



Snelle optische detectie van *Escherichia coli* in drinkwater.

BTO 2011.012
Februari 2011



Watercycle Research Institute

Snelle optische detectie van *Escherichia coli* in drinkwater.

BTO 2011.012
Februari 2011

© 2011 KWR

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.

Colofon

Titel

Snelle optische detectie van *Escherichia coli* in drinkwater.

Projectnummer

B111623 / A307629

Onderzoeksprogramma's

BTO / BIOCOM

Projectmanager

Patrick Smeets / Niels Dammers

Opdrachtgever

CvO

Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

Auteur

Jack van de Vossenbergh

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar

Voorwoord

Snelle detectie van fecale verontreiniging van drinkwater was met de methoden aan het begin van dit project niet mogelijk. Het duurt minimaal 18 uur tot een dag voordat een uitslag bekend is. Snelle detectie van fecale verontreiniging (*Escherichia coli*) is, met name voor speciale categorieën monsters (na reparaties, klachten e.d.), essentieel voor een snelle diagnose van de aard en omvang van de verontreiniging. Snelle detectie is de basis voor het snel kunnen nemen van maatregelen om de gevolgen in te perken en de oorzaak op te sporen en weg te nemen (BTO 2002.107).

Gedurende dit project is bij KWR, door Leo Heijnen en Gertjan Medema, een snelle NASBA methode ontwikkeld die gebaseerd is op de vermeerdering van RNA van *E. coli* bacteriën (BTO 2009.048). Deze methode omzeilt twee problemen van PCR: met NASBA kunnen levende *E. coli* bacteriën van dode worden onderscheiden, en de NASBA methode heeft geen last van mogelijke besmetting van reagentia met *E. coli* DNA. Deze methode is echter vrij bewerkelijk.

Van de optische meetmethoden die bij het begin van het project geschikt waren voor toepassing in de praktijk was geen enkele methode snel genoeg, met uitzondering van het 'solid phase cytometry' apparaat Chemsan (AES Chemunex, Bruz, Frankrijk). De Chemsan functioneerde echter in de praktijk niet. Het bleek een grote investering te zijn en de methode vereist expertise van de analist, en is daardoor duurder dan andere technieken. Ook is deze methode niet geschikt te maken voor veldwerk.

Om optische detectie mogelijk te maken werd gezocht naar een partner, die een dergelijk optisch systeem zou kunnen ontwikkelen. Lheritier (Cergy Pontoise, Frankrijk), dat optische apparatuur maakt voor de Franse defensie-industrie, had een optische sensor ontwikkeld juist voor toepassing in omstandigheden met weinig licht. Deze sensor is in staat om, zonder ingewikkelde optiek of lamptechnologie, fluorescerende bacteriën te detecteren. Sensortechnologie heeft potentie om een eenvoudig en draagbaar systeem op te leveren, maar moet nog wel geoptimaliseerd worden en toepasbaar gemaakt worden voor drinkwateronderzoek.

Het systeem voor snelle detectie van *E. coli* zou liefst in het veld toepasbaar moeten zijn, zodat geen kostbare tijd wordt verloren aan transport van monsters.

Het doel van dit project was vast te stellen of *E. coli* voldoende specifiek is aan te kleuren voor snelle (<4 uur) specifieke (alleen *E. coli*) en gevoelige (1 bacterie per 100 ml) detectie van *E. coli* in water met de optische sensor. Het project werd ingepast binnen het project BIO-COM, een samenwerking met Lheritier, de universiteit van Lille (Frankrijk), en W-SMART (werkend vanuit Polytechnic University New York, USA) en Eau de Paris (Parijs, Frankrijk). Binnen BIO-COM werd ook gewerkt aan de ontwikkeling van vroegtijdige detectie van andere pathogene micro-organismen en van moedwillige verontreinigingen. Daarmee zou de sensortechniek voor detectie van *E. coli* ook geschikt worden voor detectie van andere micro-organismen. In dit rapport gaan we kort in op detectie van *Cryptosporidium* met behulp van het optische systeem.

Samenvatting

Escherichia coli bacteriën en bacteriën van de coligroep worden overall ter wereld gebruikt als indicator voor fecale verontreiniging van drinkwater. Aan het begin van dit project was de analysetijd om levende *E. coli* bacteriën te detecteren minstens 18 uur. We hebben een proof-of-concept voor een methode uitgevoerd, waarmee de bacteriën kunnen worden gedetecteerd met een eenvoudige fluorescentie methode, die is gebaseerd op de activiteit van twee enzymen, β -galactosidase and β -glucuronidase. De activiteiten van deze enzymen worden ook gebruikt in US EPA goedgekeurde testen. In combinatie met een selectief medium voor deze organismen kan deze methode microkolonies onderscheiden en typeren met een groeitijd van 6 uur, en een totale duur van de analyse van minder dan 7 uur. De experimenten beschreven in dit rapport tonen aan, dat detectie van 1 microkolonie vormende eenheid per 100 ml mogelijk is. De belangrijkste tijd-limiterende factor van het huidige systeem is de groei van de bacteriën tot microkolonies. Betere beeldanalyse zou de analysetijd mogelijk nog minimaal 1 uur kunnen verkorten.

De methode bestaat uit 6 relatief eenvoudige stappen:

- 1) Een filtratiestap van 100 ml water door een membraanfilter.
- 2) Incubatie van het membraanfilter op een selectief voedingsmedium voor bacteriën van de coligroep inclusief *E. coli*. Dit medium bevat inducerende stoffen voor de enzymen β -galactosidase and β -glucuronidase.
- 3) Incubatie van het membraanfilter op een papierschijfje, wat verzadigd is met een oplossing met twee fluorogene (fluorescentie ontwikkelende) substraten en een stof die de celmembraan permeabel maakt.
- 4) Korte blootstelling van het membraanfilter aan hoge pH (glycine buffer).
- 5) Opnamen van het fluorescente signaal met een camera. De opnamen worden gemaakt bij twee verschillende sets van excitatie- en emissie golflengten.
- 6) Softwarematige beeldanalyse.

Cryptosporidium oöcysten konden ook worden aangetoond met behulp van het voor *E. coli* ontwikkelde optische systeem. Het is mogelijk de aangekleurde oöcysten automatisch te tellen met behulp van software.

Ter ontwikkeling van een snelle *Cryptosporidium* detectie methode werd voorbereidend werk gedaan om *Cryptosporidium* oöcysten aan te tonen met behulp van specifieke dubbel-kleuring op basis van immunologie met gelijktijdige fluorescentie *in situ* hybridisatie (FISH). Met deze methode konden oöcysten binnen 1.5 uur geïdentificeerd worden. Deze methode wordt waarschijnlijk uitgewerkt in een nieuw project.

Inhoud

Voorwoord	1
Samenvatting	3
Inhoud	5
1 Inleiding en projectdoelen	7
1.1 Inleiding	7
1.2 Projectdoelen	11
2 Materiaal en methoden	13
2.1 Media, inducers en substraten	13
2.2 Fluorimeter tests voor luminescence energy transfer	13
2.3 Bacteriestammen	13
2.4 Procedure (fluorescentie)	13
2.5 Procedure (luminescentie)	14
2.6 Toevoegingen ter versnelling van bacteriegroei	14
2.7 Detectie apparaat en databewerking	14
2.8 <i>Cryptosporidium</i> telling met detectie apparaat	15
2.9 Snelle <i>Cryptosporidium</i> dubbellabeling met FISH en antilichamen	15
3 Resultaten en discussie	17
3.1 Fluorimeter tests	17
3.2 Luminescentie tests met membraanfilters	17
3.2.1 Tests van luminescente substraten	17
3.3 Fluorescentie tests met membraanfilters	19
3.3.1 Onderscheid tussen <i>E. coli</i> en bacteriën van de coligroep	19
3.3.2 Media	20
3.3.3 Filters	20
3.3.4 Toevoegingen ter versnelling van bacteriegroei	21
3.3.5 Beeldbewerking	23
3.3.6 Andere fluorescente probes en aanpassingen van de detector	24
3.4 <i>Cryptosporidium</i> detectie: voorbereidende experimenten	24
3.4.1 <i>Cryptosporidium</i> detectie en telling met de <i>E. coli</i> detector	24
3.4.2 <i>Cryptosporidium</i> dubbellabeling met FISH en antilichamen	25
4 Conclusies	29
5 Projectopbrengsten en aanbevelingen	31
5.1 Opbrengsten	31
5.2 Aanbevelingen	31
6 Dank	33
7 Literatuur	35

1 Inleiding en projectdoelen

1.1 Inleiding

Escherichia coli bacteriën, en in mindere mate de daaraan verwante bacteriën (bacteriën van de coligroep), zijn de belangrijkste indicator voor fecale verontreiniging van drinkwater (EU Drinking Water Directive, 1998), maar ook van afvalwater, zwemwater, etc. Andere bacteriën van de coligroep zijn voor een deel niet van fecale oorsprong, bv. sommige zijn bodembacteriën (Knittel et al., 1977; Geldreich, 1997), dus deze groep is geen betrouwbare indicator.

Snelle detectie van fecale verontreiniging is essentieel voor een snelle diagnose van de aard en omvang van de verontreiniging, bv. na reparaties, klachten etc. Zo kunnen de gevolgen en kosten van een verontreiniging beperkt worden. Idealiter zouden drinkwaterbedrijven direct, maar in ieder geval binnen één werkdag, de uitslag willen hebben van een *E. coli* test, zodat ze nog diezelfde dag corrigerende maatregelen kunnen nemen. Bij het begin van het project waren er vrijwel geen snelle methoden voor een dergelijke snelle detectie van deze organismen in lage aantallen, zoals deze mogelijk worden aangetroffen in drinkwater.

De norm voor *E. coli* is minder dan 1 bacterie per 100 ml (EU Drinking Water Directive, 1998). Voordat *E. coli* of bacteriën van de coligroep in deze hoeveelheden zijn aangetoond duurt het met de huidige gevalideerde methoden minimaal een 18 uur (Colilert-18), en zeer recentelijk zou 16 uur haalbaar zijn (Modified Colitag). Dat is langer dan een werkdag, dus erg lang voor snelle diagnose.

De meeste snelle methoden voor detectie van micro-organismen zijn gebaseerd op moleculaire methoden (DNA en RNA analyse). Snelle kolonie-bevestigingsmethoden zijn eerder ontwikkeld en inmiddels geïmplementeerd bij de waterlaboratoria (Heijnen et al., 2005; Heijnen en Medema, 2006), maar aan deze methoden gaat een lange groeistap vooraf. De aanbeveling bij het begin van het project was onderzoek te doen naar de toepasbaarheid van PCR voor snelle detectie van *E. coli* en de overige ontwikkelingen van detectiemethoden te volgen. Kwantitatieve "real time" PCR is snel, maar minder goed bruikbaar voor directe detectie van lage aantallen *E. coli*, omdat PCR reagentia niet gegarandeerd vrij van *E. coli* DNA kunnen worden geproduceerd (Frahm en Obst, 2003; Heijnen, BTO 2009.048). Dat kan leiden tot vals-positieve resultaten en is daarom ongeschikt voor het bepalen van de noodzaak van corrigerende maatregelen. Bovendien kunnen DNA tests niet het verschil aantonen tussen dode en levende cellen, omdat ook dode cellen nog functioneel DNA kunnen bevatten.

Gezien de instabiliteit van mRNA, zou met RNA tests wel onderscheid gemaakt kunnen worden tussen dode en levende cellen. Recentelijk is bij KWR een methode ontwikkeld om *E. coli* met grote gevoeligheid met RNA analyse (NASBA) aan te tonen (Heijnen, BTO 2009.048; Heijnen en Medema, 2009). Deze methode was nog niet beschikbaar bij het begin van dit project voor snelle optische detectie van *E. coli*. De NASBA methode is erg snel, het resultaat is te verkrijgen binnen 3 uur, maar ook bewerkelijk en nog niet geschikt voor een veldkit.

Eerder was een optische methode ontwikkeld, die het mogelijk zou moeten maken om *E. coli* in minder dan 4 uur aan te tonen. Deze methode was gebaseerd op detectie van microkolonies waarvan de *E. coli* specifieke enzymen waren gelabeld (zie onder). Die microkolonies konden met behulp van een laserscanner (Chemscan, AES Chemunex) gevonden worden, maar dit systeem was erg gevoelig voor oneffenheden in het membraan filter, het kon maar één golf lengte scannen, en vervolgens moesten alle positieve signalen geanalyseerd worden met een microscoop (Van Poucke en Nelis, 2000). Deze methode is uitgetoetst bij laboratoria, waaronder KWR. Hoewel bij calamiteiten de betrouwbaarheid van een snelle methode gaat boven kosten, bleek in de praktijk de investering van deze methode erg hoog en was de methode omslachtig (Nobel, BTO 2002.107).

Het doel van dit project was vast te stellen of levende *E. coli* in drinkwater optisch gedetecteerd kan worden. Daarvoor diende deze bacteriesoort snel genoeg te kunnen groeien en aangekleurd te kunnen worden voor snelle detectie, liefst binnen 4 uur. Deze kleuring diende specifiek te zijn, nl. alleen levende

E. coli bacteriën. Andere bacteriën, die behoren tot de coligroep, kunnen meegekleurd worden, maar ze dienen wel onderscheiden te kunnen worden van *E. coli* bacteriën.

Detectie zou gedaan worden met een gevoelige optische sensor. Door het Franse Lheritier (Cergy Pontoise, Frankrijk) was al een prototype optische detector ontwikkeld voor toepassing in omstandigheden met weinig licht. Achtergrondruis werd geminimaliseerd door koeling van de sensor, de sensor had een hoge kwantum efficiency en dynamische range (16-bit), en de lens vlak bij het monster had een groot oppervlak, opdat zoveel mogelijk signaal de sensor zou bereiken. Door de gevoeligheid van de sensor zou de detector voor een bruikbaar signaal genoeg hebben aan licht van slechts enkele fotonen. Zo zou de detector in staat moeten zijn om zonder ingewikkelde optiek of lamptechnologie fluorescerende bacteriën te detecteren.

De detector maakt één enkele foto van een membraanfilter, maar daardoor is de resolutie wel lager dan met een microscoop. Op deze manier is een bacterie niet meer op basis van de vorm te onderscheiden van verontreiniging. De detector is volledig afhankelijk van de specificiteit van de kleuring. Daarom werd gekozen voor een benadering, waarbij de bacteriën minimaal met twee kleuren worden gekleurd, en deze twee kleuringen zijn onafhankelijk van elkaar. De kleuren werden zo gekozen, dat de kans op verstoringe achtergrondsignalen minimaal is. Omdat de methode is gebaseerd op specifieke kleuring en detectie met een heel gevoelige camera met lage achtergrondruis, zou signaal van slechts één pixel voldoende kunnen zijn om te kunnen bepalen of op die plaats *E. coli* of andere bacteriën uit de coligroep zitten.

Beeldanalyse van de output van de detector moest in staat zijn om het ruwe signaal zodanig te bewerken, dat het aantal *E. coli* bacteriën en bacteriën uit de coligroep correct gekwantificeerd kan worden. Daartoe moest de software in staat zijn om signaal van achtergrond te scheiden en om signalen van de twee gebruikte kleuren te koppelen. Dit zou uiteindelijk geautomatiseerd moeten worden voor snelheid en objectiviteit.

De experimenten werden uitgevoerd in samenwerking met een consortium met buitenlandse partners, BIO-COM. Het microbiologisch deel van de KWR benadering was onderdeel van het BTO project. De ontwikkeling van het detectie-apparaat en het gebruik daarvan voor de microbiologische testen waren onderdeel van het BIO-COM project. De methode was gebaseerd op detectie van twee enzymen, β -galactosidase en β -glucuronidase, in combinatie met groei en inductie op een selectief groeimedium voor bacteriën uit de coligroep. Dit principe wordt al toegepast in gepubliceerde en in de handel verkrijgbare methoden (Tabel 1; Tryland en Fiksdal, 1998; George et al., 2000; Nelis en Van Poucke, 2000; George et al., 2001). Detectie op basis van deze twee enzymen sluit daarom aan bij eerder vergaarde kennis over de detectie van indicators voor fecale verontreiniging.

Het eerstgenoemde enzym, β -galactosidase, komt voor in de meeste bacteriën van de coligroep, inclusief *E. coli*. β -Glucuronidase komt vrijwel alleen voor in *E. coli* bacteriën, maar niet in alle *E. coli* bacteriën. In sommige studies toont 12% van de *E. coli* bacteriën geen β -glucuronidase activiteit (Pettibone, 1992; Alonso et al., 1996; Maheux et al., 2008). Schets en coauteurs vonden zelfs hogere percentages en beschouwden daarom Colilert niet geschikt voor de analyse van Nederlands water (Schets et al., 1993).

Van β -glucuronidase positieve bacteriën uit de coligroep wordt geen melding gemaakt in de literatuur. Sommige andere niet-*E. coli* bacteriën hebben β -glucuronidase activiteit, maar zolang deze niet in grote aantallen voorkomen interfereren ze niet met de reeds in de handel zijnde "snelle" testen (Tryland en Fiksdal, 1998). Mede daarom worden de bacteriën gekweekt op *E. coli*/coligroep bacteriën selectieve media (zoals bij bv. Colitag, Coliscan). Colilert gebruikt bovendien de suikers, die in de enzymsubstraten zitten, als enige koolstofbron voor groei van de bacteriën. Deze methoden zijn gevalideerd en goedgekeurd door instanties als US EPA, en worden veel gebruikt over de hele wereld (Tabel 1).

Het verschil van de methode beschreven in dit rapport met de andere methoden is, dat de hier beschreven methode gebaseerd is op dubbele fluorescentie (of luminescentie en fluorescentie) in combinatie met microkolonies op een membraanfilter. Fluorescentie methoden, en ook luminescentie methoden, zijn enige orden van grootte gevoeliger dan colorimetrische methoden, wat ook voor detectie van β -galactosidase activiteit al geruime tijd geleden is aangetoond (Rotman et al., 1963).

Voor beide enzymen zijn substraten in de handel, die een fluorescent eindproduct (probe) leveren als het substraat door het enzym wordt gesplitst. Fluorescentie is licht met een specifieke golflengte, dat ontstaat als een fluorescente probe door licht met een specifieke kortere golflengte wordt aangestraald. Voor β -galactosidase is bovendien een substraat verkrijgbaar (Galacton-Plus, Applied Biosystems), wat

na enzymatische splitsing een luminescent product oplevert, wat lichtgevend is zonder dat daarvoor een aanstralende lichtbron nodig is.

Om de specificiteit van de methode verder te verhogen werd gekozen voor een methode, die alleen licht zou genereren op plaatsen waar bacteriën van de coligroep op het filter aanwezig waren. *E. coli* kon dan van de andere coligroep-bacteriën onderscheiden worden op kleur. Het groene licht van het product van Galacton-Plus, wat geproduceerd wordt door alle bacteriën van de coligroep, zou gebruikt kunnen worden om de fluorescente probe DDAO of Resorufin (bij β -glucuronidase activiteit, geeft rood licht, alleen bij *E. coli*) te exciteren. Op deze manier zouden *E. coli* bacteriën kunnen worden aangetoond doordat het groene signaal zou samenvallen met het rode signaal. Dit fenomeen heet luminescence energy transfer (Fig. 1). De fluorescente probe DDAO heeft al een 12 keer betere signaal-ruisverhouding dan de veel gebruikte kleuring met ONPG (Gong et al., 2009). Met luminescence energy transfer zou deze signaal-ruisverhouding alleen maar verbeteren, omdat het licht, wat de probe aanstraalt, alleen wordt geproduceerd op de plaats van de microkolonie zelf. De kans op vals-positief signaal wordt hiermee verkleind.

Merksnaam	Fabrikant	US EPA methode	β -galactosidase substraat	β -glucuronidase substraat	Tijd
Modified Colitag	CPI International, Santa Rosa, California, USA	Goedgekeurd op 10 november 2009	ONPG	MUG	16 uur
Colilert-18	IDEXX, Westbrook, Maine, USA	Standard Operating Procedure 1103	ONPG	MUG	18 uur
Chromocult	Merck KGaA, Darmstadt, Duitsland	Goedgekeurd op 29 oktober 2002	Salmon-Gal	X-gluc	24 uur
Coliscan	Micrology Laboratories, Goshen, Indiana, USA	Method 9222	Red-Gal	X-gluc	24 uur
Colisure	IDEXX, Westbrook, Maine, USA	Standard Operating Procedure 1103	CPRG	MUG	24 uur
MI medium		Method 1604	MUGal	IBDG	24 uur

Tabel 1: US EPA goedgekeurde tests voor *E. coli* en bacteriën uit de coligroep, gebaseerd op de activiteiten van β -galactosidase en β -glucuronidase in combinatie met selectieve groei/inductie media. Naast de hier genoemde snelle methodes Colilert-18 en Modified Colitag zijn ook US EPA goedgekeurde 24-uurs-methoden, respectievelijk Colilert en Colitag, in de handel. CPRG = chlorophenolred- β -D-galactopyranoside; IBDG = indoxyl β -D-glucuronide; MUG = 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide; MUGal = 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside; ONPG = *o*-nitrophenol- β -D-galactoside; Red-Gal = Salmon-Gal = 6-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside; X-gluc = 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide.

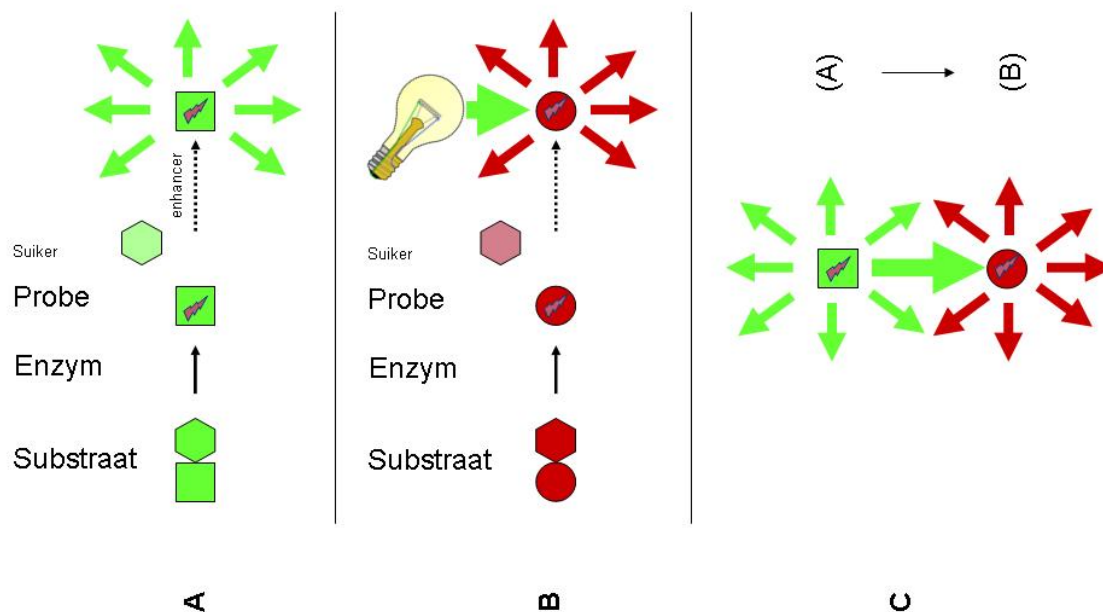


Fig. 1: Principles in optische detectie. Zowel de luminescentie als de fluorescentie methode is gebaseerd op groei op *E. coli*/coligroep bacteriën groeimedium en op splitsing van substraat door een *E. coli*/ coligroep bacteriën specifiek enzym. Het enzym β -galactosidase wordt door bacteriën van de coligroep, inclusief *E. coli* gevormd. Het enzym β -glucuronidase is specifiek voor *E. coli*. Na groei is de eerste stap bij beide methodes de splitsing van een β -galactoside, resp. β -glucuronide substraat. Hierdoor komt een suiker en een probe vrij. **A:** Luminescentie: De probe kan licht geven over een specifiek golflengtegebied door de toevoeging van een chemische stof; **B:** Fluorescentie: door aanstralen van de probe met (lamp)licht van een specifieke, kortere, golflengte gaat de probe licht uitstralen met een specifieke, langere, golflengte; **C:** Luminescence energy transfer kan optreden als het aanstralende licht voor de fluorescente probe (B) niet afkomstig is van een lamp maar van een luminescente probe (A). Als energy transfer optreedt ziet een camera twee kleuren: van de luminescente probe met een kortere golflengte (hier: groen) en van de fluorescente probe met een langere golflengte (hier: rood).

BIO-COM partners van de universiteit van Lille (ProBioGEM) zouden gaan werken aan een andere benadering: detectie van verschillende *Bacillus* soorten met behulp van fluorescentie *in situ* hybridisatie (FISH) en fluorescent gelabelde monoclonale antilichamen. Deze technieken zouden –als alternatief voor de enzymatische methode- relatief gemakkelijk vertaald kunnen worden naar detectie van *E. coli*. Deze methoden kunnen ook snel zijn, mogelijk zelfs sneller dan de enzymatische methode, maar ze stellen hogere eisen aan de technische vaardigheden van de gebruiker. Maar vooral het feit, dat ze niet tot nauwelijks in staat zijn dode van levende bacteriën te onderscheiden, maakt deze twee methoden minder geschikt voor de detectie van *E. coli* in drinkwater.

Naast detectie van *E. coli* werd ook voorbereidend werk gedaan voor een project om een snelle specifieke detectiemethode voor *Cryptosporidium* oöcysten te ontwikkelen. Getest werd of *Cryptosporidium* oöcysten zichtbaar gemaakt konden worden met de detector van *E. coli*. Een geschikte *Cryptosporidium* detectie methode zou, net als eerder aangegeven voor *Bacillus*, gebaseerd zijn op detectie met behulp van FISH en fluorescent gelabelde antilichamen.

De standaard FISH procedure (Amann et al., 1995) kost meer dan 2.5 uur, waarbij fixatie (1.5 uur) en hybridisatie (1 uur) de snelheidsbepalende stappen zijn. Snellere FISH methodes zijn wel gepubliceerd, waaronder een methode om geslachtschromosomen te detecteren met hybridisatie van 1 minuut (Liu et al., 1998). Een methode om pathogenen in bloed te detecteren had een 18 minuten hybridisatiestap en een totale proceduuretijd van minder dan 1 uur (Peters et al., 2006). Voor *Cryptosporidium* detectie zijn meerdere FISH methoden ontwikkeld, maar deze worden nog niet in de drinkwaterwereld gebruikt (Deere et al., 1998; Vesey et al., 1998; Graczyk et al., 2003; Smith et al., 2004).

In de geteste benadering voor *Cryptosporidium* detectie is de gelijktijdige toepassing gebruikt van een versnelde FISH methode en antilichamen (Graczyk et al., 2003). Op deze manier zou de totale kleuringstap verkort kunnen worden tot minder dan één uur.

1.2 Projectdoelen

- Een methode voor een gevoelige, snelle, specifieke kleuring van levende *E. coli*.
- Een optische sensor voor momentane detectie van *E. coli*.
- Een veldkit voor monsternamen, opwerking en detectie van *E. coli* in water.

2 Materiaal en methoden

2.1 Media, inducers en substraten

Selectieve media voor bacteriën van de coligroep en *E. coli* in dit onderzoek waren Colicult™ (Van Poucke en Nelis, 1997) en lauryl sulfate agar (LSA, Oxoid) met en zonder phenol red. Het gebruikte niet-selectieve medium was Lab-Lemco agar medium (LLA, Oxoid). Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Sigma-Aldrich, Zwijndrecht) werd gebruikt voor inductie van β -galactosidase en p-nitrophenyl-mono- β -D-glucuronide (PNPG, Sigma-Aldrich, Zwijndrecht) voor inductie van β -glucuronidase. Deze stoffen werden voor het begin van de proeven uitgestreken over de agarplaat.

Fluoresceïn-di- β -galactoside (Invitrogen) is een substraat voor β -galactosidase, dat na enzymatische splitsing fluoresceïn vormt, met maximum excitatie golflengte 490 nm en maximum emissie golflengte 514 nm. DDAO- β -glucuronide (Invitrogen) werd gebruikt als substraat voor β -glucuronidase. Dit substraat levert na enzymatische splitsing 7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one) (DDAO), wat een breed excitatie maximum heeft van 550 tot 650 nm, en maximum emissie bij 670 nm. De grote Stokes-shift (het verschil tussen excitatie en emissie golflengtes) van DDAO maakt de probe minder gevoelig voor autofluorescentie in het monster.

In de loop van 2009 bleek, dat DDAO- β -glucuronide niet meer wordt geproduceerd. Daarom is als alternatief 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG, Brenner et al., 1993) gebruikt voor de laatste experimenten. De excitatie- en emissie-golflengten voor MUG zijn respectievelijk 365 en 453 nm.

2.2 Fluorimeter tests voor luminescence energy transfer

Luminescentie en fluorescentie werden getest in een SLM Aminco SPF-500C fluorimeter bij de vakgroep Biochemie van Membranen van de Universiteit Utrecht.

De luminescente probes waren: luciferine-luciferase (Promega, Leiden), Lumi-gal 530 (Lumigen, Southfield, Michigan, USA) en Galacton-Plus (Applied Biosystems). De eerste twee probes hebben het luminescentie maximum bij respectievelijk 560 en 530 nm. Het luminescentie maximum voor Galacton-Plus is afhankelijk van de gebruikte enhancer: met SapphireII is dit maximum 461 nm, met EmeraldII is het maximum 542 nm. De substraten Lumi-gal 530 en Galacton-Plus werden direct vóór de test omgezet in luminescente probe met behulp van toegevoegd β -galactosidase.

De fluorescente probes (allen van Invitrogen, Leiden) waren: Fluoresceïn (excitatie 490 nm, emissie 514 nm), DDAO (excitatie 550-650 nm, emissie 670 nm) of Resorufin (excitatie 525-570 nm, emissie 580 nm).

2.3 Bacteriestammen

De stammen, die werden gebruikt voor de tests waren: *Escherichia coli* WR1 (β -galactosidase positief en β -glucuronidase positief) en *Enterobacter cloacae* WR3 (β -galactosidase positief en β -glucuronidase negatief), stammen die oorspronkelijk waren geïsoleerd uit drinkwater (Schets et al., 2002), en *E. coli* JM109 (Yanisch-Perron et al., 1985) (β -galactosidase negatief door genetische modificatie, en β -glucuronidase positief). Stocks werden gemaakt in LSB medium and bewaard bij -80°C. De gebruikte concentraties waren 100, 400 and 300 cellen/ml, voor respectievelijk WR1, WR3 and JM109. Per filter gebruikten we 100 μ l uit de stock. Overnacht kweek op rijk medium gebeurde in Lab Lemco Broth (LLB, Oxoid) medium. Filters werden geïncubeerd op Modified Scholtens' Agar (MSA, Havelaar en Hogeboom, 1983), Lab Lemco Agar (LLA, Oxoid), Lauryl Sulphate Agar (LSA, Oxoid) en mColicult (Van Poucke en Nelis, 1997).

2.4 Procedure (fluorescentie)

100 ml drinkwater met daarin geresuspendeerde cellen werd gefiltreerd over een membraanfilter, zwart mixed cellulose ester (nitrate/acetate) (HABP, 0.45 μ m) of zwart polycarbonaat (GTBP, 0.2 μ m) (beiden van Millipore, Amsterdam). Het membraanfilter werd overgebracht naar een agar plaat met groei medium en 0.01% IPTG and 0.05% PNPG en 4 tot 8 uur geïncubeerd bij 37°C.

Vervolgens werd het membraanfilter overgebracht naar een 25 mm papieren schijfje (No 597, Schleicher and Schüll, s'-Hertogenbosch), dat was verzadigd met 100 μ l oplossing van 0.5 mg/ml fluorogeen substraat en 1 mg/ml polymyxine sulfaat B (Van Poucke en Nelis, 1997) in 50 mM fosfaat buffer pH 7.4.

Het geheel werd 30 min geïncubeerd bij 37°C in een afgesloten petrischaal om verdamping te voorkomen. Om de intensiteit van het signaal te verhogen werd het membraanfilter overgebracht naar een ander 25 mm papieren schijfje wat verzadigd was met 100 µl 0.2 M glycine buffer pH 9.2. Direct daarop werd het membraanfilter gelegd op een microscoopglasje en gefotografeerd met het camera systeem. De sluitertijd varieerde van 1 tot 10 seconden.

2.5 Procedure (luminescentie)

De procedure voor luminescentie metingen was vergelijkbaar met die voor fluorescentie. In deze procedure werden witte polycarbonaat filters gebruikt (GTTP, Millipore). Het membraanfilter werd na de groeistap overgebracht naar een 25 mm papieren schijfje (No 597, Schleicher and Schüll), dat was verzadigd met 100 µl oplossing van 100x verdund luminogeen substraat Galacton-Plus met 1 mg/ml polymyxine sulfaat B in 50 mM fosfaat buffer pH 7.4. Na 30 min incubatie bij 37°C werd het membraanfilter 10 minuten gedroogd bij 60°C. Vervolgens werd het filter geplaatst op een 25 mm papieren schijfje wat verzadigd was met 100 µl EmeraldII (Applied Biosystems) : piperidine : water (1:2:7 bij volume). Direct daarop werd het membraanfilter gelegd op een microscoopglasje en gefotografeerd met het camera systeem. De sluitertijd varieerde van 10 seconden tot 10 minuten.

2.6 Toevoegingen ter versnelling van bacteriegroei

Om bevordering van de groeisnelheid te testen werden potentieel groeibevorderende stoffen toegevoegd aan 100 ml LSB van 37°C. Vervolgens werd dit mengsel geïncubeerd met bacteriën. Na 1 uur, dat is juist vóórdat de eerste deling zou plaatsvinden werd de suspensie gefiltreerd over GTBP filter en 6 uur geïncubeerd op LSA bij 37°C. De rest van de procedure was gelijk aan de procedure voor fluorescentie. Deze stoffen waren: Na-pyruvaat (0.5%), Gist extract (0.5%), Na-sulfiet (50 µg/ml), een mengsel van de vorige stoffen (Na-pyruvaat, Gist extract en Na-sulfiet), catalase (10 U/ml), β-lactoglobulin (hoofdbestanddeel melkpoeder, 2 mg/ml), TDPA (3,3'-thiodipropionische acid, 1%), LLA zonder extra toevoegingen, Water (negatieve controle).

2.7 Detectie apparaat en databewerking

Foto's werden gemaakt met een speciaal voor dit project door Lheritier (Cergy Pontoise, Frankrijk) ontwikkeld camera systeem (Fig. 2). De camera beschikt over een gekoelde beeldchip en heeft mede daarom een zeer laag achtergrond signaal. Foto's konden worden gemaakt met een dynamisch bereik van 16 bit in grijswaarden. Het systeem bevat optische filtersets, die op maat zijn gemaakt voor de fluorescentie karakteristieken van de gebruikte probe. Het systeem heeft ruimte voor twee verschillende filtersets. Bij gebruik van dubbellabeling werd met iedere optische filterset een aparte foto gemaakt zonder het preparaat te verschuiven.

De gemaakte afbeeldingen werden bewerkt met ImageJ (Rasband, 1997-2009), waarvan werd gebruikt versie 1.43e met MacBiophotonics plug-ins (<http://www.macbiophotonics.ca/downloads.htm>). Eerst werd de achtergrond gecorrigeerd naar een 32-bit afbeelding (afbeelding *minus* zwarte achtergrond, 16-bit) gedeeld door (witte achtergrond *minus* zwarte achtergrond, 16-bit), gevolgd door handmatige aanpassing van helderheid en contrast. Deze afbeelding werd bewaard als 16-bit of 8-bit. In een aantal gevallen werd Cinepaint (<http://www.cinepaint.org/>) gebruikt voor 16-bit niet-lineaire (sigmoidale) contrastcorrectie. Bij dubbellabeling werden, met behulp van de Colocalization Highlighter plug-in in ImageJ, de afbeeldingen van beide probes in *false colour* over elkaar gelegd (groen voor β-galactosidase en rood voor β-glucuronidase activiteit). Op de plaatsen waar co-localisatie optrad, bij microkolonies van *E. coli*, werd de afbeelding wit gekleurd ter verhoging van het contrast.

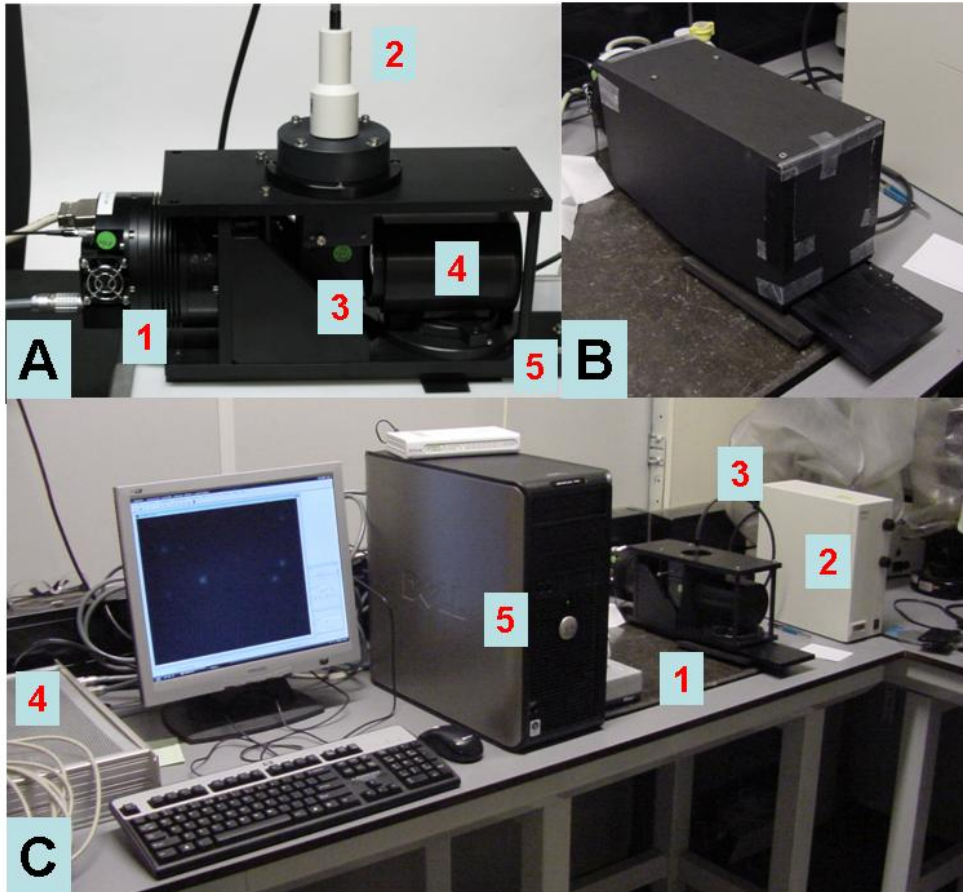


Fig. 2. Detectie apparaat. **A:** Detector zoals gebruikt voor fluorescentie metingen, met optische componenten. 1: gekoelde-CCD camera, 1024x1024 pixels, 16-bit dynamisch bereik, zwart-wit; 2: glasfiber uit de externe lichtbron; 3: fluorescentie filterblokken, met filters specifiek voor iedere gebruikte fluorescente probe; 4: condensor lensstelsel; 5: monsterhouder, het monster op een objectiefglas wordt op deze plaats onder de condensor geschoven; **B:** Detector zoals gebruikt voor luminescentie metingen. Hier is geen externe lichtbron nodig, en de camera is door middel van zwart karton afgeschermd van storende lichtbronnen; **C:** Meetopstelling. 1: camera; 2: externe lichtbron; 3: glasfiber van lichtbron naar de camera; 4: voeding; 5: computer met Lheritier Digiphot software om opnames te maken en ImageJ software (Rasband, 1997-2009) voor fotobewerking; niet zichtbaar op de foto: cameracontroller.

2.8 *Cryptosporidium* telling met detectie apparaat

Cryptosporidium parvum oöcysten (Waterborne, Inc., New Orleans, USA) werden gekleurd met EasyStain (BTF, North Ryde NSW, Australië) en de suspensie werd gepipetteerd op een SingleSpot Slide (IDEXX, Hoofddorp) en afgedekt met een dekglasje. Het gebruikte label in deze methode is FITC. Het preparaat werd gefotografeerd met het detectie apparaat en de oöcysten werden ook handmatig geteld met behulp van een fluorescentie microscoop (Leica DMRXA) voorzien van een FITC filter. De opname van de camera werd met ImageJ als volgt bewerkt: Een cirkel ter grootte van de well in de SingleSpot Slide werd geselecteerd en het deel van de foto buiten de cirkel werd softwarematig verwijderd. Vervolgens werd de Ecoli analysis plug-in gebruikt met als parameters Max size 10, Min circularity 0.75, Threshold Otsu, BG correct original. De automatische telling werd vergeleken met de handmatige telling.

2.9 Snelle *Cryptosporidium* dubbellabeling met FISH en antilichamen

Cryptosporidium oöcysten (Waterborne, Inc., New Orleans, USA) werden gefixeerd en permeabel gemaakt in 50% ethanol-PBS (PBS = Phosphate Buffered Saline: 130 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer pH 7.4), en 10 min geïncubeerd bij 80°C. Vervolgens werd het monster gewassen met hybridisatie-buffer (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.05% SDS, pH 7.2). Hybridisatie gebeurde 30 min bij 48°C in voorverwarmde hybridisatie-buffer. De gebruikte FISH probe was EUK519 en het gebruikte antilichaam was EasyStain (BTF). Het label aan de FISH-probe was Cy3 en de antilichamen waren gelabeld met FITC.

Na hybridisatie volgde een wasstap en 10 min incubatie in PBS. Het monster werd op een microscoopglasje gebracht, mounting medium werd toegevoegd, afgedekt met een dekglasje en bekeken met een Leica DMRXA microscoop. Om FISH kleuring te onderscheiden van de antilichaam labeling werden afbeeldingen gemaakt met respectievelijk een Cy3 en een FITC filter. De afbeeldingen werden over elkaar heen gelegd, waarbij FISH rood en antilichamen groen werden weergegeven.

3 Resultaten en discussie

3.1 Fluorimeter tests

Eerst werd getest of het groene licht van een luminescente probe gebruikt kon worden om een door groen licht exciteerbare fluorescente probe aan te stralen, die vervolgens rood licht zou gaan uitzenden (Fig. 1). Daarom werden spectra genomen van de mogelijke combinaties van probes zoals ze gebruikt zouden worden voor deze studie. Voor ieder van deze probes was een enzymsubstraat in de handel, wat door β -galactosidase of β -glucuronidase omgezet zou kunnen worden in deze probe.

De intensiteit van het signaal van Lumi-gal na omzetting van het substraat met β -galactosidase was niet hoger dan 4 keer de achtergrond (data niet weergegeven). Ook al was de probe in staat om DDAO te exciteren, het signaal was zo laag (1.2 maal de achtergrondruis), dat dit substraat niet gebruikt kon worden voor luminescence energy transfer. Ook in een luminometer was de signaalsterkte van Lumi-gal 530 na incubatie met het enzym β -galactosidase minstens 10 keer lager dan van Galacton-Plus bij dezelfde behandeling.

Beide andere luminescente probes konden wel een duidelijk detecteerbaar signaal leveren. Luciferase-luciferine was in staat om DDAO te exciteren (Fig. 3A), maar deze combinatie was niet geschikt voor verdere tests, omdat bij de emissie-golflengte van DDAO nog een duidelijk signaal meetbaar was van de brede piek van luciferase-luciferine.

Galacton-Plus wordt door β -galactosidase omgezet in een reactieproduct. Het product heeft een stof nodig, die luminescentie opwekt, een enhancer. In dit project waren twee enhancers relevant: *SapphireII* en *EmeraldII*. De eerste geeft een blauwe luminescentie piek rond 450 nm (Fig. 3B), de tweede een groene piek rond 540 nm (Fig. 3C). Met *SapphireII* kon Fluoresceïn aangestraald worden, wat detecteerbaar was als toename van het groene signaal (Fig. 3B). Dit principe blijkt ook door de producent te worden gebruikt in de enhancer *EmeraldII*, waar een fluorescente stof, waarschijnlijk Fluoresceïn, aan is toegevoegd om licht in het groene deel van het spectrum te genereren. Het groene licht van het reactieproduct van Galacton-Plus met *EmeraldII* kon worden gebruikt voor de excitatie van zowel DDAO als Resorufin (Fig. 3C en 3D), die dan respectievelijk een donkerrood en oranje-rood licht produceerden. Bij berekening van het signaal met en zonder probe geeft toevoeging van DDAO tussen 645 en 750 nm een verhoging van de intensiteit met een factor 3.7 per μg DDAO/ml. Resorufin geeft tussen 610 en 750 een factor 3.9 per μg Resorufin/ml verhoging, dus in dezelfde orde van grootte. Fluoresceïn geeft met *SapphireII* tussen 505 en 750 nm minder verhoging met een factor 2.6 per μg Fluoresceïn/ml (zie grijze balken in Fig. 3B-D). Resorufin en DDAO zijn daarom betere probes voor luminescence energy transfer dan fluoresceïne. Resorufin geeft een sterker signaal rond 600 nm dan DDAO boven 645 nm, maar bij deze golflengte zou het restsignaal van Galacton-Plus met enhancer een hoge achtergrond geven, wat interpretatie zou kunnen bemoeilijken. Daarom werd de combinatie Galacton-Plus met *EmeraldII* en DDAO het meeste gebruikt voor vervolgprouven.

Het blauwe signaal van Galacton-Plus met enhancer (*SapphireII*) kon niet worden gecombineerd met een gelijktijdige meting van de groene kleur van luciferase-luciferine. Toevoeging van de enhancer belemmerde de luciferase-luciferine enzymreactie, waardoor geen signaal van luciferase en luciferine meer detecteerbaar was (Fig. 3A, groene curve).

3.2 Luminescentie tests met membraanfilters

In dit project varieerden de aantallen bacteriën op de filters van ca. 10 tot 100. Microkolonies waren separaat te onderscheiden en te tellen. In enkele specifieke gevallen bevatte het monster meer dan 10^4 bacteriën, en dan was het signaal confluent.

3.2.1 Tests van luminescente substraten

Lumi-gal 530 en Galacton-Plus werden getest met microkolonies van *E. coli* bacteriën op GTTP en Nylaflo membraan filters. Met Lumi-gal 530 werd geen signaal waargenomen. Met Galacton-Plus was het signaal zwak, maar detecteerbaar (Fig. 4). Luminescente microkolonies van bacteriën, die overnacht gekweekt waren in LLB bij 37°C uit een voorcultuur, gefiltreerd op een GTTP filter en vervolgens gegroeid op LLA, konden worden gedetecteerd na 6 uur.

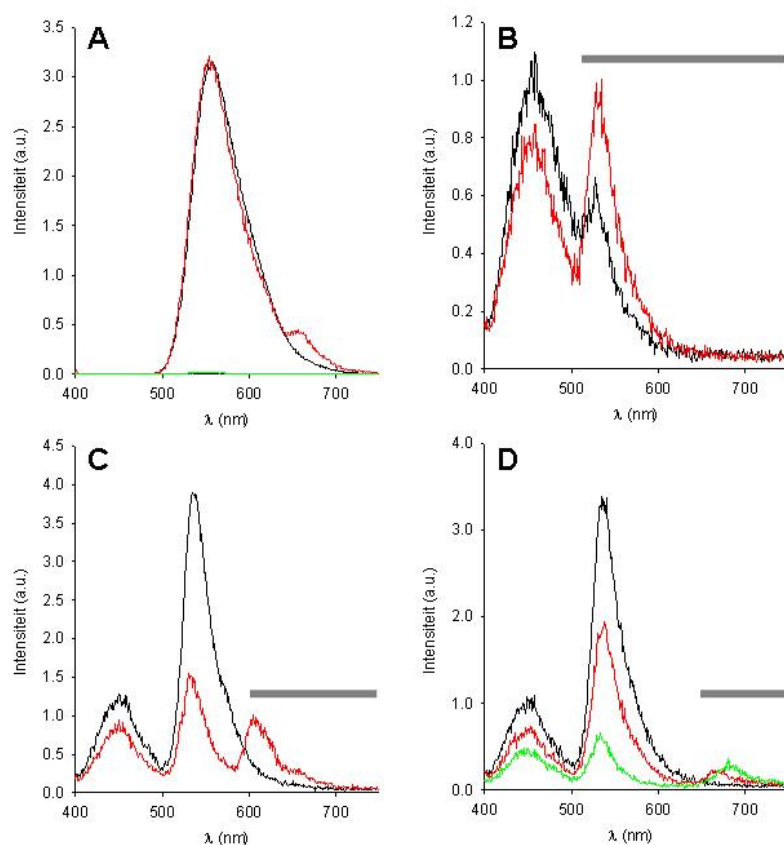


Fig. 3: Luminescence energy transfer tests met de fluorimeter. (λ = golflengte; a.u. = arbitrary units). Het luminescente reactieproduct (hier van de substraten Luciferase-luciferine of Galacton-Plus) geeft licht met hogere energie, dus een relatief korte golflengte (piek links in de grafiek). Bij energy transfer kan deze energie overgedragen worden naar een fluorescente reactieproduct (van verschillende β -galactosidase of β -glucuronidase substraten). Het fluorescente reactieproduct geeft vervolgens licht af met iets lagere energie, dus een langere golflengte, rechter piek in de grafieken). **A:** Luciferase-luciferine (zwart) met DDAO (rood, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$). SapphireII (enhancer voor Galacton-Plus) blokkeert de activiteit van luciferase-luciferine (groen); **B:** Galacton-Plus en SapphireII (zwart) met Fluorescein (rood, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$); **C:** Galacton-Plus en EmeraldII (zwart) met Resorufin (rood, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$); **D:** Galacton-Plus en EmeraldII (zwart) met DDAO (rood, 2.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$; groen, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$). De grijze balken geven de golflengten aan, waarover de efficiëntie van de intensiteitsverhoging is gemeten.

Luminescentie metingen gaven grote problemen in de reproduceerbaarheid. Luminescentie was wel aanwezig in experimenten met Galacton-Plus. Dat was gemeten door het membraanfilter na incubatie en toevoeging van EmeraldII enhancer te bedekken met huishoudfolie en de totale lichtopbrengst van het monster te meten in een luminometer.

Met fluorimeter tests was aangetoond, dat luminescentie zou kunnen dienen als lichtbron voor een fluorescente probe. Dit zou kunnen als de lichtintensiteit van de luminescentie hoog zou zijn met daarbij een hoge concentratie van de fluorescente probe. In geen van de metingen was het luminescentie signaal hoog genoeg om dit doel te bereiken. Bovendien waren aan het begin van het project de verwachtingen voor de gevoeligheid van de detector hoger, dan wat er in de praktijk uitkwam.

Zeer recentelijk is een luminescent substraat voor β -glucuronidase ontwikkeld door Applied Biosystems, maar dat hebben we nog niet kunnen testen.

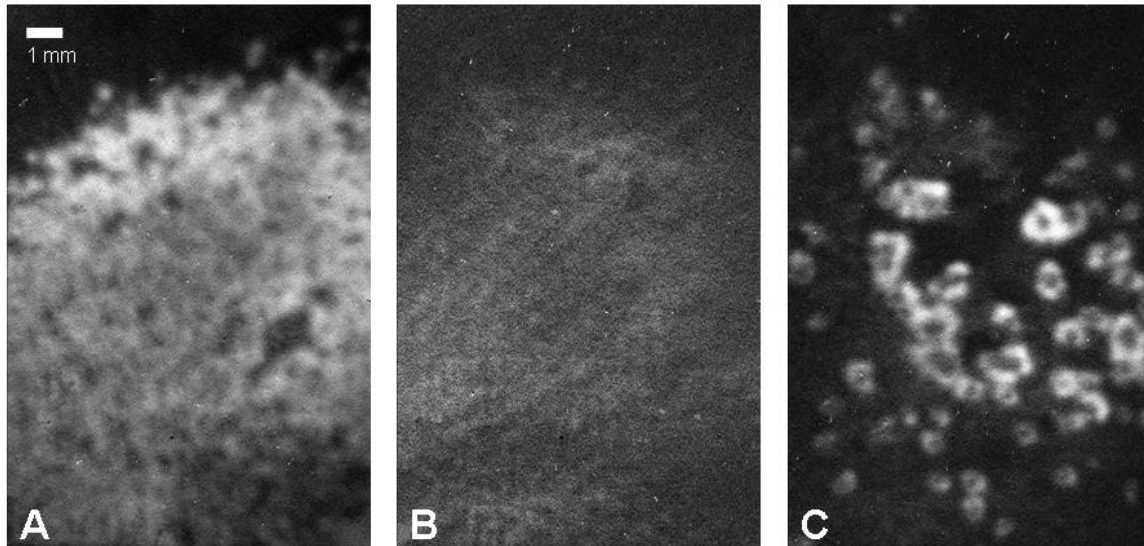


Fig. 4: Luminescentie tests met *E. coli* WR1, Galacton-Plus en EmeraldIII. De bacteriën groeiden op een GTTP filter op LLA medium. Belichtingstijd in alle gevallen: 10 min. **A:** 10.000 cellen per filter, cultuur uit LLB voorcultuur, 6 uur gegroeid bij 37°C. Het aantal cellen is zo hoog dat een confluent signaal ontstaat. Aan de rand zijn een aantal losse microkolonies zichtbaar; **B:** 10.000 cellen per filter, cultuur uit drinkwater, 8 uur gegroeid bij 37°C. Microkolonies zijn niet zichtbaar; **C:** 100 cellen per filter, cultuur uit LLB voorcultuur 8 uur gegroeid bij 37°C. Door de lange groeitijd zijn kolonies zo groot, dat ze zichtbaar zijn als cirkels. Galacton-Plus lijkt alleen langs de randen van de microkolonies te zijn omgezet in luminescente probe. De reden voor dit fenomeen is onbekend. Mogelijk zijn vooral cellen aan de buitenkant van een kolonie actief, of de ringvormige kolonies zijn een artefact als gevolg van beperkte diffusie van één of meerdere componenten, die verantwoordelijk zijn voor het ontwikkelde licht.

3.3 Fluorescentie tests met membraanfilters

3.3.1 Onderscheid tussen *E. coli* en bacteriën van de coligroep

Monsters met *E. coli* WR1, *E. cloacae* WR3 en *E. coli* JM109, en met een mengsel van WR1 en WR3, werden gefiltreerd. WR3 bacteriën bevatten alleen het gen voor β -galactosidase, JM109 bevat alleen een actief gen voor β -glucuronidase en WR1 bevat beide genen. Microkolonies van WR1 en WR3 konden worden gedetecteerd met Fluoresceïn-di- β -D-galactoside substraat, en microkolonies van WR1 en JM109 met DDAO- β -D-glucuronide substraat (Fig. 5).

WR3 en JM109 vormden kleinere microkolonies dan WR1. In eerdere tests bleek dat ook *Salmonella* WG49 (geacht β -galactosidase en β -glucuronidase negatief te zijn) slechter groeide dan WR1. Bovendien waren β -galactosidase tests met dit organisme onduidelijk, want op platen met IPTG en X-gal waren sommige kolonies blauw en andere niet. Dit was reproduceerbaar als een reingestreekte witte kolonie bewaard was bij -80°C en weer opnieuw uitgeplaat, dus het was geen infectie. Daarom werd besloten WG49 niet verder te gebruiken.

Andere *E. coli* en coligroep bacteriën zijn nog niet getest. Voor de Nederlandse situatie zou het geen groot probleem zijn als niet-*E. coli* bacteriën van de coligroep slechter zouden groeien, want deze bacteriën worden niet gebruikt als indicator voor fecale verontreiniging. JM109 is een genetisch gemodificeerde *E. coli* stam, maar als andere *E. coli* bacteriën ook minder snel groeien zou dit de minimale analysetijd verhogen.

Parallele incubatie van WR1 en WR3 bacteriën op LLA plaat en detectie met GTBP en HABP filters leverde in beide gevallen een gelijk aantal microkolonies. Eerdere tests met AABP filters met poriëgrootte 0.8 μm gaf een aantal microkolonies, dat minder dan de helft was van het aantal kolonies op plaat. Dat was te wijten aan de te grote poriën van het filter.

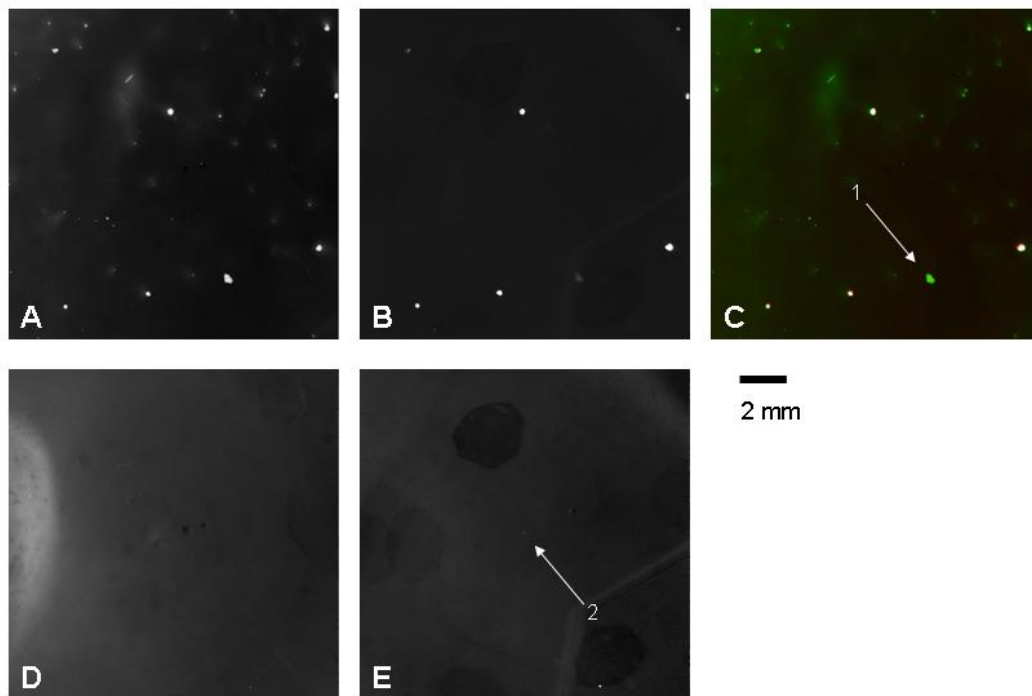


Fig. 5: Groei van *E. coli* WR1, *E. cloacae* WR3 en *E. coli* JM109, HABP filters. **A:** WR1 en WR3 na 7 uur groei, opname gemaakt met FITC (Fluoresceïn) filter. Signaal is zichtbaar daar waar β -galactosidase activiteit is (*E. coli* en bacteriën van de coligroep, hier: WR1 en WR3, omzetting van Fluoresceïn-di- β -D-galactopyranoside); **B:** WR1 en WR3 als bij A, maar met DDAO filter. Signaal is zichtbaar daar waar β -glucuronidase activiteit is (*E. coli*, hier: WR1, omzetting van DDAO- β -D-glucuronide); **C:** Combinatie van A en B. Colocalisatie (wit) duidt op activiteit van beide enzymen, i.e. WR1. Het groene signaal is afkomstig van niet-*E. coli* bacteriën van de coligroep, dus WR3. Omdat WR3 kolonies kleiner zijn, zijn ze moeilijker te tellen. Sommige kolonies zijn vreemd van vorm en hebben een afwijkende grootte, zeer waarschijnlijk is een dergelijk signaal afkomstig van vervuiling (1). Uiteindelijk moet software bepalen of het signaal vals-positief of echt is; **D:** JM109 na 6 uur groei, β -galactosidase. Geen microkolonies zichtbaar; **E:** JM109 na 6 uur groei, β -glucuronidase. Kleine microkolonies zijn te onderscheiden (2).

3.3.2 Media

Getest werden incubaties van filters op LLA, LSA, MSA en mColicult (Van Poucke en Nelis, 1997). De kleurstof (fenolrood) in LSA interfereerde met de fluorescentietests, daarom werd dit medium gebruikt zonder kleurstof. Microkolonies waren kleiner op MSA. Groei op de drie andere media was even snel. LSA en mColicult zijn selectief voor *E. coli* en bacteriën van de coligroep. Beide types media zijn geschikt en beide zijn ook gebruikt in vervollexperimenten.

3.3.3 Filters

Groei van *E. coli* WR1 bacteriën op HABP en GTBP membraanfilters leverde in beide gevallen na 6 uur microkolonies op. Bij HABP filters waren de microkolonies bolvormig, bij GTBP spreidden de bacteriën zich meer over het oppervlak (Fig. 6). Door de spreiding over het oppervlak was het signaal van de microkolonies intenser, dus beter detecteerbaar. Daarom werd besloten verder te gaan met GTBP membraanfilters.

In eerdere tests was gebleken, dat AABP filters, die bestaan uit hetzelfde materiaal als HABP, maar met poriegrootte 0.8 μm , niet geschikt waren voor *E. coli* detectie, omdat een deel van de bacteriën door het filter spoelde. De witte filters GTTP (zelfde materiaal als GTBP) en Nylaflo (Nylon, poriegrootte 0.45 μm) produceerden een zeer hoog achtergrondsignaal bij fluorescentietests en waren daarom ook niet geschikt.

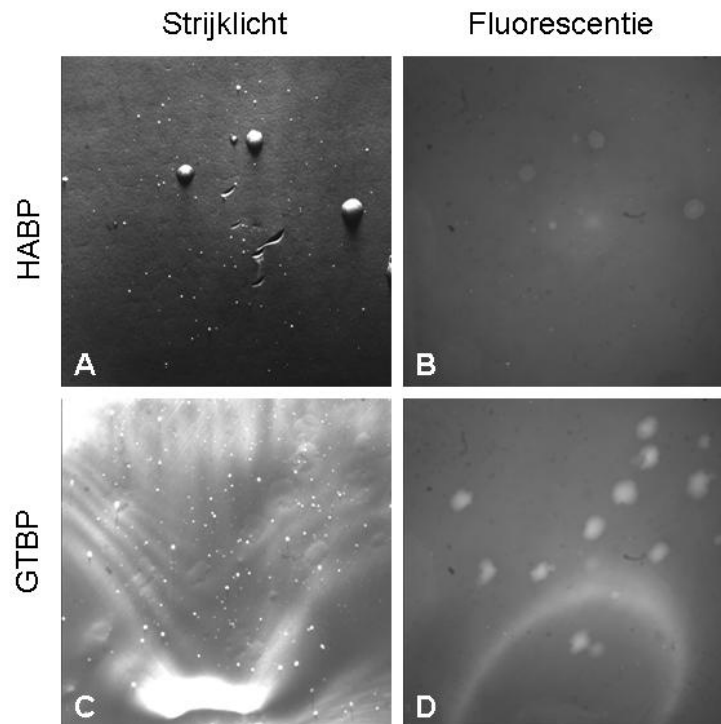


Fig. 6: Vorm van WR1 microkolonies op HABP en GTBP filters en het effect op de signaalintensiteit. Incubatietijd 7 uur, Fluoresceïn fluorescentie (β -galactosidase). A: HABP filter, strooilicht; B: HABP filter; C: GTBP filter, strooilicht; D: GTBP filter. HABP filters geven dichtere kolonies, maar GTBP filters geven een beter detecteerbaar fluorescentie signaal.

3.3.4 Toevoegingen ter versnelling van bacteriegroei

Verschillende mogelijk groeibevorderende stoffen werden toegevoegd aan LSB medium, wat vervolgens werd geïnoculeerd met WR1 cellen. De geteste stoffen waren in eerdere studies gebruikt (Brewer et al., 1977; Rayman et al., 1978; McDonald et al., 1983; Edberg en Edberg, 1988; Camper et al., 1991; Ibrahim en Bezkorovainy, 1994; Van Poucke en Nelis, 1997). Ze zouden groei van bacteriën kunnen versnellen door verkorting van de lag-fase, maar ze zouden ook een positief effect kunnen hebben op de opwekking van beschadigde bacteriën in het monster (Pagel et al., 1982; Özkanca et al., 2009). Het geheel werd na 1 uur incubatie gefilterd. Bij langere incubatie gingen de bacteriën delen (data niet weergegeven), en dan zou de methode niet meer kunnen bepalen wat het originele aantal bacteriën in het monster was.

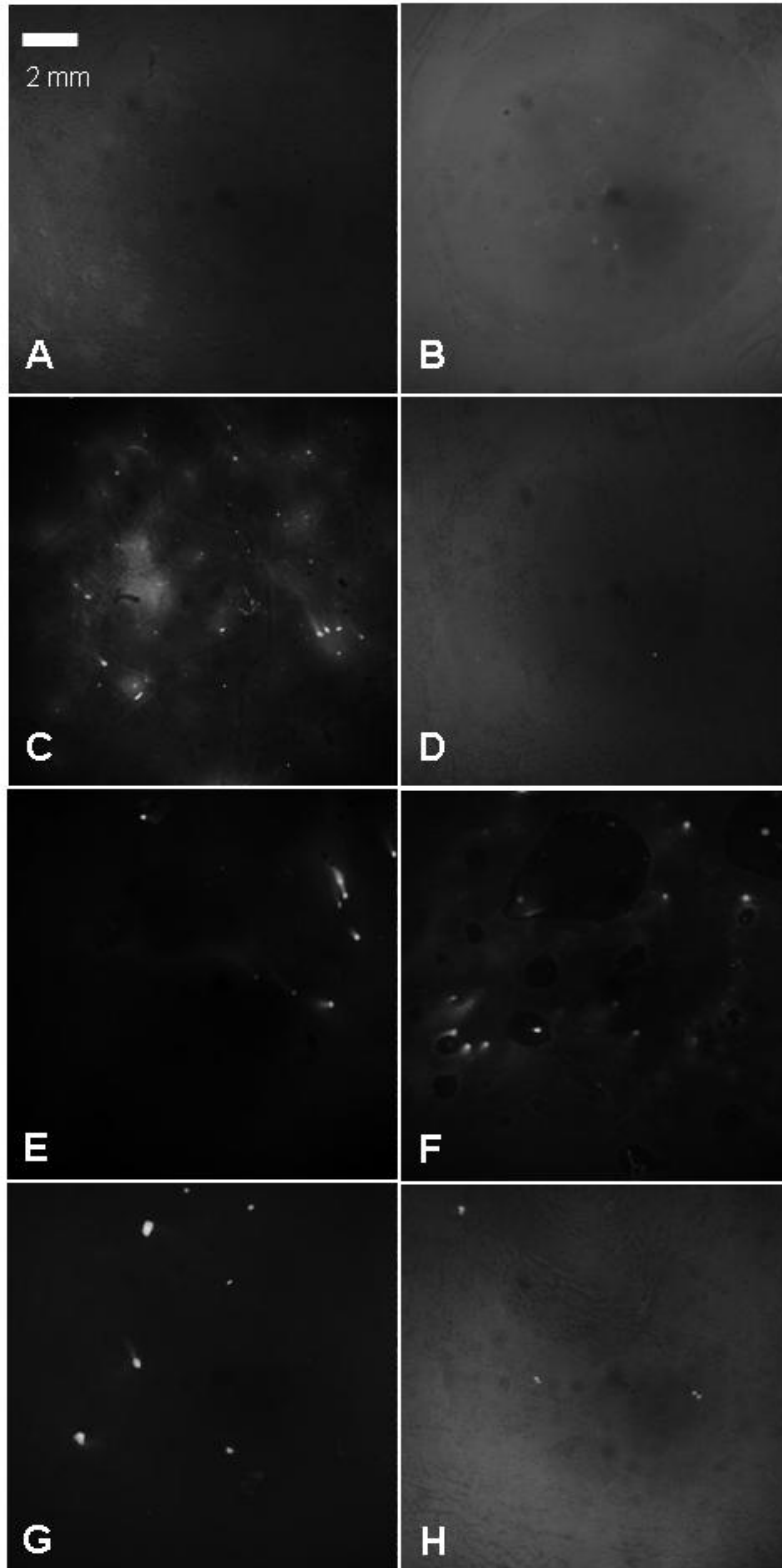


Fig. 7: Resultaten bij verschillende incubatietijden. *E. coli* WR1, β -galactosidase activiteit (omzetting van Fluoresceïn-di- β -D-galactopyranoside), GTBP filter, mColicult medium. Resultaten verkregen uit verschillende experimenten. Na de incubatiestap werden de monsters 30 minuten geïncubeerd met substraat. **A, B:** 5 uur incubatie. kolonies zijn niet tot nauwelijks zichtbaar; **C:** 5 uur 50 min incubatie; **D, E, F:** 6 uur incubatie; **G:** 6 uur 40 min incubatie; **H:** 7 uur incubatie. Microkolonies duidelijk zichtbaar na ca. 6 uur incubatie. A, D en H waren uit één experiment, in deze monsters waren de microkolonies duidelijk kleiner.

Toegevoegd werden Na-pyruvaat (H_2O_2 verwijderaar), Gist extract (voedselrijk, H_2O_2 verwijderaar, redelijk ongedefinieerd, dus mogelijk meer groeibevorderende eigenschappen), Na-sulfiet (cel wand reparatie), een mengsel van Na-pyruvaat - Gist extract - Na-sulfiet, catalase (H_2O_2 verwijderaar), β -

lactoglobulin (bevordert groei in bifidobacteria met onbekend mechanisme (Ibrahim en Bezkorovainy, 1994)) of TDPA (H₂O₂ verwijderaar). Na één uur werd het geheel gefiltreerd en werden de filters volgens de hierboven beschreven procedure geïncubeerd, gekleurd en geanalyseerd. Geen enkele toevoeging resulteerde in grotere of kleinere microkolonies dan bij de controle waarbij de cellen 1 uur waren geïncubeerd in rijk medium, LLB, dus een significante verkorting van de analysetijd voor fluorescentie detectie was niet mogelijk.

Geen van de geteste stoffen kon de groei van de bacteriën significant versnellen. Nog niet getest is, of deze stoffen beschadigde, maar wel levende, bacteriën beter kunnen laten groeien. In de literatuur worden deze bacteriën vaak "viable but non-culturable" (VBNC) genoemd, (Barer en Harwood, 1999).

De uiteindelijke minimale proceduretijd was 5 uur voor incubatie en 30 minuten voor kleuring. De resultaten voor deze tijd waren echter niet reproduceerbaar, en WR3 cellen groeiden minder snel dan WR1, waardoor het onderscheid tussen WR1 en WR3 moeilijker te maken is. Daarom moet rekening worden gehouden met een groeitijd van minimaal 6 uur.

De methode is minder snel dan de bij KWR ontwikkelde NASBA methode (Heijnen en Medema, 2009), maar de methode is wel eenvoudiger en waarschijnlijk goedkoper.

3.3.5 Beeldbewerking

Op dit moment is de beeldbewerking van de afbeeldingen nog handmatig. Als de intensiteit van microkolonies van bacteriën van de coligroep bij fluoresceïne (FITC filter) hoog is, kan in het DDAO kanaal ook het signaal van fluoresceïne gedetecteerd worden. De piek van fluoresceïne is maximaal in het groene deel van het spectrum, maar loopt ook een heel klein beetje door tot in het rood. Als het fluoresceïne sterk is, moet hiermee rekening gehouden worden bij de beeldbewerking.

Bij automatische verwerking zal de nadruk moeten liggen op herkenning van microkolonies in een niet-egale achtergrond. De beoordeling van de verhouding in intensiteiten in DDAO en FITC geproduceerd door *E. coli* of bacteriën van de coligroep zal door dit soort software verder verbeteren (Fig. 8). Voor kalibratie zal regelmatig, waarschijnlijk bij iedere serie metingen, een parallel controlemonster met *E. coli* en bacteriën van de coligroep getest moeten worden.

De methode gebruikt specifieke kleuring en detectie met een heel gevoelige camera met lage achtergrondruis. In principe zou het signaal van slechts één pixel voldoende moeten zijn om te kunnen bepalen of op die plaats *E. coli* of andere bacteriën uit de coligroep zitten. De detector en de software zijn (nog) niet in staat om te bepalen of intensiteits-veranderingen in slechts enkele pixels een positief signaal zijn of niet. Het contrast is niet hoog en de achtergrond is niet homogeen, dus de software moet subtiele veranderingen kunnen detecteren.

Op dit moment kunnen kolonies van ca. 150 µm doorsnede worden herkend als bacteriekolonie. Als de minimale grootte van een herkenbare kolonie teruggebracht kan worden tot 30 µm zou dat ruim 4 generaties bacteriegroei schelen. Als *E. coli* op het filter bij maximale snelheid zou delen (verdubbelings-tijd van ca. 20 minuten) zou dat neerkomen op ruim een uur tijdswinst. Als de bacteriën langzamer delen zou de tijdswinst zelfs groter zijn. Beter beeldbewerking kan daarom een aanzienlijke verkorting van de analysetijd opleveren.

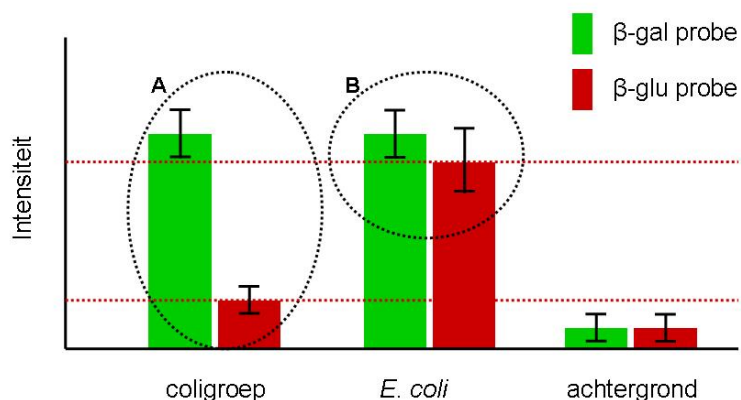


Fig. 8: Intensiteitsverschillen voor automatische verwerking van data. **A:** Microkolonies van bacteriën van de coligroep genereren een hoge intensiteit met een β -galactosidase probe (β -gal probe) en een lagere intensiteit met een β -glucuronidase (β -glu) probe. **B:** *E. coli* bacteriën geven bij beide probes een hoge intensiteit. De achtergrond produceert met beide probes een signaal met lage intensiteit. Met een selectief groeimedium, herkenning van microkolonies, en kalibratie met positieve en negatieve controles kan software deze intensiteitsverschillen gebruiken voor een betrouwbare identificatie van *E. coli* of bacteriën van de coligroep.

3.3.6 Andere fluorescente probes en aanpassingen van de detector

Het project had met een aantal tegenslagen te maken. Zowel de camera als de camera controller zijn een tijd defect geweest, en vanaf medio 2009 zijn de probes Resorufin- β -D-glucuronide en DDAO- β -D-glucuronide niet meer in de handel. Als alternatief is toen de probe 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) getest, maar het detectie apparaat bleek niet gevoelig genoeg te zijn voor deze probe. De MUG probe wordt geëxciteerd met UV licht, maar dat licht wordt grotendeels geabsorbeerd door de condensor, omdat de lenzen bestaan uit glas. Bovendien is de camera minder gevoelig voor het blauwe licht, dat door MUG wordt uitgezonden. De andere gebruikers van de detector (Universiteit Lille) hadden dezelfde problemen met een andere fluorescente kleurstof met dezelfde excitatie- en emissie-golflengten als MUG. Deze stof was 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), gebruikt voor DNA kleuring. Daarom werd er een nieuwe versie van de detector ontwikkeld ("beta2"), waarbij de condensor uit de lichtweg van de excitatie is gehaald. Zo was het systeem aangepast aan excitatie met UV licht en emissie van blauw licht. Men heeft in Lille met succes het beta2 systeem met DAPI gebruikt voor groeitesten. Deze detector zou dus ook geschikt moeten zijn voor MUG. Wij hebben dit nieuwe prototype niet kunnen testen, omdat het project zich in de eindfase bevond.

3.4 *Cryptosporidium* detectie: voorbereidende experimenten

3.4.1 *Cryptosporidium* detectie en telling met de *E. coli* detector

Met antilichaam-FITC gelabelde *Cryptosporidium* oöcysten konden worden gedetecteerd met het detectie apparaat. Bij goed gekleurde monsters met hoog contrast verschilde de automatische telling van het aantal oöcysts minder dan 10% met handmatige tellingen (Fig. 9). Hiermee is aangetoond, dat *Cryptosporidium* detectie mogelijk is met de camera, inclusief automatische telling van het aantal oöcysten in een monster. De voor deze experimenten gebruikte monsters bevatten slechts *Cryptosporidium* oöcysten. Watermonsters van verschillende locaties, die waren gedoseerd met *Cryptosporidium* oöcysten, waren moeilijker te tellen. De telling in deze test was slechts gebaseerd op het aan- dan wel afwezig zijn van signaal, en niet op vorm en grootte van de oöcysten. Daarom is een dubbele kleuring noodzakelijk bij verder onderzoek aan *Cryptosporidium* detectie bij lage resolutie.

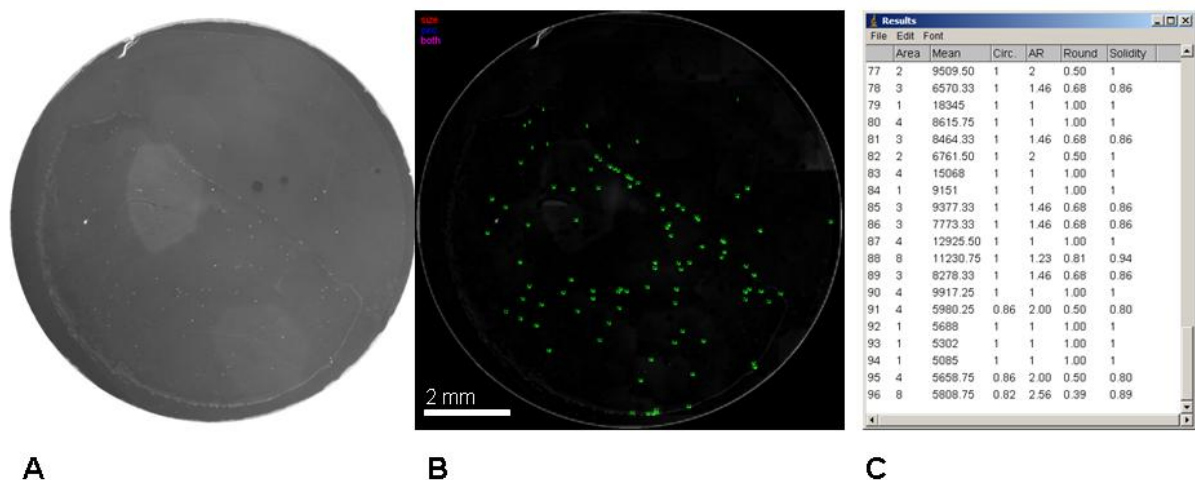


Fig. 9: *Cryptosporidium* detectie met de camera. Met de microscoop werden 105 oöcysten geteld, handmatig vanaf een afdruk van een foto werden 104 oöcysten geteld (A). B en C: ImageJ software telde automatisch 96 oöcysten (linker kolom), gebruik makend van de Ecoli analysis plug-in.

3.4.2 *Cryptosporidium* dubbellabeling met FISH en antilichamen

Getest werd gelijktijdige kleuring van *Cryptosporidium* met een versnelde FISH methode (Deere et al., 1998), in combinatie met monoklonale antilichamen. Deze procedure heeft grote overeenkomsten met de labelingsprocedure van Graczyk et al (2003). Kleuring was mogelijk binnen 1 uur.

Het fluorescente label aan de antilichamen was FITC, en het label aan de FISH probe was Cy3. Voor de fixatiestap was 10 minuten voldoende, gelijktijdige hybridisatie en antilichaam binding kon in 30 minuten bij 48°C, en de wasstap om overtollige probe te verwijderen kostte 10 minuten. Microscopie met twee verschillende filters voor FITC en Cy3 liet *Cryptosporidium* oöcysten zien, die zowel met FISH als met antilichamen waren gelabeld (Fig. 10). Dubbellabeling van *Cryptosporidium* oöcysten met een combinatie van Easystain antilichamen tegen *Cryptosporidium* met FISH met de EUK519 probe voor eukaryoten was daarmee mogelijk binnen een uur.

Negatieve controles en natuurlijke monsters waren niet inbegrepen in deze voorbereidende proof-of-concept experimenten.

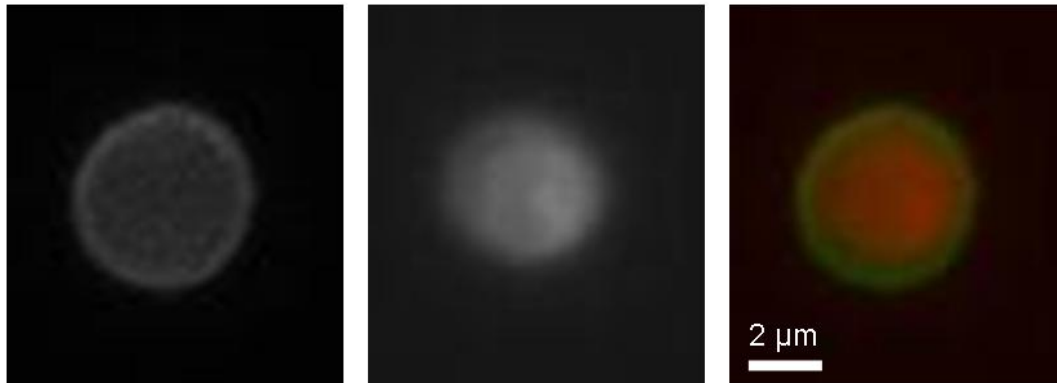


Fig. 10: Resultaat van het pilot experiment dubbelkleuring van een *Cryptosporidium* oöcyste met Easystain antilichamen tegen *Cryptosporidium* (A) en met fluorescentie *in situ* hybridisatie met de EUK519 probe voor eukaryoten (B). De hybridisatie was 30 minuten bij 48°C, de totale procedure kostte een uur. C: A en B over elkaar geprojecteerd, groen is de kleuring met antilichamen, rood is FISH. Te zien is, dat de antilichamen de wand van de oöcyste kleuren en dat FISH kleuring binnen in de oöcyste is gelokaliseerd.

Het signaal voor de antilichamen komt van de wand van de *Cryptosporidium* oöcyste, dus de buitenkant, en FISH van ribosomaal RNA binnen in de oöcyste. Daarom dient het antilichaam signaal met een microscoop zichtbaar te zijn rondom het FISH signaal, en in mindere mate op dezelfde plaats als het FISH signaal. In het ideale geval is de antilichamen labeling zichtbaar als een cirkel met een iets feller gekleurde rand en het FISH signaal als een iets kleinere cirkel binnen de ring van het antilichaam-signaal. In alle gevallen zal het FISH signaal een kleiner oppervlak beslaan dan het antilichamen signaal. Deze details zijn niet zichtbaar bij de lage resolutie van de detector, die ontwikkeld is in deze studie. Bij dubbele kleuring met FISH en antilichamen zou de kans op vals-positieve monsters verder afnemen als deze details wel zichtbaar zijn. Daarom hebben wij voorgesteld of er een mogelijkheid bestaat om in te zoomen op spots met dubbele kleuring in de lage resolutie. Dubbele kleuring wijst op *Cryptosporidium* oöcyste kandidaten, waarna het karakteristieke kleuringspatroon kan bevestigen of het ook daadwerkelijk *Cryptosporidium* oöcysten zijn. De zoom hoeft niet te gaan tot microscopie niveau: de hier toegepaste dubbelkleuring heeft zelfs bij redelijk lage resolutie een unieke 'handtekening'. Jean Claude Robin, de partner in het BIO-COM project, die verantwoordelijk is voor de detector, kijkt daarom naar de mogelijkheid een camera met zoom-functie te ontwikkelen.

Als deze analyse verder uitgewerkt wordt, dient de universele eukaryoten FISH probe vervangen te worden door een probe, die specifiek is voor *Cryptosporidium parvum*, bv. Cry1 (Vesey et al., 1998). Een FISH probe zou een Protein Nucleic Acid (PNA) probe kunnen zijn in plaats van een DNA probe, omdat PNA probes een specifiekere en sneller signaal geven (Stender et al., 2001). In plaats van antilichamen zouden andere opties overwogen kunnen worden. Aptameren zijn kleine enkelstrengs DNA of RNA moleculen, die met hoge specificiteit zouden kunnen binden, vergelijkbaar met antilichamen. Deze moleculen kunnen zo geconstrueerd worden, dat een bibliotheek van willekeurige DNA of RNA

moleculen ontstaat. Met enkele selectierondes kunnen dan de meest specifieke en best hechtende aptameren worden geselecteerd. Deze methode is goedkoop en al gebruikt om levende bacteriën specifiek te kleuren (Hamula et al., 2008). Als alternatief kunnen specifieke peptiden geselecteerd en gesynthetiseerd worden. Deze techniek geeft peptiden, die minder specifiek zijn, dan antilichamen. Peptiden kunnen worden geselecteerd met een faag display methode, waarbij een bibliotheek van bacteriofagen met peptiden op de buitenkant wordt geselecteerd op binding aan *Cryptosporidium* oöcysten (Lima et al., 2003; Yao et al., 2007).

4 Conclusies

De hier beschreven methode van *E. coli* detectie is eenvoudig uit te voeren. Het principe achter de methode is gebaseerd op veel gebruikte enzymtests in combinatie met selectief groeimedium. De methode kan *E. coli* bacteriën soms in minder dan 6 uur detecteren, maar na 6 uur plus een half uur kleuring is het resultaat meer robuust. De methode kan *E. coli* bacteriën niet detecteren binnen 4 uur, wat een van de projectdoelstellingen was.

Detectie van luminescentie tot een niveau waarbij een duidelijke afbeelding kon worden gemaakt bleek moeilijker dan voorzien. Deze werkwijze is nog niet goed reproduceerbaar.

Microkolonies konden afzonderlijk worden gedetecteerd in de gevallen waar minder dan 10^4 bacteriën opgebracht waren op het membraanfilter. Detectie van 1 microkolonie, equivalent aan 1 bacterie in het monster, is niet direct getest, maar moet daarom geen probleem zijn gezien de procedure, die gebaseerd is op het tellen van individuele microkolonies. Hiermee is het mogelijk om 1 bacterie per 100 ml monster te detecteren.

Fluorescentie metingen met een combinatie van substraten voor β -galactosidase (gebaseerd op fluoresceïn) en β -glucuronidase (Resorufin, maar vooral DDAO) maakten onderscheid tussen *E. coli* en bacteriën van de coligroep. Het meest geschikte filter was GTBP en de meest geschikte selectieve groeimedia waren mColicult en LSA.

Omdat de beeldanalyse nog handmatig was en nog niet geoptimaliseerd kon de doelstelling om zeer kleine microkolonies te kunnen detecteren niet worden bereikt. Daarmee was de analysetijd langer dan noodzakelijk.

Het systeem is nog niet gevalideerd met drinkwatermonsters. Monsters met entflessen met drinkwater, waarin bacteriën waren geënt en een paar weken bewaard, gaven later signaal dan monsters uit een rijke overnacht-cultuur. Zeven uur incubatie van entfles culturen van WR1 en WR3 gaf een duidelijk interpreteerbaar signaal, het is daarom mogelijk dat drinkwatermonsters langer moeten worden geïncubeerd dan 6 uur.

De proof-of-concept experimenten met detectie en snelle dubbellabeling van *Cryptosporidium* waren succesvol en kostten weinig projecttijd. In een vervolgproject zou dit verder uitgezocht kunnen worden.

5 Projectopbrengsten en aanbevelingen

5.1 Opbrengsten

- Via een methode, gebaseerd op dezelfde enzymactiviteit als bij eerder gevalideerde tests, is detectie van *E. coli* en bacteriën van de coligroep binnen 6 uur mogelijk.
- De methode is eenvoudig.
- Detectie van 10 microkolonies, equivalent aan 10 bacteriën per 100 ml drinkwater, is aangetoond. De methode is gebaseerd op telling van individuele microkolonies, dus detectie van 1 levende bacterie per 100 ml is realiseerbaar.
- Het systeem is met aanpassing te gebruiken voor detectie van *Cryptosporidium* oöcysten. Gelijktijdige dubbelkleuring gebaseerd op twee verschillende principes is mogelijk.
- Het camerasysteem is multifunctioneel toegepast. In parallelle ontwikkeling in Lille is deze camera ook met succes gebruikt voor detectie van *Bacillus* soorten met gelabelde antilichamen en met fluorescentie in situ hybridisatie.

5.2 Aanbevelingen

- Geautomatiseerde beeldbewerking en telling.
- Tests met MUG substraat in combinatie met een geschikte detector ("beta2"), ter vervanging van de DDAO- β -D-glucuronide en Resorufin- β -D-glucuronide, welke niet meer in de handel zijn.
- Validatie met verschillende watertypen en verschillende *E. coli* en bacteriën van de coligroep. Beschadigde bacteriën kunnen mogelijk beter groeien in aanwezigheid van enkele van de groeibevorderende stoffen.
- Uitwerking van het gebruik van dubbellabeling voor *Cryptosporidium* detectie in een nieuw project. Hierbij hoort een upgrade van het camera-systeem met zoom eigenschappen.
- Test voor β -glucuronidase activiteit (directe *E. coli* detectie) met behulp van luminescentie (Glucuron-Plus, Applied Biosystems). Dit substraat zou nu of zeer binnenkort in de handel moeten zijn. Getest moet ook worden of dit substraat in combinatie met een selectief groeimedium voldoende specifiek is om *E. coli* te detecteren.

6 Dank

De auteurs willen Anke Brouwer bedanken voor haar bijdrage in het inhoudelijke en in het praktisch werk. De auteurs willen Eefjan Breukink en Robert Sijbrandi van de vakgroep Biochemie van Membranen van de Universiteit Utrecht bedanken voor het ter beschikking stellen van de fluorimeter opstelling.

Het onderzoek was gefinancierd door de participerende bedrijven van het bedrijfstakonderzoek van de drinkwaterbedrijven (BTO). Het onderzoek maakte ook deel uit van het internationale project BIO-COM, wat was gefinancierd door het Agence National de Recherche (ANR) uit Frankrijk. De auteurs willen de samenwerkende partners binnen dit project bedanken: Jean Claude Robin en Regis Colla (Bio Instruments Concept en Lheritier), Ilan Juran en Erich Shaw (W-SMART), Philippe Jacques en Angélique Cocaign (ProBioGem, Universiteit Lille), Bruno Nguyen en Laurent Moulin (Eau de Paris).

7 Literatuur

- Alonso, J.L., I. Amoros, S. Chong & H. Garelick, (1996), Quantitative determination of *Escherichia coli* in water using CHROMagar® *E. coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 25, 3, 309-315.
- Amann, R.L., W. Ludwig & K.H. Schleifer, (1995), Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 1, 143-169.
- Barer, M.R. & C.R. Harwood, (1999), Bacterial viability and culturability. *Advances in Microbial Physiology*, 41, 93-137.
- Brenner, K.P., C.C. Rankin, Y.R. Roybal, G.N. Stelma, P.V. Scarpino & A.P. Dufour, (1993), New medium for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 11, 3534-3544.
- Brewer, D.G., S.E. Martin & Z.J. Ordal, (1977), Beneficial effects of catalase or pyruvate in a most-probable-number technique for the detection of *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 34, 6, 797-800.
- Camper, A.K., G.A. McFeters, W.G. Characklis & W.L. Jones, (1991), Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 8, 2233-2239.
- Deere, D., G. Vesey, M. Milner, K. Williams, N. Ashbolt & D. Veal, (1998), Rapid method for fluorescent in situ ribosomal RNA labelling of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 5, 807-818.
- Edberg, S.C. & M.M. Edberg, (1988), A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 61, 389-399.
- EU Drinking Water Directive. (1998), Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities* 5.12.98 L 330/32. Council of the European Union.
- Frahm, E. & U. Obst, (2003), Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of Microbiological Methods*, 52, 1, 123-131.
- Geldreich, E.E. (1997), Coliforms: a new beginning to an old problem. in: D. Kay & C. Frickner (eds), *Coliforms and E. coli: Problem or solution?* Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. pp 3-11.
- George, I., P. Crop & P. Servais, (2001), Use of β -D-galactosidase and β -D-glucuronidase activities for quantitative detection of total and fecal coliforms in wastewater. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 7, 670-675.
- George, I., M. Petit & P. Servais, (2000), Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 3, 404-413.
- Gong, H., B. Zhang, G. Little, J. Kovar, H. Chen, W. Xie, A. Schutz-Geschwender & D.M. Olive, (2009), β -Galactosidase activity assay using far-red-shifted fluorescent substrate DDAOG. *Analytical Biochemistry*, 386, 1, 59-64.
- Graczyk, T.K., B.H. Grimes, R. Knight, A.J. Da Silva, N.J. Pieniazek & D.A. Veal, (2003), Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent in situ hybridization and a monoclonal antibody. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68, 2, 228-232.
- Hamula, C.L.A., H. Zhang, L. Guan le, X.F. Li & X.C. Le, (2008), Selection of aptamers against live bacterial cells. *Analytical Chemistry*, 80, 20, 7812-7819.
- Havelaar, A.H. & W.M. Hogeboom, (1983), Factors affecting the enumeration of coliphages in sewage and sewage-polluted waters. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 4, 387-397.
- Heijnen, L. (2009), *Een snelle en specifieke methode voor detectie van levensvatbare E.coli*. KWR Waterycle Research Institute, Nieuwegein, NL, BTO 2009.048.
- Heijnen, L. & G. Medema, (2009), Method for rapid detection of viable *Escherichia coli* in water using real-time NASBA. *Water Research*, 43, 12, 3124-3132.
- Heijnen, L. & G. Medema, (2006), Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *Journal of Water and Health*, 4, 4, 487-498.

- Heijnen, L., G. Wubbels, H. Veenendaal & G. Medema, (2005), Real-time PCR bevestiging snel en betrouwbaar *E. coli*-kolonies. *H2O*, 7, 69-71.
- Ibrahim, S.A. & A. Bezkorovainy, (1994), Growth-promoting factors for *Bifidobacterium longum*. *Journal of Food Science*, 59, 1, 189-191.
- Knittel, M.D., R.J. Seidler, C. Eby & L.M. Cabe, (1977), Colonization of the botanical environment by *Klebsiella* isolates of pathogenic origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 34, 5, 557-563.
- Lima, C., H.V. Smith, R.A.B. Nichols, J. Greenman & T. Paget. (2003), Typing of *Cryptosporidium parvum* oocysts using phage-display technology. in: R.C.A. Thompson, A. Armson & U.M. Ryan (eds), *Cryptosporidium: from molecules to disease*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier. pp 169-171.
- Liu, J., X.Z. Zheng, T.A. Baramki, R.A. Yazigi, G. Compton & E. Katz, (1998), Ultrarapid detection of sex chromosomes with the use of fluorescence in situ hybridization with direct label DNA probes in single human blastomeres, spermatozoa, amniocytes, and lymphocytes. *Fertility and Sterility*, 70, 5, 927-932.
- Maheux, A.F., V. Huppé, M. Boissinot, F.J. Picard, L. Bissonnette, J.-L.T. Bernier & M.G. Bergeron, (2008), Analytical limits of four β -glucuronidase and β -galactosidase-based commercial culture methods used to detect *Escherichia coli* and total coliforms. *Journal of Microbiological Methods*, 75, 3, 506-514.
- McDonald, L.C., C.R. Hackney & B. Ray, (1983), Enhanced recovery of injured *Escherichia coli* by compounds that degrade hydrogen peroxide or block its formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 2, 360-365.
- Nelis, H. & S. Van Poucke, (2000), Enzymatic detection of coliforms and *Escherichia coli* within 4 hours. *Water Air and Soil Pollution*, 123, 1-4, 43-52.
- Nobel, P.J. (2002), *Een snelle test op fecale verontreiniging*. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL, BTO 2002.107.
- Özkanca, R., F. Saribiyik, K. Isik, N. Sahin, E. Kariptas & K.P. Flint, (2009), Resuscitation and quantification of stressed *Escherichia coli* K12 NCTC8797 in water samples. *Microbiological Research*, 164, 2, 212-220.
- Pagel, J.E., A.A. Qureshi, D.M. Young & L.T. Vlassoff, (1982), Comparison of four membrane filter methods for fecal coliform enumeration. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 4, 787-793.
- Peters, R.P.H., M.A. van Agtmael, A.M. Simoons-Smit, S.A. Danner, C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls & P.H.M. Savelkoul, (2006), Rapid identification of pathogens in blood cultures with a modified fluorescence in situ hybridization assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 11, 4186-4188.
- Pettibone, G.W., (1992), The use of lauryl tryptose broth containing 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) to enumerate *Escherichia coli* from freshwater sediment. *Letters in Applied Microbiology*, 15, 5, 190-192.
- Rasband, W.S. (1997-2009), ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Bethesda, Maryland, USA: U.S. National Institutes of Health.
- Rayman, M.K., B. Aris & H.B. El Derea, (1978), The effect of compounds which degrade hydrogen peroxide on the enumeration of heat-stressed cells of *Salmonella senftenberg*. *Canadian Journal of Microbiology*, 24, 7, 883-885.
- Rotman, B., J.A. Zderic & M. Edelstein, (1963), Fluorogenic substrates for β -D-galactosidases and phosphatases derived from fluorescein (3,6-dihydroxyfluoran) and its monomethylether. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 50, 1-6.
- Schets, F.M., G.J. Medema & A.H. Havelaar, (1993), Comparison of Colilert with Dutch standard enumeration methods for *Escherichia coli* and total coliforms in water. *Letters in Applied Microbiology*, 17, 1, 17-19.
- Schets, F.M., P.J. Nobel, S. Strating, K.A. Mooijman, G.B. Engels & A. Brouwer, (2002), EU Drinking Water Directive reference methods for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* compared with alternative methods. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 3, 227-231.
- Smith, J.J., T.S. Gunasekera, C.R. Barardi, D. Veal & G. Vesey, (2004), Determination of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability by fluorescence in situ hybridization using a ribosomal RNA-directed probe. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 2, 409-417.
- Stender, H., A. Sage, K. Oliveira, A.J. Broomer, B. Young & J. Coull, (2001), Combination of ATP-bioluminescence and PNA probes allows rapid total counts and identification of specific microorganisms in mixed populations. *Journal of Microbiological Methods*, 46, 1, 69-75.

- Tryland, I. & L. Fiksdal, (1998), Enzyme characteristics of β -D-galactosidase- and β -D-glucuronidase-positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3, 1018-1023.
- Van Poucke, S.O. & H.J. Nelis, (2000), A 210-min solid phase cytometry test for the enumeration of *Escherichia coli* in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 3, 390-396.
- Van Poucke, S.O. & H.J. Nelis, (1997), Effects of the composition of bacteriological growth media on a chemiluminometric assay of beta-galactosidase in *Escherichia coli*. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 12, 3, 165-175.
- Vesey, G., N. Ashbolt, E.J. Fricker, D. Deere, K.L. Williams, D.A. Veal & M. Dorsch, (1998), The use of a ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe for fluorescent labelling of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 3, 429-440.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira & J. Messing, (1985), Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33, 1, 103-119.
- Yao, L., J. Yin, X. Zhang, Q. Liu, J. Li, L. Chen, Y. Zhao, P. Gong & C. Liu, (2007), *Cryptosporidium parvum*: identification of a new surface adhesion protein on sporozoite and oocyst by screening of a phage-display cDNA library. *Experimental Parasitology*, 115, 4, 333-338.

