fecaal besmet.
- De huuaanspecifieke *Bacteroides*-stam HF183 werd gedetecteerd in water van het influent en effluent RWZI en van het Lekkanaal. Eén van de fecale bronnen van het Lekkanaal was dus van humane oorsprong.
- De rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen CF123 werden alleen in het afvalwater van de rundveeslachterij gedetecteerd.
- *Bacteroides spp.* werd veel langer gedetecteerd in oppervlaktewater en leidingwater besmet met 10% influentwater van de RWZI dan *E. coli* of *Bacteroides*-stam HF183. De detectie van DNA van *Bacteroides spp.* lijkt dus een gevoeliger methode om fecale verontreinigingen mee aan te tonen dan de detectie van het traditionele indicatororganisme *E. coli*.
- De detectie van *Bacteroides*-stam HF183 duidt op een relatief jonge fecale verontreiniging van het water.



## 6 Aanbevelingen

- Monsters genomen door de zuivering van oppervlaktewaterwinning en van kwetsbare en niet kwetsbare grondwaterwinningen onderzoeken op de aanwezigheid van *Bacteroides spp.*, humaanspecifieke *Bacteroides*-stam HF183 en rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen CF123.
- Ontwikkeling van een kwantitatieve PCR-methode voor de detectie van DNA van *Bacteroides spp.*, humaanspecifieke *Bacteroides*-stam HF183 en rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen CF123.
- Bepalen van de detectielimiet van fecale verontreiniging in het water door:
  - o Rioolwater in leidingwater uit te verdunnen om te achterhalen tot welke verdunning de verschillende indicatororganismen nog detecteerbaar zijn
  - o De tijd te bepalen waarin indicatororganismen te detecteren zijn in watermonsters met een lage graad van fecale verontreiniging
- Herhalingsmonster te nemen op het moment dat periodiek gemeten reinwater en drinkwater positief zijn voor *E. coli* en deze herhalingsmonsters te testen op de aanwezigheid van *Bacteroides spp.*, humaanspecifieke *Bacteroides*-stam HF183 en rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen CF123.
- Onderzoek naar de specificiteit van de humaanspecifieke *Bacteroides*-stam HF183 en rundveespecifieke *Bacteroides*-stammen CF123 door watermonsters uit pluimvee-, varkens-, schapen-, en paardenslachterij en fecaliën van wilde dieren te testen op de aanwezigheid van HF183 en CF123. Tevens moeten watermonsters van meer RWZI's en rundveeslachterijen getest worden op stam HF183 en CF123.



## 7 Referenties

1. Allsop, K. and D. J. Stickler. 1984. The enumeration of *Bacteroides fragilis* group organisms from sewage and natural waters. J. Appl. Bacteriol. 56:15-24.
2. Allsop, K. and D. J. Stickler. 1985. An assessment of *Bacteroides fragilis* group organisms as indicators of human faecal pollution. J. Appl. Bacteriol. 58:95-99.
3. Bartosch, S., A. Fite, G. T. Macfarlane, and M. E. T. McMurdo. 2004. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. Appl. Environ. Microbiol. 70:3575-3581.
4. Bernhard, A. E. and K. G. Field. 2000. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 66:4571-4574.
5. Bernhard, A. E. and K. G. Field. 2000. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. Appl. Environ. Microbiol. 66:1587-1594.
6. Bonde, G. J. 1966. Bacteriological methods for estimation of water pollution. Health Lab. Sci. 3:124-128.
7. Bonjoch, X., E. Balleste, and A. R. Blanch. 2004. Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution. Appl. Environ. Microbiol. 70:3171-3175.
8. Carrillo, M., E. Estrada, and T. C. Hazen. 1985. Survival and enumeration of the fecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed. Appl. Environ. Microbiol. 50:468-476.
9. Carson, C. A., J. M. Christiansen, H. Yampara-Iquise, V. W. Benson, C. Baffaut, J. V. Davis, R. R. Broz, W. B. Kurtz, W. M. Rogers, and W. H. Fales. 2005. Specificity of a *Bacteroides thetaiotaomicron* marker for human feces. Appl. Environ. Microbiol. 71:4945-4949.
10. Carson, C. A., B. L. Shear, M. R. Ellersieck, and A. Asfaw. 2001. Identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals by ribotyping. Appl. Environ. Microbiol. 67:1503-1507.

11. Davies, C., J. Long, M. Donald, and N. Ashbolt. 1995. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1888-1896.
12. Desmarais, T. R., H. M. Solo-Gabriele, and C. J. Palmer. 2002. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1165-1172.
13. Dick, L. K., A. E. Bernhard, T. J. Brodeur, J. W. Santo Domingo, J. M. Simpson, S. P. Walters, and K. G. Field. 2005. Host distributions of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3184-3191.
14. Dombek, P. E., L. K. Johnson, S. T. Zimmerley, and M. J. Sadowsky. 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2572-2577.
15. Edberg, S. C., H. LeClerc, and J. Robertson. 1997. Natural protection of spring and well drinking water against surface microbial contamination. II. Indicators and monitoring parameters for parasites. *Crit. Rev. Microbiol.* 23:179-206.
16. Feachem, R. 1975. An improved role for faecal coliform to faecal streptococci ratios in the differentiation between human and nonhuman pollution sources. *Wat. Res.* 9:689-690.
17. Field, K. G., A. E. Bernhard, and T. J. Brodeur. 2003. Molecular approaches to microbiological monitoring: fecal source detection. *Environ. Monitor. Assess.* 81:313-326.
18. Fogarty, L. R. and M. A. Voytek. 2005. Comparison of *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for fecal samples from different animal species. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5999-6007.
19. Gerba, C. P. and J. S. McLeod. 1976. Effect of sediments on the survival of *Escherichia coli* in marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 32:114-120.
20. Grabow, W. 2001. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA* 27:251-268.
21. Guan, S., R. Xu, S. Chen, J. Odumeru, and C. Gyles. 2002. Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animal and human sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2690-2698.
22. Gueimonde, M., S. Tolkkio, T. Korpimaki, and S. Salminen. 2004. New real-time quantitative PCR procedure for quantification of

- bifidobacteria in human fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4165-4169.
23. Harmsen, H. J. M., G. C. Raangs, T. He, J. E. Degener, and G. W. Welling. 2002. Extensive set of 16S rRNA-Based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2982-2990.
  24. Heijnen, L. and G. J. Medema. 2006. Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* 0157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *J. Water Health* in press.
  25. Holdeman, L. V., I. J. Good, and W. E. Moore. 1976. Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:359-375.
  26. Kariuki, S., C. Gilks, J. Kimari, A. Obanda, J. Muyodi, P. Waiyaki, and C. A. Hart. 1999. Genotype analysis of *Escherichia coli* strains isolated from children and chickens living in close contact. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:472-476.
  27. Kaspar, C. W., J. L. Burgess, I. T. Knight, and R. R. Colwell. 1990. Antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify sources of fecal contamination in water. *Can. J. Microbiol.* 36:891-894.
  28. Kaufmann, P., A. Pfefferkorn, M. Teuber, and L. Meile. 1997. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1268-1273.
  29. Kreader, C. 1995. Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for the specific detection of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1171-1179.
  30. Kreader, C. A. 1998. Persistence of PCR-detectable *Bacteroides distasonis* from human feces in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4103-4105.
  31. Krumperman, P. H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:165-170.
  32. Langendijk, P., F. Schut, G. Jansen, G. Raangs, G. Kamphuis, M. Wilkinson, and G. Welling. 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium spp.* with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3069-3075.



33. Lay, C., L. Rigottier-Gois, K. Holmstrom, M. Rajilic, E. Vaughan, W. M. de Vos, M. D. Collins, R. Thiel, P. Namsolleck, M. Blaut and J. Dore. 2005. Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4135-4155.
34. Long S.C. 1999. Project Report for Project Continuation: Development of Methods to Differentiate Microorganisms in MDC Reservoir Watersheds. Civil and Environmental Engineering, University of Massachusetts, Amherst, MA, USA.
35. Long S.C., E. J. Mahar, R. Pei, C. Arango, E. Shafer, and T. H. Schoenberg. 2002. Development of Source-Specific Indicator Organisms for Drinking Water. AWWA Research Foundation, Denver, CO.
36. Mara, D. D. and J. I. Oragui. 1983. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. *J. Appl. Bacteriol.* 55:349-357.
37. Matsuki, T., K. Watanabe, J. Fujimoto, Y. Kado, T. Takada, K. Matsumoto, and R. Tanaka. 2004. Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:167-173.
- 37a. Hoogenboezem, W., H.A.M. Ketelaars, G.J. Medema, G.B.J. Rijs, and J.F. Schijven. 2001. *Cryptosporidium* and *Giardia*: occurrence in sewage, manure and surface water. RIWA, Amsterdam, the Netherlands.
38. Mossel, D. A. A. 1958. Abstr. 7th Int. Congr. Microbiol.
39. Nebra, Y., X. Bonjoch, and A. R. Blanch. 2003. Use of *Bifidobacterium dentium* as an indicator of the origin of fecal water pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2651-2656.
40. Post, F. J., A. D. Allen, and T. C. Reid. 1967. Simple medium for the selective isolation of *Bacteroides* and related organisms, and their occurrence in sewage. *Appl. Microbiol.* 15:213-218.
41. Pourcher, A. M., L. A. Devriese, J. F. Hernandez, and J. M. Delattre. 1991. Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and enterococci as indicators of the origin of faecal pollution of waters. *J. Appl. Bacteriol.* 70:525-530.
42. Requena, T., J. Burton, T. Matsuki, K. Munro, M. A. Simon, R. Tanaka, K. Watanabe, and G. W. Tannock. 2002. Identification, detection, and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2420-2427.

43. Resnick, I. G. and M. A. Levin. 1981. Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:433-438.
44. Rhodes, M. W. and H. Kator. 1988. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2902-2907.
45. Rhodes, M. W. and H. Kator. 1999. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as indicators of diffuse human faecal pollution in estuarine watersheds. *J. Appl. Microbiol.* 87:528-535.
46. Scott, T. M., S. Parveen, K. M. Portier, J. B. Rose, M. L. Tamplin, S. R. Farrah, A. Koo, and J. Lukasik. 2003. Geographical variation in ribotype profiles of *Escherichia coli* isolates from humans, swine, poultry, beef, and dairy cattle in Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1089-1092.
47. Scott, T. M., J. B. Rose, T. M. Jenkins, S. R. Farrah, and J. Lukasik. 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5796-5803.
48. Seurinck, S., T. Defoirdt, W. Verstraete, and S. D. Siciliano. 2005. Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environ. Microbiol.* 7:249-259.
49. Sghir, A., G. Gramet, A. Suau, V. Rochet, P. Pochart, and J. Dore. 2000. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2263-2266.
50. Skinner, F. A. and J. M. Shewan. 1977. *Aquatic Microbiology*. Academic Press, New York.
51. Wang, R., W. Cao, and C. Cerniglia. 1996. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1242-1247.
52. Wiggins, B. A., R. W. Andrews, R. A. Conway, C. L. Corr, E. J. Dobratz, D. P. Dougherty, J. R. Eppard, S. R. Knupp, M. C. Limjoco, J. M. Mettenburg, J. M. Rinehardt, J. Sonsino, R. L. Torrijos, and M. E. Zimmerman. 1999. Use of antibiotic resistance analysis to identify nonpoint sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3483-3486.
53. Zoetendal, E. G., A. D. Akkermans, and W. M. de Vos. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from

human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3854-3859.