



Moleculaire methoden voor kwantificatie en identificatie van *Aeromonas* in drinkwater

BTO 2013.228(s)
Mei 2013

Moleculaire methoden voor kwantificatie en identificatie van *Aeromonas* in drinkwater

BTO 2013.228(s)
Mei 2013

© 2012 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

Moleculaire methoden voor de kwantificatie en identificatie van *Aeromonas* in drinkwater

Opdrachtnummer

B111725

Rapportnummer

BTO 2013.228(s)

Onderzoeksprogramma

Microbiologie

Projectmanager

Niels Dammers

Opdrachtgever

BTO

Auteurs

Paul van der Wielen en Bart Wullings

Verzonden aan

PBC Microbiologie

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar

Samenvatting

Aeromonas is een wettelijke parameter volgens het drinkwaterbesluit in Nederland en dient als indicator voor nagroei in het distributiesysteem. Momenteel wordt het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas* in drinkwater bepaald met behulp van een selectief agarmedium dat bij 30°C wordt geïncubeerd. In een onderzoek dat liep van 1988 tot 1994 zijn kolonies van *Aeromonas* ook tot soortsniveau gekarakteriseerd met behulp van biochemische testen. Uit deze biochemische karakterisering is naar voren gekomen dat voornamelijk *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* en *A. sobria* in het Nederlandse drinkwater voorkomt. Sindsdien is de taxonomie van *Aeromonas* echter ingrijpend veranderd, omdat tegenwoordig moleculaire typeringsmethoden worden gebruikt voor identificatie tot soortsniveau. In deze studie is onderzocht of *Aeromonas* in drinkwater ook gekwantificeerd kan worden met behulp van een specifieke kwantitatieve PCR-methode (qPCR) en welke *Aeromonas*-soorten voorkomen in het drinkwater.

Specifieke primers beschreven in de literatuur zijn getest op specificiteit voor *Aeromonas* en met behulp van deze specifieke primers werd een qPCR methode ontwikkeld. Daarnaast zijn *Aeromonas*-stammen, die in het verleden zijn getypeerd met biochemische methoden, ook tot soortsniveau getypeerd door de DNA volgorde van het gyraseB (*gyrB*) gen te bepalen en te vergelijken met *gyrB* gensequenties in de open database. Tevens zijn *Aeromonas*-stammen geïsoleerd uit het voorzieningsgebied van Zuidwolde, St Jansklooster, Nuland, Baanhoek, Braakman, Berenplaat, Kralingen, Weesperkarspel en Andijk en ook deze stammen zijn met moleculair biologische methoden getypeerd tot soortsniveau. Tot slot is onderzocht of de geïsoleerde *Aeromonas*-stammen ook in staat zijn om te groeien bij 37°C.

Het primerpaar Aer66f en Aer613r resulteert in de specifieke detectie van het 16S rRNA gen van *Aeromonas* in de PCR-reactie. Met behulp van Sybrgreen en een kalibratiecurve is het mogelijk om deze primerset te gebruiken in een qPCR methode voor de kwantitatieve detectie van het 16S rRNA gen van *Aeromonas* in drinkwater. Een vergelijking van de qPCR methode met de kweekmethode voor *Aeromonas* laat zien dat het aantal 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas* hoger is dan het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas*, zowel in een kweekmedium als in drinkwatermonsters. De verhouding tussen het aantal genkopieën en kolonievormende eenheden is daarbij niet constant, maar afhankelijk van de *Aeromonas*-soort en de groeifase waarin de *Aeromonas*-cel zich bevindt. Hierdoor is de qPCR methode niet bruikbaar om het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas* in drinkwater te schatten.

Aeromonas-stammen die met biochemische methoden zijn geïdentificeerd tot *A. hydrophila* en *A. caviae*, zijn met moleculaire methoden geïdentificeerd tot andere *Aeromonas*-soorten (*A. veronii*, *A. media*, *A. sobria*, *A. salmonicida* en *A. eucrenophila*). De *Aeromonas*-stammen die zijn geïsoleerd uit de vijf voorzieningsgebieden zijn met de moleculaire methoden ook tot andere soorten dan *A. hydrophila* en *A. caviae* geïdentificeerd. De identificatie met moleculaire methoden laat tevens zien dat de *Aeromonas*-populatie in de vijf verschillende voorzieningsgebieden van elkaar verschilt, dus waarschijnlijk speelt de watersamenstelling of specifieke condities in het distributiesysteem een belangrijke rol bij de ontwikkeling van een *Aeromonas*-populatie in het distributiesysteem. In totaal zijn zeven verschillende *Aeromonas*-soorten (*A. bestiarum*, *A. medium*, *A. salmonicida*, *A. rivuli*, *A. sobria*, *A. veronii* en *A. punctata*) bij de vijf voorzieningsgebieden gevonden. De geïsoleerde stammen zijn in alle gevallen in staat om ook bij 37°C te groeien, maar groei van twee soorten (*A. rivuli* en *A. sobria*) is hierbij beperkt.

Uit deze studie wordt geconcludeerd dat met behulp van primerpaar Aer66f en Aer613r het 16S rRNA gen van *Aeromonas* specifiek kan worden gekwantificeerd in drinkwater maar dat met deze qPCR methode niet het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas* in drinkwater kan worden geschat. Daarnaast wordt geconcludeerd dat de *Aeromonas*-populatie meer divers is dan voorheen gedacht en dat lokale condities een rol spelen bij de ontwikkeling van een *Aeromonas*-populatie in een distributiesysteem. Tot slot wordt geconcludeerd dat het additioneel inzetten van een *Aeromonas* kweek bij 37°C weinig meerwaarde heeft en dat daarom eventueel kan worden voorgesteld om deze parameter te schrappen uit de wettelijke inspectierichtlijn "Harmonisatie Meetprogramma Drinkwaterkwaliteit".

Inhoud

Samenvatting	1	
Inhoud	3	
1	Introductie	5
1.1	<i>Aeromonas</i> en ziekte	5
1.2	<i>Aeromonas</i> in het Nederlandse drinkwater	5
2	Materiaal en Methoden	9
2.1	Detectie van <i>Aeromonas</i>	9
2.1.1	Kweekmethode	9
2.1.2	qPCR-methode voor <i>Aeromonas</i> sp.	9
2.2	Detectie en identificatie van <i>Aeromonas</i> in het voorzieningsgebied	10
2.2.1	qPCR methode versus celaantallen en kweek	10
2.2.2	qPCR en <i>Aeromonas</i> -aantallen in voorzieningsgebied	10
2.3	Identificatie van <i>Aeromonas</i> tot soortniveau	11
2.3.1	Biochemische eigenschappen	11
2.3.2	DNA-volgorde van het <i>gyraseB</i> gen	11
2.4	Groei van <i>Aeromonas</i> -soorten bij verschillende incubatietemperaturen	12
3	Resultaten en Discussie	13
3.1	qPCR voor <i>Aeromonas</i>	13
3.1.1	qPCR-methode voor <i>Aeromonas</i> spp.	13
3.1.2	qPCR methode versus celaantallen en kweek	14
3.1.3	qPCR en <i>Aeromonas</i> -aantallen in voorzieningsgebied	15
3.2	Identificatie tot soortniveau	18
3.2.1	Biochemische eigenschappen versus genetische eigenschappen	18
3.2.2	Typering van <i>Aeromonas</i> -isolaten drinkwater met genetische methoden	19
3.2.3	Groei van <i>Aeromonas</i> -soorten bij 30 en 37°C	20
4	Conclusies en aanbevelingen	21
4.1	Conclusies	21
4.2	Aanbevelingen	21
5	Referenties	23

1 Introductie

1.1 *Aeromonas* en ziekte

In het voorjaar van 1984 werd een plotselinge toename van *Aeromonas* waargenomen in het drinkwater dat werd geproduceerd door het toenmalig Duinwaterbedrijf van 's-Gravenhage (van Puffelen en Hoekstra, 1984). In dezelfde periode werd in Australië waargenomen dat zowel het aantal patiënten met diarree als de aantallen *Aeromonas* in drinkwater hoger waren in de zomermaanden dan in de wintermaanden. Zonder aanvullend onderzoek te doen of deze twee parameters ook een oorzakelijk verband hadden, werd geconcludeerd dat *Aeromonas* in drinkwater mogelijk verantwoordelijk is voor diarree bij patiënten (4). Onder onderzoekers was en is echter nog steeds discussie of *Aeromonas*-soorten überhaupt diarree bij mensen kunnen veroorzaken. Dit komt omdat een goed diermodel, dat vergelijkbaar is met het effect op de mens, niet bestaat voor *Aeromonas* spp., waardoor het moeilijk is om infectie en ziekte door *Aeromonas* aan te tonen (5, 14). Tevens is onderzoek gedaan naar dosiseffect relaties bij mensen. Hierbij werden vijf verschillende *Aeromonas*-stammen, geïsoleerd uit mensen met diarree, aan gezonde vrijwilligers gedoseerd. Slechts één persoon kreeg milde diarree in deze studie, maar pas bij bijzonder hoge doses ($> 10^9$ kve) van één van de vijf geteste *Aeromonas*-stammen (18). Deze resultaten tonen aan dat *Aeromonas* waarschijnlijk geen diarree veroorzaakt bij gezonde personen. Tot dusver is er één gepubliceerde studie gevonden waarin is aangetoond dat een *Aeromonas*-stam uit een patiënt met diarree genotypisch identiek was aan *Aeromonas*-stammen uit drinkwater, maar bewijs dat de patiëntstam ook de diarree heeft veroorzaakt ontbreekt (20). In alle andere studies, waar drinkwaterstammen zijn vergeleken met stammen uit feces van patiënten met diarree, is gevonden dat de drinkwaterstammen fenotypisch of genotypisch verschilden van patiëntstammen (1, 3, 8, 9, 11, 19, 24, 25). Het is daarom waarschijnlijk dat *Aeromonas*-stammen die zich in drinkwater weten te vermeerderen niet de veroorzaker zijn van diarree bij patiënten. Wel is onomstotelijk aangetoond dat bepaalde *Aeromonas*-soorten wondinfecties kunnen veroorzaken, maar in Nederland wordt *Aeromonas* sporadisch ($< 0,1\%$) geïsoleerd bij wondinfecties in het ziekenhuis (31) en lijkt daarmee minder belangrijk te zijn dan bijvoorbeeld *Pseudomonas aeruginosa*, een bacterie die zich ook in drinkwater kan vermeerderen (van der Wielen and van der Kooij). Door al deze bevindingen wordt de aanwezigheid van *Aeromonas* in drinkwater niet beschouwd als een risico voor de volksgezondheid (17, 23, 32). Ook in de laatste versie van de Drinking Water Guidelines van de WHO (2) wordt geconcludeerd dat het bewijs dat *Aeromonas* diarree veroorzaakt inconsistent is en dat ook onvoldoende bewijs is dat vermeende pathogene *Aeromonas*-stammen via drinkwater worden verspreid.

1.2 *Aeromonas* in het Nederlandse drinkwater

De aanwezigheid van *Aeromonas* in drinkwater kreeg in Nederland in de jaren '80 van de vorige eeuw brede belangstelling, omdat destijds nog onduidelijk was of *Aeromonas* ook diarree veroorzaakte bij mensen. Resultaten van de eerste meetprogramma's uit die periode lieten zien dat *Aeromonas* vrij algemeen voorkomt in het Nederlandse drinkwater. De overheid formuleerde daarom voorlopige actieniveaus voor de aantallen *Aeromonas* in drinkwater, zodat blootstelling van consumenten aan *Aeromonas* zo veel mogelijk werd beperkt. Tevens werd besloten om in 1988 en 1989 een groot landelijk onderzoek uit te voeren naar (i) het voorkomen van *Aeromonas* in drinkwater, (ii) de hygiënische betekenis van *Aeromonas* in drinkwater en (iii) mogelijke beheersmaatregelen om groei van *Aeromonas* in drinkwater te beperken. Deze studie omvatte onderzoek bij 238 pompstation en 230 distributiesystemen in Nederland. De resultaten

van dit landelijk onderzoek zijn gepubliceerd in een gezamenlijk rapport (26). De belangrijkste bevindingen uit deze landelijke studie zijn:

- De ontwikkeling van *Aeromonas* in de zuivering kan worden beperkt door het verlagen van de methaanbelasting in combinatie met schoonmaken/vervangen van filterzand;
- *Aeromonas* vermeerdert zich waarschijnlijk in het sediment en biofilm;
- *Aeromonas*-bacteriën zijn in staat zich te vermeerderen bij zeer lage concentraties aan gemakkelijk afbreekbaar organisch verbindingen;
- Beperken van groei van *Aeromonas* vereist de productie van biologisch stabiel drinkwater. Bij bereiding van drinkwater uit grondwater betekent dit dat dubbele barrières nodig zijn tegen methaan en ammonium. Dit kan worden bereikt door intensieve beluchting voor methaanverwijdering en dubbele filtratie voor nitrificatie. De nafilts kunnen vervolgens worden gebruikt om de gevormde biomassa te verwijderen;
- *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* en *Aeromonas caviae* worden het vaakst aangetroffen in drinkwater wanneer *Aeromonas*-isolaten worden getypeerd met biochemische methoden;
- Er is weinig tot geen overeenkomst tussen *Aeromonas*-stammen uit drinkwater en uit diarree-fecaliën. De aanwezigheid van *Aeromonas* in drinkwater lijkt dan ook geen groot volksgezondheidsprobleem te zijn;
- Op grond van de resultaten van het landelijk onderzoek wordt voorgesteld om de volgende richtniveaus te hanteren voor *Aeromonas* in drinkwater:
 - o Jaarlijkse mediaanwaarde *Aeromonas* 30°C reinwater: < 20 kve 100 ml⁻¹
 - o Jaarlijks 90-percentiel drinkwater in distributiesysteem *Aeromonas* 30°C: < 200 kve 100 ml⁻¹;
- Overwogen wordt om in het Waterleidingbesluit als eis op te nemen: 1000 kve 100 ml⁻¹, met de opmerking dat bij herhaalde overschrijding, de regionale inspectie wordt geïnformeerd.

Uiteindelijk hebben de resultaten van de onderzoeken die in het Nederlandse drinkwater zijn uitgevoerd toch geleid tot het opnemen van *Aeromonas* als wettelijke parameter in het drinkwaterbesluit. De status van *Aeromonas* als wettelijke parameter is echter onduidelijk omdat in het Drinkwaterbesluit de parameter is opgenomen als indicator/bedrijfstechnische parameter, maar in de Inspectierichtlijn 'Harmonisatie Meetprogramma Drinkwaterkwaliteit' wordt *Aeromonas* als gezondheidskundige parameter beschreven. Omdat hierboven al uiteengezet is dat het onwaarschijnlijk is dat *Aeromonas*-isolaten uit drinkwater ziekte veroorzaken, is de beschrijving ten aanzien van *Aeromonas* in de Inspectierichtlijn vreemd. Daarnaast heeft een studie van Schubert (21) laten zien dat de maximum groeitemperatuur van *Aeromonas*-soorten geen maat is voor vermeende pathogeniciteit. Volgens het Drinkwaterbesluit is het koloniegetal van *Aeromonas* een maat voor nagroei. Nagroei van *Aeromonas* wordt vooral waargenomen in de zomermaanden (bij temperaturen boven 15 °C), waarbij het aantal *Aeromonas*-bacteriën toeneemt met de verblijftijd van het water in het distributiesysteem (26). De onderzoeken die in het verleden in Nederland plaatsvonden, hebben ook aanwijzingen opgeleverd dat *Aeromonas* met name groeit in het sediment of op gestorven dierlijke organismen en biofilm (pers comm Dick van der Kooij; 12).

Aeromonas wordt momenteel bepaald door 100 ml drinkwatermonster te filtreren en het filter te incuberen op een selectief agarmedium bij 30°C. In het verleden (1988-1994) zijn kolonies van *Aeromonas* ook tot soortsniveau gekarakteriseerd door verschillende biochemische testen uit te voeren. Uit deze biochemische karakterisering is naar voren gekomen dat voornamelijk *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* en *Aeromonas sobria* in het Nederlandse drinkwater voorkomt (10). De laatste jaren is de taxonomie van *Aeromonas* echter ingrijpend veranderd

door het toepassen van moleculaire methoden (14). De huidige taxonomische indeling van de *Aeromonas*-soorten is dan ook voornamelijk gebaseerd op de DNA-volgorde van bepaalde genen van *Aeromonas*.

Recent is meer aandacht gekomen voor *Aeromonas* in het BTO-onderzoek. In 2010 is een landelijk overzicht gemaakt van de *Aeromonas*-aantallen in 176 Nederlandse voorzieningsgebieden in de periode 2004 t/m 2007 (30). Uit deze landelijke inventarisatie bleek dat de wettelijke norm voor *Aeromonas* in 16 van de 176 voorzieningsgebieden werd overschreden, waarbij bij slechts vier voorzieningsgebieden meer dan 10 wettelijke overschrijdingen werden waargenomen. Ook werd met behulp van meervoudige regressieanalyses achterhaald welke fysisch/chemische parameters een relatie hebben met de aantallen *Aeromonas* in het voorzieningsgebied. Uit deze meervoudige regressieanalyses blijkt dat de *Aeromonas*-aantallen een positieve relatie hebben met het TOC-gehalte van het ruwwater en het percentage gietijzer in het distributiesysteem. In voorzieningsgebieden waar drinkwater bereid uit grondwater wordt gedistribueerd, is daarnaast een relatie gevonden met de calciumconcentratie en pH in het gedistribueerde water en met de ammoniumconcentratie in het ruwwater. In voorzieningsgebieden waar drinkwater bereid uit oppervlaktewater werd gedistribueerd, correleerde *Aeromonas* met het 95-percentiel van de watertemperatuur in het gedistribueerde drinkwater, met de ijzerconcentratie van het gedistribueerde drinkwater en met de mangaanconcentratie in het ruwwater.

Daarnaast is in 2009 het BTO project 'Groei van *Aeromonas* in het distributiesysteem' gestart. Dit project heeft zich op de volgende onderwerpen gericht:

1. Detectie en identificatie van *Aeromonas* in het drinkwater. Hierbij zal met qPCR worden nagegaan in welke mate het koloniegetal van *Aeromonas* een goed beeld geeft van de aantallen *Aeromonas* in het drinkwater. Uit de identificatie zal blijken welke *Aeromonas*-soorten in welke watertypen domineren.
2. Invloed van de watersamenstelling op nagroei van *Aeromonas*. Informatie over de relatie tussen watersamenstelling (groeibevorderende eigenschappen) en nagroei van *Aeromonas* is nodig voor het aanpassen van de zuivering;
3. Groeibevorderende eigenschappen van biomassa. Informatie over de mate van groeibevordering van biomassa is nodig voor het beoordelen van de invloed van biomassa in het water op de groei van *Aeromonas*.

De onderwerpen 2 en 3 zijn onderzocht in combinatie met de ontwikkeling van nieuwe meetmethoden (biomassaproductiepotentie van water, uitbreiding van AOC met stam A3, continue biofilmmonitor en deeltjesgebonden organisch koolstof, koolhydraten, ijzer en mangaan na concentrering met hemoflow) en zijn elders gerapporteerd (27-29).

Het eerste onderwerp is als apart project uitgevoerd en de resultaten van dit onderwerp worden in deze rapportage beschreven. Het doel van dit onderzoeksonderwerp ten aanzien van *Aeromonas* is:

- Ontwikkel een kwantitatieve PCR methode (qPCR) voor bacteriën die behoren tot het genus *Aeromonas* en vergelijk deze qPCR methode met de kweekmethode op drinkwatermonsters uit verschillende voorzieningsgebieden;
- Identificeer *Aeromonas*-stammen die zijn geïsoleerd uit verschillende voorzieningsgebieden tot soortsniveau door de DNA volgorde van het ... gen en ... gen te bepalen.
- Bepaal of identificatie van *Aeromonas*-stammen tot soortsniveau met behulp van DNA methoden afwijkt van identificatie die in het verleden is uitgevoerd met biochemische methoden.

- Achterhaal de mogelijkheid van dominante *Aeromonas*-soorten in het drinkwater om zich ook bij 37°C te vermeerderen.

2 Materiaal en Methoden

2.1 Detectie van *Aeromonas*

Voor het kwantificeren van *Aeromonas*-bacteriën in water is in het onderzoek zowel de standaard kweekmethode toegepast als ook de qPCR-methode. De qPCR-methode is een moleculair biologische methode waarin DNA van het doelorganisme in een monster specifiek wordt vermenigvuldigd. Het aantal DNA-kopieën in het monster wordt berekend met behulp van een DNA-kalibratiesuspensie. De qPCR-methode is toegepast voor detectie van alle bekende soorten *Aeromonas*-soorten.

2.1.1 Kweekmethode

Detectie van *Aeromonas*-bacteriën met behulp van de kweekmethode is uitgevoerd conform NEN 6263. De bepalingsgrens van de methode komt overeen met 1 kolonievormende eenheid per 100 ml (1 kve 100 ml⁻¹). Voor het kwantificeren van de *Aeromonas*-bacteriën worden watermonsters gefiltreerd door een membraanfilter, uitgespateld op Ampicilline Dextrine Agar (ADA) en vervolgens 24 uur geïncubeerd bij 30°C. Kolonies met een kenmerkende morfologie (geel) worden geteld.

2.1.2 qPCR-methode voor *Aeromonas* sp.

Voor detectie van alle bacteriën die behoren tot het geslacht *Aeromonas* is een in de literatuur beschreven qPCR-methode geïmplementeerd (15, 34). In deze methode wordt een DNA-fragment van ongeveer 550 baseparen van het 16S rRNA gen vermenigvuldigd (Tabel 2.1). Dit gen is in alle bacteriën aanwezig en codeert voor de ribosomen. Binnen het geslacht *Aeromonas* zijn zeer geringe genetische variaties of DNA-verschillen op het 16S rRNA gen aanwezig, waardoor het 16S rRNA gen uitermate geschikt is voor ontwerp van specifieke primers voor de detectie van het alle bacteriën binnen het geslacht *Aeromonas*.

De primers en probes zijn getest op verschillende referentiestammen van *Aeromonas* (Tabel 2.1) voor specificiteit, selectiviteit en PCR-efficiëntie.

Tabel 2.1. *Aeromonas* referentiestammen

Soort	optimum groeitemperatuur	cultuurcollectie	
		DSM	Overige
<i>Aeromonas hydrophila</i> ssp <i>hydrophila</i>	30°C	6173	ATCC 35654
<i>Aeromonas jandaei</i>	28°C	7311	ATCC 49568
<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	28°C	7312	ATCC 49657
<i>Aeromonas caviae</i>	28°C	7323	ATCC 15468
<i>Aeromonas veronii</i>	37°C	7386	ATCC 35624
<i>Aeromonas veronii</i>	28°C	11576	ATCC 51208
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	30°C	17534	ATCC 23309
<i>Aeromonas hydrophila</i> ssp <i>ranae</i>	28°C	17695	CCM 7147
<i>Aeromonas aquarium</i>	30°C	18362	CECT 7289
<i>Aeromonas sobria</i>	28°C	19176	ATCC 43979
<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp <i>salmonicida</i>	28°C	19634	ATCC 33658
<i>Aeromonas hydrophila</i> ssp <i>hydrophila</i>	30°C	30187	ATCC 7966
<i>Aeromonas hydrophila</i> ssp <i>anaerogenes</i> *	30°C	30188	ATCC 15467

* behoort tot *A. caviae* (16)

Het kwantificeren van het aantal genkopieën in de monsters in qPCR is in dit onderzoek uitgevoerd op basis van een kalibratiesuspensie van het 16S rRNA gen van *Aeromonas hydrophila*. Het 16S rRNA gengedeelte dat wordt geamplificeerd is samen met het DNA-gedeelte van een interne controle gesynthetiseerd bij een specialistisch bedrijf (IDT, Leuven, België). Het gesynthetiseerde DNA-fragment is vervolgens nauwkeurig gekwantificeerd met een Quant-iT DNA kwantificatiekit (Invitrogen). Op basis van de concentratie is het DNA-fragment vervolgens in tienvoudige stappen verdund tot een concentratiereeks van $2,3 \times 10^4$ tot $2,3 \times 10^0$ DNA-kopieën μl^{-1} . In de qPCR wordt 10 μl van elk van deze verdunningen 10 μl geanalyseerd.

Voor detectie van het DNA van *Aeromonas*-bacteriën in water is van elk monster 250 ml water geconcentreerd door het water te filtreren door een filter met poriegrootte van 0,2 μm . Het DNA van de bacteriën op het filter is vervolgens geëxtraheerd en gezuiverd met behulp van een DNA-extractiemethode en geëluëerd in 50 μl buffer (huisvoorschrift LMB 069). Voor het kwantificeren van het aantal 16sRNA genkopieën van *Aeromonas*-bacteriën is het DNA-extract in duplo in de qPCR geanalyseerd. Van elk DNA-extract is zowel het onverdund DNA als een tienvoudige verdunning geanalyseerd (huisvoorschrift LMB 065).

Voor het bepalen van de efficiëntie van de DNA-extractie en mogelijke inhibitie van de qPCR is aan elk monster voorafgaande aan de DNA-extractie een bekende hoeveelheid DNA van een interne controle toegevoegd. Dit controle DNA wordt tegelijk met het DNA uit het monster geëxtraheerd, geanalyseerd en gekwantificeerd. Voor het bepalen van het rendement van de extractie en PCR wordt in het qPCR experiment zowel de concentratie bepaald van het interne controle DNA na extractie als wat oorspronkelijk aan de monsters is toegevoegd. Om te compenseren voor het verlies van DNA tijdens de extractie en mogelijke remming van de qPCR wordt het kwantitatieve resultaat van de qPCR-methode gecorrigeerd met het rendement van de interne controle conform NEN6254. Dit betekent dat bij een rendement van het controle DNA van 50% het gerapporteerde resultaat van het monster met een factor twee wordt vermenigvuldigd.

2.2 Detectie en identificatie van *Aeromonas* in het voorzieningsgebied

2.2.1 qPCR methode versus celtaallen en kweek

In een vergelijkingsexperiment zijn drie *Aeromonas*-stammen gekwantificeerd met de qPCR methode, de klassieke kweekmethode en de directe celtelling met de flowcytometer (FCM). *A. hydrophila*, *A. veronii* en *A. sobria* stammen zijn hiervoor opgekweekt in TSB medium en geïncubeerd bij 30°C. Verschillende verdunningen van de culturen (10^{-5} tot 10^{-7}) zijn geanalyseerd met de drie methoden. De uitvoering is identiek aan de eerder beschreven werkwijze (paragraaf 2.1.2).

2.2.2 qPCR en *Aeromonas*-aantallen in voorzieningsgebied

De geoptimaliseerde qPCR-methode voor *Aeromonas* spp. is toegepast voor het analyseren van watermonsters uit vijf verschillende voorzieningsgebieden. De geselecteerde pompstations bereiden drinkwater uit grondwater (Zuidwolde, St Jansklooster en Nuland) of uit oppervlaktewater (Weesperkarspel en Andijk). Naast de qPCR methode is *Aeromonas* ook bepaald met de standaard kweekmethode bij 30°C. Daarnaast is het ATP-gehalte in de monsters bepaald volgens huisvoorschrift LMB 002. Per pompstation is het reinwater en negen watermonsters uit het voorzieningsgebied bemonsterd. De monsters in het voorzieningsgebied zijn door de betreffende contactpersonen van de waterleidingbedrijven zo goed mogelijk geselecteerd op basis van de volgende criteria: drie locaties dichtbij pompstation of korte

verblijftijd, drie locaties “midden” in voorzieningsgebied of middenlange verblijftijd en drie locaties aan einde voorzieningsgebied of lange verblijftijd.

2.3 Identificatie van *Aeromonas* tot soortniveau

Binnen het geslacht *Aeromonas* worden op dit moment 24 verschillende soorten onderscheiden (14) en in het onderzoek is bepaald welke *Aeromonas*-soorten voorkomen in het drinkwater van de vijf eerdere genoemde pompstations.

2.3.1 Biochemische eigenschappen

Aeromonas-stammen kunnen worden getypeerd/geïdentificeerd op basis van verschillende biochemische eigenschappen. De belangrijkste biochemische kenmerken van de meest voorkomende soorten is weergegeven in Tabel 2.2. Dit is een samenvatting van een veel groter overzicht van karakteristieken van verschillende *Aeromonas*-soorten (7). Een onbekende stam kan door het optreden van groei, gasvorming, splitsing, resistentie, enz worden geïdentificeerd met behulp van de referentietabel. Helaas is deze typering niet geheel eenduidig omdat er binnen een soort verschillende reacties kunnen optreden bij het testen van de verschillende stoffen (zie ± kenmerk in Tabel 2.2). Door echter (vele) verschillende kenmerken van een stam te bepalen wordt getracht om met enige zekerheid een stam te identificeren.

Tabel 2.2. Identificatie van *Aeromonas*-stammen op basis van biochemische eigenschappen*

Soort	D-glucose	Voges-Proskauer	L-Arabinose	Esculine splitsing	Elastase	Salicine	Hemolysis
<i>A. hydrophila</i>	+	+	±	+	±	±	+
<i>A. caviae</i>	-	-	+	+	-	+	-
<i>A. sobria</i>	±	-	-	-	-	-	-
<i>A. veronii</i>	±	±	-	+	-	+	+
biovar <i>veronii</i>							
<i>A. veronii</i>	±	±	±	-	-	-	+
biovar <i>sobria</i>							
<i>A. media</i>	-	-	+	±	-	±	±
<i>A. salmonicida</i>	±	±	+	±	±	±	±
<i>A. eucrenophila</i>	±	-	±	±	-	±	±

*, +, positief (groei/gasvorming/splitsing), -, negatief; ±, deel van de stammen positief en deel negatief

2.3.2 DNA-volgorde van het *gyrB* gen

Voor het identificeren van onbekende *Aeromonas*-stammen is, naast de hierboven beschreven biochemische typering, het ook mogelijk om hiervoor de DNA-volgorde van een bepaald gen te gebruiken. In de microbiologie wordt hiervoor veelal het 16S rRNA gen gebruikt. Het 16S rRNA gen is echter binnen het geslacht *Aeromonas*, zoals eerder genoemd, zeer geconserveerd, waardoor er onvoldoende verschillen zijn voor een eenduidige typering. In 2006 is een methode beschreven om met behulp van de DNA-volgorde van het *gyrB* gen *Aeromonas*-soorten te nauwkeurig te identificeren (16). Dit gen is minder geconserveerd maar de topografie van een fylogenetische stamboom op basis van de DNA-volgorde van dit gen is vergelijkbaar met de topografie van het 16S rRNA gen. De verschillen op het *gyrB* gen zijn dus gekoppeld aan de onderlinge verwantschap. Dit maakt het *gyrB* gen geschikt voor identificatie op soortniveau (16). Voor het bepalen van de DNA-volgorde wordt het *gyrB* gen van een stam vermenigvuldigd met PCR en wordt van dit product de DNA-volgorde bepaald met behulp van sequentieprimers (Tabel 2.3).

Tabel 2.3. Primers voor het vermenigvuldigen en bepalen van de DNA-volgorde van het *gyrB* gen van *Aeromonas*

Primer	Positie	Doel*	Referentie
UP-1	273-312	PCR	(33)
UP-2r	1527-1485	PCR	(33)
UP-1S	273-312	DNA	(16)
UP-2Sr	1527-1485	DNA	(16)
UP-3	548-567	DNA	(16)
UP-4	997-1014	DNA	(16)
UP-5r	917-897	DNA	(16)
UP-6r	1283-1259	DNA	(16)

*, PCR-primers of primers voor het bepalen van de DNA-volgorde

De DNA-volgorde van het *gyrB* gen van een stam wordt met behulp van specifieke software (Bionumerics) vergeleken met de DNA-volgorde van het *gyrB* gen van een referentiepanel van *Aeromonas*-soorten. Deze referentiesequenties zijn beschikbaar in de openbare sequentiedatabase. Op basis van de meest overeenkomende sequentie kan de onbekende stam worden geïdentificeerd.

Een beperking van de methode om *Aeromonas*-stammen te identificeren met het *gyrB* gen is dat de kosten relatief hoog zijn. Het doel van het onderzoek was om een goed beeld te krijgen van de diversiteit en identiteit van de *Aeromonas*-stammen in het distributienet. Hiervoor is het noodzakelijk om voldoende stammen te analyseren. Om kosten te besparen zijn alle geselecteerde stammen in eerste instantie gekarakteriseerd met de DNA-fingerprint methode, "Amplified Fragment Length Polymorphism" of kortweg AFLP-methode. Deze typeringsmethode wordt routinematig in het KWR laboratorium uitgevoerd. Het resultaat van de AFLP-analyse is van elke geanalyseerde stam een karakteristiek DNA-bandenpatroon. Met specifieke software (Bionumerics) zijn alle DNA-bandenpatronen onderling vergeleken. Naast de onbekende stammen uit het distributienet zijn ook DNA-bandenpatronen afkomstig van de *Aeromonas*-referentiestammen (Tabel 2.1) geanalyseerd en vergeleken. Van elk cluster van stammen met een overeenkomstig bandenpatroon zijn vervolgens enkele stammen geselecteerd voor een sequentieanalyse van het *gyrB* gen. Met deze aanpak is het mogelijk om met beperkte kosten relatief veel stammen nauwkeurig te identificeren en te karakteriseren.

2.4 Groei van *Aeromonas*-soorten bij verschillende incubatietemperaturen

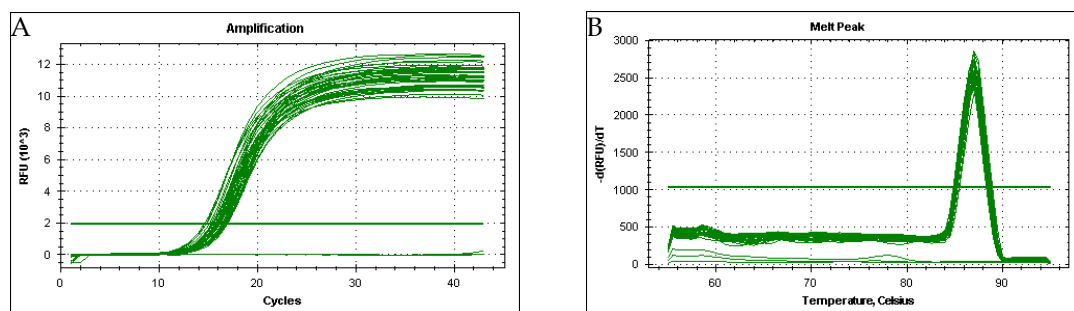
Van elke soort dat is geïdentificeerd op basis van de DNA-volgorde van het *gyrB* gen is ook bepaald of de soort groeit op een agarmedium bij 30°C en 37°C. Hierbij is het standaardmedium (ADA) toegepast.

3 Resultaten en Discussie

3.1 qPCR voor *Aeromonas*

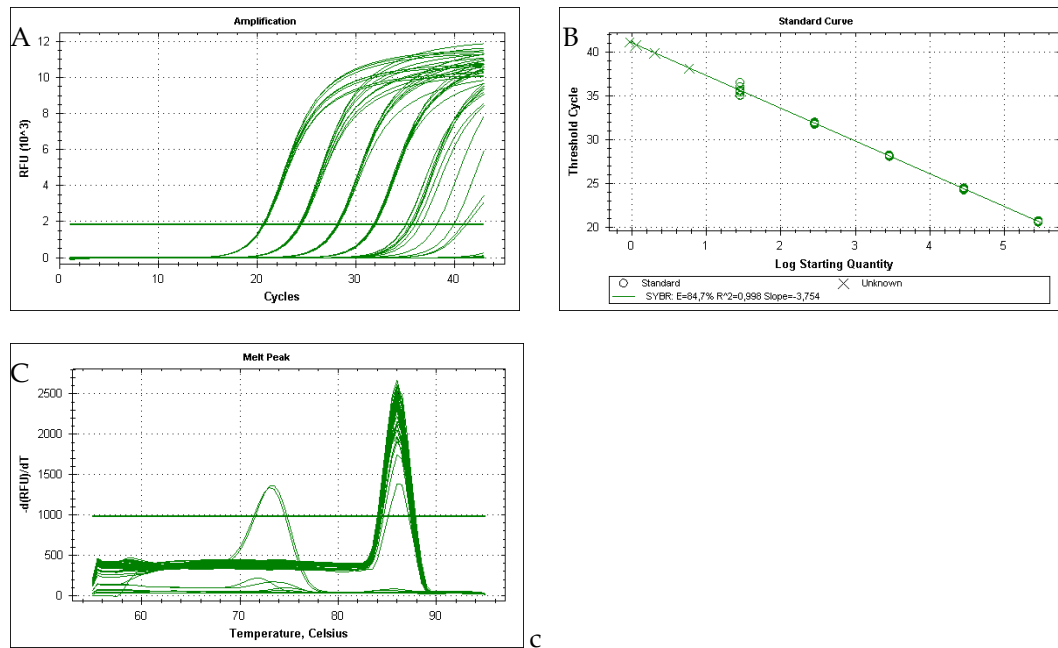
3.1.1 qPCR-methode voor *Aeromonas* spp.

De DNA-volgorde van de primers die in de literatuur zijn beschreven (15, 34) komt overeen met de *Aeromonas*-sequenties die momenteel beschikbaar zijn in de openbare database en de DNA volgorde van de primers blijkt ook voldoende te verschillen met andere verwante bacteriegeslachten. Deze primers (Tabel 3.1) zijn dus geschikt voor toepassing in de qPCR-methode. Detectie van het geamplificeerde DNA in de qPCR vindt plaats door kleuring met een DNA-bindende kleurstof (Sybr-green). In Figuur 3.1 is het resultaat weergegeven van de detectie van DNA van alle referentiestammen (Tabel 2.1) met de specifieke primers in de qPCR reactie. Het DNA van alle referentiestammen wordt vermenigvuldigd en ook de zogenaamde smeltcurve/temperatuur (Figuur 2.1B) is hetzelfde voor de 13 stammen. Indien de smeltemperatuur hetzelfde is, kan worden geconcludeerd dat het gevormde PCR-product ook overeenkomstig en specifiek is.



Figuur 3.1. qPCR resultaat van analyses van referentiestammen (A) en smeltanalyse van qPCR product (B).

Voor het kwantificeren van het 16S rRNA gen van *Aeromonas* in watermonsters is een DNA-kalibratiesuspensie ontwikkeld. In Figuur 3.2 is het qPCR resultaat weergegeven van analyse van de kalibratiereeks. Detectie van het gevormde DNA is afhankelijk van de oorspronkelijke DNA-concentratie in het monster. Hoe hoger deze concentratie hoe eerder de detectie plaatsvindt. In Figuur 3.2A zijn de vijf DNA-verdunningen weergegeven, waarbij de meest linkse curve de hoogste concentratie DNA bevat. Incidenteel wordt ook een PCR-product gevormd in de blanco monsters (meest rechts curven). De smeltcurve van het product in de blanco wijkt echter af van de smeltcurve van de specifieke producten van de kalibratiecurve. Vermoedelijk is het product in de blanco een zogenaamde primer-dimer product. Dit is een klein DNA-fragment dat wordt gevormd door de twee primers maar heeft hoegenaamd geen invloed op de analyse. In Figuur 3.2B is de kalibratiecurve weergegeven die op basis van de resultaten van de qPCR en de oorspronkelijke DNA-concentratie is berekend. Uit deze kalibratiecurve blijkt dat de detectie van het 16S rRNA gen in de qPCR reactie lineair verloopt tussen $2,3$ en $2,3 \times 10^4$ genkopieën (gk). De onderste detectiegrens is daarmee dus ongeveer 2 gk in een qPCR reactie. Op basis van deze kalibratiecurve kan het aantal 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas* in onbekende monsters worden berekend.



Figuur 3.2. qPCR resultaten van analyses van de kalibratiesuspensie (A), berekende kalibratielijnen (B) en smeltanalyse van qPCR product (C).

Tabel 3.1. Primers en probes voor detectie van *Aeromonas* spp met behulp van qPCR.

Naam	Doelorganisme	Primer/probe	positie ¹	Amplicon ² (bp)	Doelgen	Literatuur
Aer66f	<i>Aeromonas</i> spp	primer	66	547	16S rRNA gen	(15)
Aer613r	<i>Aeromonas</i> spp	primer	613		16S rRNA gen	(34)

¹Startpositie op gen; ²lengte van het PCR-product

3.1.2 qPCR methode versus celtaantallen en kweek

De aantallen *Aeromonas* zijn bepaald in kweekculturen van *A. hydrophila*, *A. veronii* of *A. sobria*. Deze kweekculturen werden verkregen door TSB medium aan te enten met *A. hydrophila*, *A. veronii* of *A. sobria* en vervolgens 8 uur (overdagcultuur) of 18 uur (overnachtcultuur) te incuberen bij 30°C. De aantallen *Aeromonas* in de overnacht- en overdagcultuur zijn vervolgens bepaald met behulp van flowcytometrie, kweek en qPCR (Tabel 3.2). In de overnachtcultures waren de celtaantallen bepaald met flowcytometrie hoger dan met kweek, dat mogelijk komt door afsterving van *Aeromonas* aan het einde van de incubatieperiode. Deze dode cellen worden nog steeds geteld met de flowcytometer, maar deze cellen zijn niet langer in staat om uit te groeien op een agarmedium. In de overdagcultures lagen de celtaantallen bepaald met flowcytometer op hetzelfde niveau als de aantallen kolonievormende eenheden bepaald met het agarmedium. Gedurende deze kortere incubatieperiode vindt er dus geen afsterving van *Aeromonas* plaats. De aantallen die werden gevonden met qPCR lagen beduidend hoger dan de aantallen die werden gevonden met kweek of flowcytometer. Een oorzaak voor dit verschil is dat *Aeromonas*-bacteriën waarschijnlijk meerdere 16S rRNA genkopieën per cel hebben. Voor *Aeromonas hydrophila* is gepubliceerd dat iedere cel tien 16S rRNA genkopieën per cel heeft (22). Wanneer iedere *Aeromonas*-soort tien 16S rRNA genkopieën per cel heeft, dan zal een selectieve qPCR methode op het 16S rRNA gen van *Aeromonas* resulteren in tien keer meer genkopieën per volume dan aantal cellen. De verhouding tussen het aantal genkopieën bepaald met qPCR

en het aantal cellen bepaald met flowcytometer is over het algemeen echter hoger dan tien en is afhankelijk van de *Aeromonas*-soort en de groeifase waarin de soort zich bevindt (Tabel 3.2). Zo is de verhouding genkopieën:cellen bij *A. sobria* ongeveer twee keer zo hoog als de verhouding bij *A. hydrophila* en *A. veronii*. Ook is de verhouding genkopieën:cellen voor alle drie de soorten ongeveer twee keer zo hoog voor cellen in de exponentiële fase (overdagcultuur) dan cellen in de stationaire fase (overnachtcultuur). De verhouding tussen genkopieën:kolonievormende eenheden (gk:kve) heeft een grotere variatie dan de verhouding genkopieën:cellen. Een logische verklaring voor deze hogere variatie is dat qPCR en flowcytometer zowel dode als levende cellen detecteren, terwijl met kweek alleen levende cellen worden gedetecteerd. Wanneer dode en/of niet kweekbare cellen aanwezig zijn, zal het verschil tussen qPCR en kweek dus alleen maar groter worden.

Tabel 3.2 Celaantallen bepaald met flowcytometrie (FCM), kolonievormende eenheden (kve) bepaald met kweek op agarmedium en 16S rRNA genkopieën (gk) bepaald met qPCR van drie verschillende *Aeromonas*-soorten overdag (o/d; 8 uur) en overnacht (o/n; 18 uur) opgekweekt in een vloeibaar medium bij 30°C en de verhoudingen tussen genkopieën en celaantallen (gk:FCM) en genkopieën en kve (gk:kve).

Soort	Incubatie	FCM (cellen/ml)	Kweek (kve/ml)	PCR (gk/ml)	Verhouding	
					gk:FCM	gk:kve
<i>A. hydrophila</i>	o/d	$2,6 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$7,1 \times 10^9$	27,3	41,8
<i>A. veronii</i>	o/d	$2,9 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$7,7 \times 10^9$	26,6	28,5
<i>A. sobria</i>	o/d	$1,5 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$6,3 \times 10^9$	42,0	35,0
<i>A. hydrophila</i>	o/n	$8,1 \times 10^8$	$7,7 \times 10^8$	$9,5 \times 10^9$	11,7	12,2
<i>A. veronii</i>	o/n	$5,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$6,8 \times 10^9$	12,6	29,6
<i>A. sobria</i>	o/n	$3,8 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$9,2 \times 10^9$	24,2	43,8

3.1.3 qPCR en *Aeromonas*-aantallen in voorzieningsgebied

In het onderzoek werden *Aeromonas*-aantallen bepaald in vijf verschillende voorzieningsgebieden met behulp van de kweekmethode en de selectieve qPCR op het 16S rRNA gen van *Aeromonas*. De *Aeromonas*-aantallen die zijn bepaald in drinkwater bereid met grondwater en in drinkwater bereid met oppervlaktewater zijn weergegeven in Tabel 3.3 en 3.4, respectievelijk.

De kolonievormende eenheden van *Aeromonas* in het gedistribueerde drinkwater varieerden van < 1 tot 2000 kve 100 ml⁻¹ bij de vijf voorzieningsgebieden. Evenals bij de reïncultures was het aantal 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas* in het drinkwater hoger dan het aantal kve van *Aeromonas*. De 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas* varieerde in het drinkwater van < 2 tot 19.400 gk 100 ml⁻¹ bij de vijf voorzieningsgebieden. De hogere aantallen 16S rRNA in vergelijking tot het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas* kan een aantal oorzaken hebben:

- Iedere *Aeromonas*-cel bevat meerdere 16S rRNA genkopieën per genoom;
- Iedere *Aeromonas*-cel bevat meerdere genoomkopieën, waardoor het aantal 16S rRNA genkopieën ook hoger is;
- Een deel van de 16S rRNA genkopieën komt van dode *Aeromonas*-cellen die niet worden bepaald met de kweekmethode;
- Een deel van de bacteriesoorten die behoren tot het geslacht *Aeromonas* zijn niet kweekbaar en worden daardoor gemist bij de kweekmethode.

Tabel 3.3. Aantallen kolonievormende eenheden (kve) en 16S rRNA genkopieën (gk) van *Aeromonas* in drinkwater bereid uit opperolaktewater. De monsters zijn genomen op verschillende locaties in het distributiesysteem en van het reinwater van ps Weesperkarspel en Andijk.

Pompstation	Locatie	Kweek (kve 100 ml ⁻¹)	qPCR (gk 100 ml ⁻¹)	Verhouding (gk:kve)
Weesperkarspel	Reinwater	11	83	7,5
Weesperkarspel	Distr 1	30	821	27,4
Weesperkarspel	Distr 2	23	612	26,6
Weesperkarspel	Distr 3	33	1001	30,3
Weesperkarspel	Distr 4	270	5190	19,2
Weesperkarspel	Distr 5	< 1	536	> 536
Weesperkarspel	Distr 6	300	4760	15,9
Weesperkarspel	Distr 7	83	1120	13,5
Weesperkarspel	Distr 8	230	4600	20,0
Weesperkarspel	Distr 9	230	8530	37,1
Andijk	Reinwater	< 1	4000	> 4000
Andijk	Distr 1	770	13900	18,1
Andijk	Distr 2	1360	6520	4,8
Andijk	Distr 3	2010	17400	8,7
Andijk	Distr 4	75	1780	23,7
Andijk	Distr 5	27	960	35,6
Andijk	Distr 6	380	6530	17,2
Andijk	Distr 7	96	1960	20,4
Andijk	Distr 8	630	15100	24,0
Andijk	Distr 9	930	19400	20,9

Aeromonas hydrophila bevat tien 16S rRNA genkopieën per cel (22). Daarnaast hebben de resultaten beschreven in paragraaf 3.1.2 laten zien dat het aantal genkopieën per cel mogelijk verschilt tussen *Aeromonas*-soorten en dat de verhouding gk:kve ook afhankelijk is van de fysiologische status van de cel (cellen in exponentiële fase versus stationaire fase). Over het algemeen varieert de gk:kve verhouding van *Aeromonas* in drinkwater tussen de 5 en 30. De variatie in deze verhouding is vergelijkbaar of kleiner dan de variatie in de gk:kve verhouding die werd waargenomen met reïnculturen van drie *Aeromonas*-stammen in verschillende fysiologische status (Tabel 3.2). Het is daarom aannemelijk dat de 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas* die zijn aangetroffen in drinkwater behoren tot *Aeromonas*-soorten die kweekbaar zijn. Niet-kweekbare en/of dode *Aeromonas*-bacteriën worden namelijk (deels) gekwantificeerd met de qPCR methode, waardoor bij aanwezigheid van veel niet-kweekbare en/of dode *Aeromonas*-bacteriën, de gk:kve verhouding van *Aeromonas* hoger is dan de gk:kve verhouding van reïnculturen van kweekbare *Aeromonas*-bacteriën. Het verschil tussen het aantal kolonievormende eenheden en het aantal 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas* in drinkwater wordt dus waarschijnlijk veroorzaakt door een verschil in het aantal 16S rRNA genkopieën en of genoomkopieën per cel. Yu et al. (34) hebben de aantallen *Aeromonas* in oppervlakte gekwantificeerd met een kweekmethode en qPCR methode op het 16S rRNA gen. De resultaten van die studie lieten ook zien dat het aantal 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas* een factor 5 tot 100 hoger waren dan het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas* in oppervlaktewater.

In twee drinkwatermonsters werd een veel hogere gk:kve verhouding van *Aeromonas* waargenomen. In het reinwater van ps Andijk lag het aantal 16S rRNA genkopieën meer dan 4000 keer hoger dan het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas*. Deze hoge gk:kve verhouding wordt waarschijnlijk veroorzaakt door dode *Aeromonas*-bacteriën, aangezien het water in de zuivering van ps Andijk wordt behandeld met chloordioxide, zodat de *Aeromonas*-bacteriën uit het actief koolfilter worden gedood. Deze dode *Aeromonas*-bacteriën groeien niet

meer op een selectief agarmedium, maar het DNA van deze dode *Aeromonas*-bacteriën kan echter nog steeds aanwezig zijn. Uit het aantal 16S rRNA genkopieën en kolonievormende eenheden en de gemiddelde gk:kve verhouding van levende *Aeromonas*-bacteriën (17,3) kan een ruwe berekening worden gemaakt van wat de minimale logverwijdering van *Aeromonas* door de chloordioxidebehandeling is. Het aantal 16S rRNA genkopieën in het reinwater was 4000 100 ml⁻¹, terwijl het aantal kweekbare *Aeromonas*-bacteriën minder dan 1 kve 100 ml⁻¹ was. Hierdoor was het aantal dode *Aeromonas*-bacteriën in het reinwater 4000/17,3=231 100 ml⁻¹. De logverwijdering door chloordioxidedosering is dus minimaal 2.4 geweest. Deze ruwe schatting van de logverwijdering door chloordioxide komt overeen met de logverwijdering die onder laboratoriumcondities is waargenomen in het reinwater van PWN (13).

Tabel 3.4. Aantallen kolonievormende eenheden (kve) en 16S rRNA genkopieën (gk) van *Aeromonas* in drinkwater bereid uit grondwater. De monsters zijn genomen op verschillende locaties in het distributiesysteem en van het reinwater van ps Zuidwolde, St. Jans klooster en Nuland.

Pompstation	Locatie	Kweek (kve 100 ml ⁻¹)	qPCR (gk 100 ml ⁻¹)	Verhouding (gk:kve)
Zuidwolde	Reinwater	7	326	46,6
Zuidwolde	Distr 1	1	< 2	
Zuidwolde	Distr 2	8	74	9,3
Zuidwolde	Distr 3	2	30	15,0
Zuidwolde	Distr 4	1000	15300	15,3
Zuidwolde	Distr 5	730	7700	10,5
Zuidwolde	Distr 6	720	7090	9,8
Zuidwolde	Distr 7	129	1300	10,1
Zuidwolde	Distr 8	2000	15100	7,6
Zuidwolde	Distr 9	440	4420	10,0
St Jans klooster	Reinwater	< 1	< 2	
St Jans klooster	Distr 1	20	105	5,3
St Jans klooster	Distr 2	< 1	< 2	
St Jans klooster	Distr 3	26	365	14,0
St Jans klooster	Distr 4	410	3950	9,6
St Jans klooster	Distr 5	86	1750	20,3
St Jans klooster	Distr 6	850	9910	11,7
St Jans klooster	Distr 7	930	12700	13,7
St Jans klooster	Distr 8	400	4320	10,8
Nuland	Distr 1	140	3280	23,4
Nuland	Distr 2	270	5130	19,0
Nuland	Distr 3	92	1690	18,4
Nuland	Distr 4	125	2150	17,2
Nuland	Distr 5	390	5870	15,1
Nuland	Distr 6	76	1110	14,6
Nuland	Distr 7	270	8130	30,1
Nuland	Distr 8	230	2270	9,9
Nuland	Distr 9	240	2560	10,7
Nuland	Distr 10	340	4190	12,3

In één van de gedistribueerde drinkwatermonsters uit het voorzieningsgebied van ps Weesperkarspel was het aantal 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas* meer dan 536 keer hoger dan het aantal kve van *Aeromonas*. Het is niet duidelijk waardoor deze afwijkende verhouding bij dit drinkwatermonster is veroorzaakt. Mogelijk dat door invloed van de binneninstallatie het aantal dode *Aeromonas*-bacteriën in dit monster ook hoger was, maar aanwijzingen daarvoor zijn niet achterhaald. Een andere mogelijkheid is dat in dit specifieke drinkwatermonster *Aeromonas*-soorten aanwezig zijn die niet kweekbaar zijn op het selectieve agarmedium voor *Aeromonas*.

De gk:kve verhouding van *Aeromonas* is geen constante waarde, maar fluctueert tussen de 5 en 30. Hierdoor is het niet mogelijk om met behulp van de qPCR methode het aantal kweekbare *Aeromonas*-bacteriën in het drinkwatermonster betrouwbaar te berekenen. De qPCR methode lijkt daardoor nog niet bruikbaar als vervanging van de huidige kweekmethode voor *Aeromonas*. Daarnaast is de huidige kweekmethode relatief snel (resultaat binnen 24 uur) en hoeft er niet direct actie worden ondernomen wanneer de *Aeromonas*-aantallen de wettelijke norm overschrijdt. Hierdoor is de behoefte om de huidige kweekmethode te vervangen door een snellere qPCR methode ook minder groot.

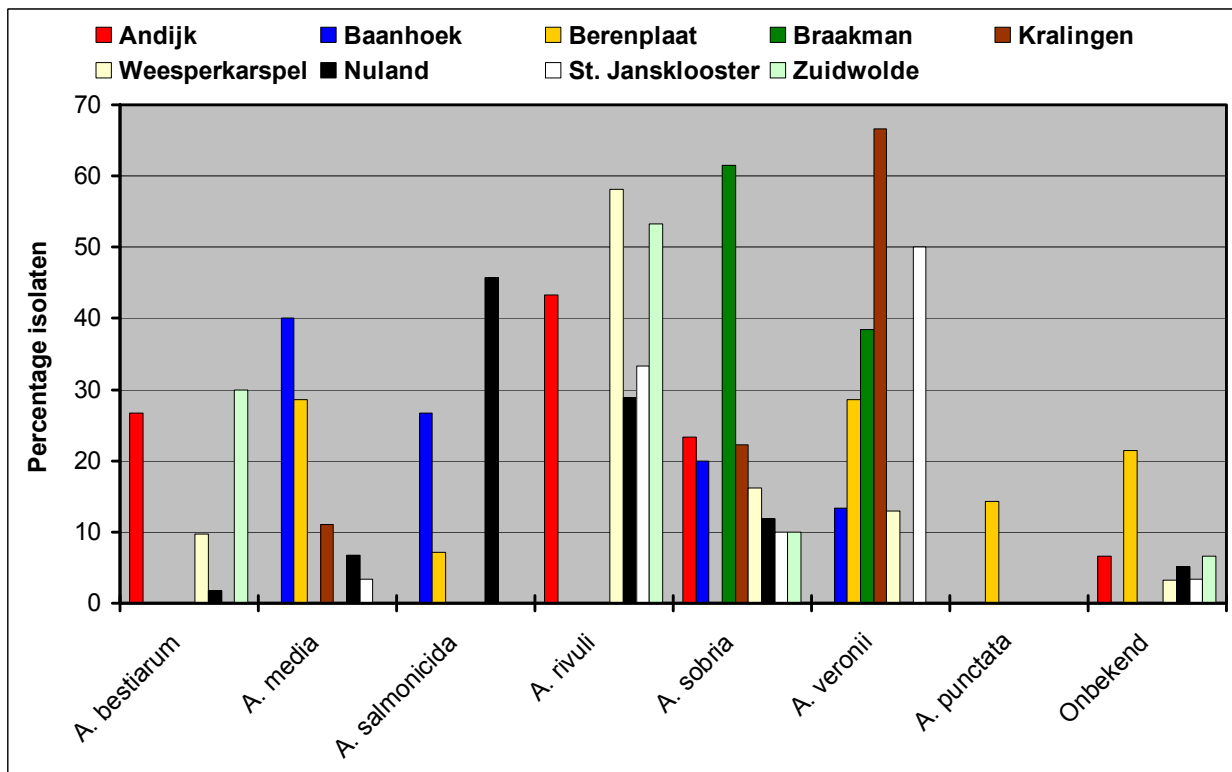
3.2 Identificatie tot soortsniveau

3.2.1 Biochemische eigenschappen versus genetische eigenschappen

In het verleden zijn *Aeromonas*-stammen geïsoleerd uit het distributiesysteem van Braakman, Berenplaat, Baanhoek en Kralingen. Deze stammen zijn met behulp van biochemische eigenschappen tot soortsniveau geïdentificeerd en vervolgens opgeslagen in de vriezer bij -80°C. Dezelfde stammen zijn in 2012 weer opgekweekt en wederom tot soortsniveau geïdentificeerd, maar deze keer met behulp van twee moleculaire methoden. Als eerste is het AFLP-patroon bepaald met AFLP en zijn de patronen vergeleken met patronen van referentiesoorten van *Aeromonas* (Tabel 2.1). Vervolgens is van een selectie van stammen de DNA-sequentievolverde van het *gyrB* gen bepaald en deze sequenties zijn vergeleken met sequenties in de wereldwijde referentiedatabase GenBank.. De resultaten van de identificatie van de *Aeromonas*-isolaten met biochemische en genetische methoden zijn weergegeven in Tabel 3.5. Met de biochemische methoden werden de isolaten geïdentificeerd als *A. hydrophila* (70% van de isolaten) of *A. caviae* (30% van de isolaten). Op basis van de AFLP patronen en de DNA-volverde van het *gyrB* gen werden de *Aeromonas*-isolaten in alle gevallen tot andere *Aeromonas*-soorten geïdentificeerd dan *A. hydrophila* en *A. caviae*. Op basis van identificatie met genetische methoden waren *A. veronii*, *A. media* en *A. sobria* het meest dominant, maar ook *A. salmonicida* en *A. eucrenophila* werden aangetroffen. Tot slot was opvallend dat drie isolaten van het drinkwater uit het distributiesysteem van ps Berenplaat niet tot het geslacht *Aeromonas* behoorden volgens de genetische typeringsmethoden. Deze drie isolaten bleken bacteriën uit het geslacht *Pseudomonas* te zijn en werden met de biochemische typeringsmethoden mogelijk ten onrechte bevestigd als *Aeromonas*.

Tabel 3.5. Verdeling van het aantal isolaten over de verschillende *Aeromonas*-soorten wanneer deze stammen tot soortsniveau waren geïdentificeerd met biochemische (B) en genetische (G) methoden. De *Aeromonas*-stammen zijn in het verleden geïsoleerd uit drinkwater dat is bemonsterd uit het voorzieningsgebied van ps Baanhoek, Berenplaat, Braakman en Kralingen.

Soort	Baanhoek		Berenplaat		Braakman		Kralingen	
	B	G	B	G	B	G	B	G
<i>A. hydrophila</i>	21	0	21	0	14	0	17	0
<i>A. caviae</i>	9	0	9	0	6	0	8	0
<i>A. veronii</i>	0	2	0	14	0	9	0	22
<i>A. media</i>	0	15	0	10	0	0	0	1
<i>A. sobria</i>	0	5	0	0	0	11	0	2
<i>A. salmonicida</i>	0	8	0	1	0	0	0	0
<i>A. eucrenophila</i>	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	0	0	0	3	0	0	0	0



Figuur 3.3. Verdeling van *Aeromonas*-isolaten over de verschillende *Aeromonas*-soorten volgens de DNA volgorde van het *gyrB* gen. De *Aeromonas*-isolaten zijn geïsoleerd uit drinkwater dat is bemonsterd in het distributiesysteem van negen verschillende pompstations.

3.2.2 Typering van *Aeromonas*-isolaten drinkwater met genetische methoden

In 2011 zijn *Aeromonas*-bacteriën met behulp van de kweekmethode geïsoleerd uit drinkwater afkomstig uit het voorzieningsgebied van ps Andijk, Baanhoek, Berenplaat, Braakman, Kralingen, Weesperkarspel, Nuland, St. Jans klooster en Zuidwolde. Per voorzieningsgebied zijn 9 tot 59 *Aeromonas*-isolaten geïdentificeerd tot soortniveau door van elke stam een AFLP-patroon te bepalen en vervolgens, op basis van verwantschap, te clusteren. Vervolgens is per cluster een aantal stammen geselecteerd waarvan de DNA-volgorde van het *gyrB* gen werd bepaald. De verkregen DNA-volgorde werd vervolgens vergeleken met *gyrB* gensequenties in de GenBank database. De verdeling van de verschillende *Aeromonas*-soorten die op deze manier werd gevonden, zijn vervolgens weer percentueel weergegeven (Figuur 3.3). Uit de resultaten volgt dat geen van de geïdentificeerde *Aeromonas*-soorten behoorde tot *A. hydrophila* of *A. caviae*, dus blijkt dat deze twee soorten *Aeromonas*-soorten niet dominant aanwezig in drinkwater. *A. sobria* en *A. veronii* werden in de meeste onderzochte distributiesystemen aangetroffen (*A. sobria* in acht van de negen distributiesystemen; *A. veronii* in zes van de negen distributiesystemen). *A. punctata* werd alleen in het distributiesysteem van ps Berenplaat aangetroffen. De overige vier soorten werden in drie tot vijf distributiesystemen aangetroffen.

A. veronii was de dominante *Aeromonas*-soort in het distributiesysteem van ps Berenplaat, Kralingen en St. Jans klooster; *A. rivuli* was het meest dominant in het distributiesysteem van ps Andijk, Weesperkarspel en Zuidwolde; *A. media* was het meest dominant in het distributiesysteem van ps Baanhoek en Berenplaat; *A. sobria* was het meest dominant in het distributiesysteem van ps Braakman en *A. salmonicida* was het meest dominant in het distributiesysteem van ps Nuland. Deze resultaten laten dus zien dat de diversiteit van kweekbare *Aeromonas*-soorten in gedistribueerd drinkwater groter is dan gedacht en dat de

dominante *Aeromonas*-soort in drinkwater verschilt tussen de distributiesystemen van de verschillende pompstations. Blijkbaar spelen factoren zoals de waterkwaliteit en/of condities in het distributiesysteem een cruciale rol bij de ontwikkeling van een *Aeromonas*-populatie in het drinkwaterdistributiesysteem, maar dit onderzoek heeft zich niet gericht op het achterhalen van de precieze factoren die hier een rol bij spelen.

A. bestiarum, *A. media*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, *A. veronii* en *A. punctata* zijn vaker in drinkwater, afvalwater en/of oppervlaktewater waargenomen (14). *A. rivuli* is in 2011 geïsoleerd uit water van een kalksteenbeek en als nieuwe *Aeromonas*-soort beschreven (6). Tot zover bekend is deze soort niet eerder in drinkwater beschreven. De identificatie van deze soorten met biochemische en genotypische methoden laat zien dat de methode (biochemisch versus genotypisch) grote invloed heeft op de uitkomst van de soortsbepaling. Onder bacteriële taxonomen zijn genotypische methoden momenteel leidend bij de bepaling van de soortnaam, waardoor momenteel de indeling met de DNA-volgorde van het *gyrB* gen betrouwbaarder is dan de indeling met de biochemische methoden.

3.2.3 Groei van *Aeromonas*-soorten bij 30 en 37°C

De *Aeromonas*-isolaten die zijn geïdentificeerd tot soortsniveau met AFLP en de DNA-volgorde van het *gyrB* gen zijn ook getest voor groei op een agarmedium bij 30 en 37°C (Tabel 3.6). Alle zes geteste *Aeromonas*-soorten groeiden optimaal op het agarmedium bij 30°C, dat niet verwonderlijk is omdat deze stammen ook zijn geïsoleerd na incubatie op een agarmedium bij 30°C. Alle stammen waren ook in staat te groeien bij 37°C, maar groei van *A. rivuli* en *A. sobria* was hierbij zeer beperkt. Mogelijk dat deze twee soorten niet worden gedetecteerd wanneer drinkwatermonsters overnacht worden ingezet op een selectief agarmedium bij 37°C. De overige vijf geteste *Aeromonas*-soorten groeien ook bij 37°C en zullen dus ook worden gedetecteerd als het koloniegetal van *Aeromonas* bij 37°C wordt bepaald.

De groei van de dominante *Aeromonas*-soorten bleek afhankelijk te zijn van het watertype of distributiesysteem. Wanneer de dominante *Aeromonas*-soort in een distributiesysteem een soort blijkt te zijn die ook bij 37°C groeit, zal het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas* bij 37°C ook hoog zijn. Doordat in het verleden is aangetoond dat dominante *Aeromonas*-soorten in drinkwater geen rol spelen bij ziekte (11) en de maximum groeitemperatuur van *Aeromonas*-soorten geen relatie heeft met vermeende pathogeniciteit (21), heeft het additioneel inzetten van een *Aeromonas* kweek bij 37°C weinig toegevoegde waarde. Daarom kan overwogen worden om deze parameter (*Aeromonas*-37°C) uit de wettelijke Inspectierichtlijn 'Harmonisatie Meetprogramma Drinkwaterkwaliteit' te schrappen.

Tabel 3.6. Groei van zes *Aeromonas*-soorten, die zijn geïsoleerd uit drinkwater, op een selectief agarmedium voor *Aeromonas* bij 30°C en 37°C.

Soort	Temperatuur	
	30°C	37°C
<i>A. bestiarum/popoffii</i>	++++	++++
<i>A. media</i>	++++	++++
<i>A. salmonicida</i>	++++	+++
<i>A. rivuli</i>	++++	+
<i>A. sobria</i>	++++	+
<i>A. veronii</i>	++++	++++

4 Conclusies en aanbevelingen

4.1 Conclusies

Met primerpaar Aer66f en Aer613r is het mogelijk om het 16S rRNA gen van *Aeromonas* spp selectief te kwantificeren in drinkwater.

Het aantal 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas* opgekweekt in TBS medium en in drinkwatermonsters is hoger dan het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas* op het selectieve ampicilline dextrine agarmedium.

De verhouding tussen het aantal 16S rRNA genkopieën en het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas* is niet constant in drinkwatermonsters. Hierdoor kan de qPCR methode niet worden gebruikt om het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas* in een drinkwatermonster te schatten.

De verhouding tussen het aantal 16S rRNA genkopieën en het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas* is afhankelijk van de *Aeromonas*-soort en de groeifase waarin de cel zich bevindt (exponentiële versus stationaire groeifase).

De *Aeromonas*-soorten die in drinkwater aanwezig zijn lijken over het algemeen kweekbaar te zijn op het selectieve ampicilline dextrine agarmedium.

Identificatie van de *Aeromonas*-stammen met biochemische methoden leidt tot andere *Aeromonas*-soorten dan identificatie met moleculaire methoden.

De soortensamenstelling van *Aeromonas* verschilt per voorzieningsgebied dus blijkbaar spelen factoren als watersamenstelling en/of condities in het distributiesysteem een cruciale rol bij de ontwikkeling van een *Aeromonas*-populatie in het distributiesysteem.

Het additioneel inzetten van een *Aeromonas* kweek bij 37°C is weinig zinvol omdat de dominante *Aeromonas*-soorten die in deze studie zijn geïsoleerd bij 30°C ook bij 37°C konden groeien en omdat dominante *Aeromonas*-soorten in drinkwater geen rol spelen bij ziekte.

4.2 Aanbevelingen

Achterhaal welke factoren (bv watersamenstelling, hydraulische condities, sediment, leidingmateriaal) van invloed zijn op de ontwikkeling van een *Aeromonas*-populatie in een distributiesysteem.

Overweeg om de parameter 'Aeromonas-kweek bij 37°C' uit de wettelijke inspectierichtlijn "Harmonisatie Meetprogramma Drinkwaterkwaliteit" te schrappen.

5 Referenties

1. **Alavandi, S. V., S. Ananthan, and N. P. Pramod.** 2001. Typing of *Aeromonas* isolates from children with diarrhoea & water samples by randomly amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction & whole cell protein fingerprinting. *Indian J Med Res* **113**:85-97.
2. **Anonymous.** 2011. Guidelines for Drinking-Water Quality. Fourth Edition. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
3. **Borchardt, M. A., M. E. Stemper, and J. H. Standridge.** 2003. *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis. *Emerg Infect Dis* **9**:224-228.
4. **Burke, V., J. Robinson, M. Gracey, D. Peterson, and K. Partridge.** 1984. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl Environ Microbiol* **48**:361-366.
5. **Edberg, S. C., F. A. Browne, and M. J. Allen.** 2007. Issues for microbial regulation: *Aeromonas* as a model. *Crit Rev Microbiol* **33**:89-100.
6. **Figueras, M. J., A. Alperi, R. Beaz-Hidalgo, E. Stackebrandt, E. Brambilla, A. Monera, and A. J. Martinez-Murcia.** 2011. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**:242-248.
7. **Garrity, G. M.** 2001-2011. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York.
8. **Hanninen, M. L.** 1994. Phenotypic characteristics of the three hybridization groups of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from different sources. *J Appl Microbiol* **76**:455-462.
9. **Hanninen, M. L., and A. Siitonen.** 1995. Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples. *Epidemiol Infect* **115**:39-50.
10. **Havelaar, A. H.** 1992. De betekenis van *Aeromonas* in drinkwater voor de volksgezondheid, p. 84-94. *In* D. Van der Kooij (ed.), *Aeromonas* in drinkwater. Vóórkomen, bestrijding, betekenis. Kiwa NV, Nieuwegein.
11. **Havelaar, A. H., F. M. Schets, A. van Silfhout, W. H. Jansen, G. Wieten, and D. van der Kooij.** 1992. Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water. *J Appl Bacteriol* **72**:435-444.
12. **Hijnen, W. A. M., G. K. Reijnen, R. H. M. Bos, G. Veenendaal, and D. Van der Kooij.** 1992. Lagere *Aeromonas*-aantallen in het drinkwater van pompstation Zuidwolde door verbeterde ontgassing en vernieuwen van het filtergrind. *H2O* **25**:370-375.
13. **Hornstra, L., D. Van der Kooij, P. W. J. J. van der Wielen, and G. Medema.** 2012. ClO2 dsinfectie van het drinkwater van pompstation Andijk. KWR Watercycle Research Institute.
14. **Janda, J. M., and S. L. Abbott.** 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev* **23**:35-73.
15. **Kampfer, P., R. Erhart, C. Beimfohr, J. Bohringer, M. Wagner, and R. Amann.** 1996. Characterization of Bacterial Communities from Activated Sludge: Culture-Dependent Numerical Identification Versus In Situ Identification Using Group- and Genus-Specific rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Microb Ecol* **32**:101-121.
16. **Kupfer, M., P. Kuhnert, B. M. Korczak, R. Peduzzi, and A. Demarta.** 2006. Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:2743-2751.
17. **Leclerc, H., L. Schwartzbrod, and E. Dei-Cas.** 2002. Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit Rev Microbiol* **28**:371-409.
18. **Morgan, D. R., P. C. Johnson, H. L. DuPont, T. K. Satterwhite, and L. V. Wood.** 1985. Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans. *Infect Immun* **50**:62-65.
19. **Moyer, N. P., G. M. Luccini, L. A. Holcomb, N. H. Hall, and M. Altwegg.** 1992. Application of ribotyping for differentiating aeromonads isolated from clinical and environmental sources. *Appl Environ Microbiol* **58**:1940-1944.

20. **Pablos, M., G. Huys, M. Cnockaert, J. M. Rodriguez-Calleja, A. Otero, J. A. Santos, and M. L. Garcia-Lopez.** 2011. Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. *Int J Food Microbiol* **147**:203-210.
21. **Schubert, R. H.** 2000. Intestinal cell adhesion and maximum growth temperature of psychrotrophic aeromonads from surface water. *Int J Hyg Environ Health* **203**:83-85.
22. **Seshadri, R., S. W. Joseph, A. K. Chopra, J. Sha, J. Shaw, J. Graf, D. Haft, M. Wu, Q. Ren, M. J. Rosovitz, R. Madupu, L. Tallon, M. Kim, S. Jin, H. Vuong, O. C. Stine, A. Ali, A. J. Horneman, and J. F. Heidelberg.** 2006. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *J Bacteriol* **188**:8272-8282.
23. **Skovgaard, N.** 2007. New trends in emerging pathogens. *Int J Food Microbiol* **120**:217-224.
24. **Talon, D., M. J. Dupont, J. Lesne, M. Thouverez, and Y. Michel-Briand.** 1996. Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological tool for clonal identification of *Aeromonas hydrophila*. *J Appl Bacteriol* **80**:277-282.
25. **Talon, D., B. Mulin, and M. Thouverez.** 1998. Clonal identification of *Aeromonas hydrophila* strains using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Eur J Epidemiol* **14**:305-310.
26. **Van der Kooij, D.** 1992. *Aeromonas* in drinkwater. Vóorkomen, bestrijding, betekenis. Kiwa N.V., Nieuwegein.
27. **van der Kooij, D., and H. R. Veenendaal.** 2013. Bepaling en beoordeling van de microbiologische groeipotentie van drinkwater. Een vergelijking van AOC, BPP en BVS. BTO 2013.in press. KWR Watercycle Research Institute.
28. **Van der Kooij, D., and H. R. Veenendaal.** 2012. Bepaling van de biofilmvormende eigenschappen van drinkwater met een continue biofilmmonitor (CBM) BTO 2011.050. KWR Watercycle Research Institute.
29. **van der Kooij, D., and H. R. Veenendaal.** 2013. Bepaling van de concentratie van biomassa in drinkwater met behulp van de hemoflow BTO 2013.in press. KWR Watercycle Research Institute.
30. **van der Wielen, P. W. J. J., and D. Van der Kooij.** 2011. Inventarisatie van *Aeromonas* en koloniegetal 22°C in drinkwater en relaties met fysisch/chemische parameters. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
31. **van der Wielen, P. W. J. J., and D. van der Kooij.** 2009. Literatuurstudie naar opportunistisch-ziekteverwekkende micro-organismen die zich in drinkwater kunnen vermeerderen. KWR Watercycle Research Institute.
32. **von Graevenitz, A.** 2007. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. *Infection* **35**:59-64.
33. **Yamamoto, S., and S. Harayama.** 1995. PCR Amplification and Direct Sequencing of *gyrB* Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of *Pseudomonas putida* Strains.
34. **Yu, C. P., S. K. Farrell, B. Robinson, and K. H. Chu.** 2008. Development and application of real-time PCR assays for quantifying total and aerolysin gene-containing aeromonas in source, intermediate, and finished drinking water. *Environ Sci Technol* **42**:1191-1200.

