



BTO 2017.039 | Februari 2018

## BTO rapport

Prestatiekenmerken van de *E. coli* bepaling met het online monitoringsysteem BACTcontrol



# BTO

## Prestatiekenmerken van de *E. coli* bepaling met het online monitoringssysteem BACTcontrol

BTO 2017.039 | Februari 2018

### Opdrachtnummer

400554-154

### Projectmanager

Luc Hornstra

### Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Hygiëne en veiligheid

### Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

### Auteur

Nikki van Bel

### Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.  
Een jaar na publicatie is het openbaar.

**Jaar van publicatie**  
2018

**Meer informatie**  
dr. Nikki van Bel  
T 030-6069516  
E [Nikki.van.Bel@kwrwater.nl](mailto:Nikki.van.Bel@kwrwater.nl)

**Keywords**  
Online meten, *E. coli*, sensors,  
monitoring

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511  
F +31 (0)30 60 61 165  
E [info@kwrwater.nl](mailto:info@kwrwater.nl)  
I [www.kwrwater.nl](http://www.kwrwater.nl)



BTO 2017.039 | Februari 2018 © KWR

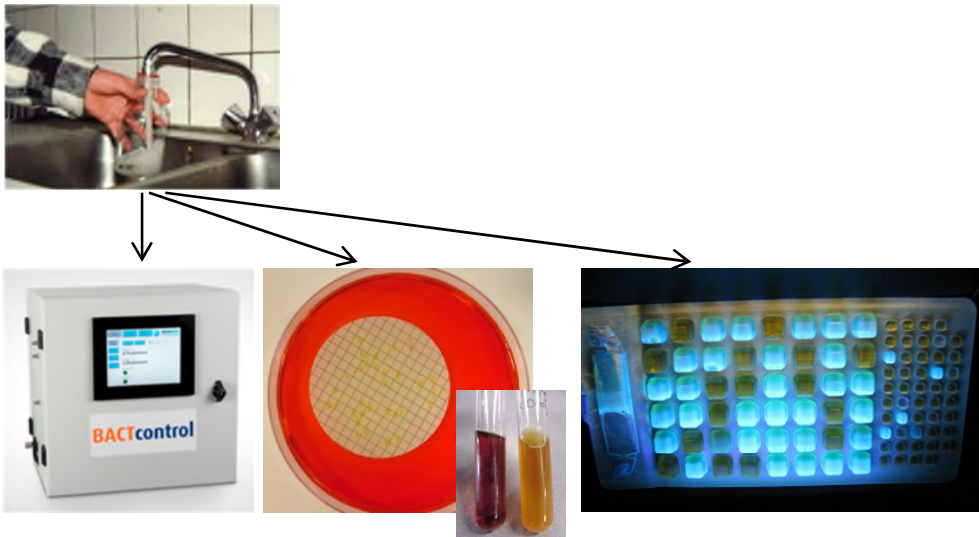
Alle rechten voorbehouden.  
Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming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

## BTO Managementsamenvatting

### *Online BACTcontrol geschikt voor monitoring hoge aantallen *E. coli*, nog niet voor lage bacterieconcentraties*

**Auteur** dr.ir. Nikki van Bel

Hoewel de snelle online *E. coli* sensor BACTcontrol goed bruikbaar is voor het meten van hogere concentraties van deze bacteriën, lijkt hij ongeschikt voor detectie van lage *E. coli* concentraties volgens het Drinkwaterbesluit (0/100 ml). Dit blijkt uit een vergelijking van de online sensor BACTcontrol met de standaard kweekmethode voor *E. coli* en de Colilert methode. In kunstmatig besmet drinkwater was het meetresultaat van de BACTcontrol bij lagere aantallen (>0 tot 20 à 100 bacteriën) niet te onderscheiden van het achtergrondsignaal. Metingen met de BACTcontrol van hogere aantallen *E. coli* vertonen wel een lineair verband met de andere methoden. Eerder onderzoek wijst op een verbeterde kwaliteitsbewaking en hoger beschermingsniveau van het drinkwaterdistributienet bij de inzet van een online *E. coli* sensor. Het huidige onderzoek laat zien dat de BACTcontrol nog onvoldoende gevoelig is voor kwalitatieve of kwantitatieve detectie van lage aantallen *E. coli*. Wel is het systeem inzetbaar voor continue monitoring van oppervlaktewater, bijvoorbeeld de bron van drinkwaterproductie, zodat verslechtering in de waterkwaliteit snel wordt opgemerkt. Gegevens over schommelingen in het aantal en de dynamiek van *E. coli* gedurende langere periodes kunnen bijvoorbeeld als input worden gebruikt voor de Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater (AMVD).



Monitoring van drink- of oppervlaktewater op de aanwezigheid van *E. coli* bacteriën: snelle, online monitoring met de BACTcontrol (links), standaard kweekmethode op een voedingsbodem met bevestiging (midden) en de Colilert methode (rechts)



### Belang: bepalen of online monitoring van *E. coli* bacteriën geschikt is voor de praktijk

De huidige methode om het aantal *E. coli* bacteriën in een watermonster te bepalen is gebaseerd op de kweektechniek. Pas na 24 of 48 uur is met deze methode duidelijk of, en hoeveel, *E. coli* bacteriën aanwezig waren in het watermonster. De laatste jaren komen steeds meer producten op de markt waarmee online en snel watermonsters kunnen worden genomen en microbiologisch geanalyseerd. Met name systemen om lage aantallen *E. coli* te bepalen zijn voor drinkwaterbedrijven interessant omdat daarmee doorlopende monitoring van het drinkwater op strategische plekken mogelijk is. Inzet van een online *E. coli* sensor in het drinkwaterdistributienet leidt tot een verbeterde kwaliteitsbewaking en hoger beschermingsniveau, zo blijkt uit eerder onderzoek (BTO 2017.014). Gezien deze ontwikkeling is het van belang dat de sensor lage aantallen *E. coli* detecteren. Een voorbeeld hiervan is de BACTcontrol, een online sensor met naar wordt aangenomen een detectiegrens van 1 - 5 *E. coli* bacteriën maar waarvan vergelijkingen met andere methoden ontbreken.

### Aanpak: vergelijking van de BACTcontrol met de standaard *E. coli* kweekmethode en de Colilert

Om prestaties van de BACTcontrol te testen hebben we deze vergeleken met twee standaardmethoden: kweek op een geschikte voedingsbodem (LSA-voedingsbodem volgens NEN-ISO 9308-1) en de commercieel verkrijgbare Colilert bepaling. Het achtergrondsignaal van de BACTcontrol bepaling op drinkwater is bepaald. Daarna is drinkwater handmatig besmet met geconcentreerd oppervlaktewater uit het Lekkanaal of met effluent van een RWZI. Het water met daarin verschillende aantallen (0 - 10.000) *E. coli* bacteriën is geanalyseerd. Resultaten verkregen met de genoemde methoden zijn met elkaar vergeleken.

### Resultaat: BACTcontrol ongeschikt voor detectie lage concentraties *E. coli*

Bij de BACTcontrol worden meetsignalen afgezet tegen een achtergrondsignaal dat optreedt bij metingen van schoon drinkwater zonder *E. coli* bacteriën. Dit signaal varieert sterk en ligt vrij hoog.

Dosering van lage aantallen (>0 tot 20 à 100) *E. coli* bacteriën levert geen correlatie op tussen de resultaten van de BACTcontrol en de kweek of Colilert methode. Omdat in dit geval de resultaten van de BACTcontrol niet systematisch boven het achtergrondsignaal uitkomen, valt de aanwezigheid van *E. coli* bacteriën in het watermonster niet aan te tonen. Bij hogere bacterieaantallen is wel een lineaire relatie vastgesteld tussen de BACTcontrol en beide standaardmethoden.

### Implementatie: snelle detectie van verandering in waterkwaliteit door continue monitoring

De BACTcontrol lijkt niet geschikt om kwantitatief of kwalitatief lage aantallen *E. coli* in het drinkwaterdistributienet te detecteren. Hogere aantallen, zoals bij een flinke besmetting, zijn wel detecteerbaar. Ook is het systeem geschikt voor monitoring van oppervlaktewater, bijvoorbeeld de bron drinkwaterproductie. Snelle detectie van verslechtering van de waterkwaliteit stelt waterbedrijven in staat hier snel en accuraat op in te spelen. Met onafgebroken monitoring ontstaat inzicht in schommelingen in het aantal en de dynamiek van *E. coli* gedurende langere periodes. Dit kan bijvoorbeeld als input worden gebruikt voor de Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater (AMVD).

### Rapport

Dit onderzoek is beschreven in rapport *Prestatiekenmerken van de E. coli bepaling met het online monitoringssysteem BACTcontrol* (BTO 2017.039). Meer informatie vindt u ook in BTO 2017.014. *Toegevoegde waarde online E. coli sensor in het distributienet*

# Inhoud

<b>Inhoud</b>	<b>1</b>
<b>Voorwoord</b>	<b>3</b>
<b>1    <b>Introductie</b></b>	<b>4</b>
1.1    Inleiding	4
1.2    Detectiemethoden voor <i>E. coli</i> bacteriën	4
1.3    Voorgaande testen van de BACTcontrol	5
1.4    Prestatiekenmerken van de BACTcontrol	5
<b>2    <b>Methoden</b></b>	<b>7</b>
2.1    Meetplan voor het bepalen van de prestatiekenmerken van de BACTcontrol	7
2.2    Verkenning ontwikkeling van een positieve controle	9
2.3    Microbiologische methoden	9
<b>3    <b>Prestatiekenmerken van de BACTcontrol</b></b>	<b>11</b>
3.1    Drinkwater	11
3.2    Oppervlaktewater en RWZI effluent	12
<b>4    <b>Discussie</b></b>	<b>20</b>
4.1    Detectiegrens	20
4.2    Gebruik van BACTcontrol in Nederlandse setting	20
<b>5    <b>Aanbevelingen</b></b>	<b>21</b>
<b>6    <b>Referenties</b></b>	<b>22</b>



# Voorwoord

Binnen het project 'Automatische snelle detectie van fecale verontreiniging tijdens distributie' is in het tweede rapport (BTO 2017.014) de waarde van online monitoring van het drinkwaterdistributienet aangegeven. Daarin is uitgegaan van een online monitoringssysteem dat fecale verontreiniging met voldoende betrouwbaarheid, gevoeligheid en snelheid kan detecteren. In dit rapport wordt onderzoek gerapporteerd naar de huidige generatie online *E. coli* meetsystemen, zoals de BACTcontrol, met als hoofdvraag of deze gevoelig genoeg is om de lage aantallen *E. coli* die in het drinkwaterdistributienet aanwezig kunnen zijn bij een fecale verontreiniging te kunnen detecteren.

Aan het begin van dit onderzoek is een schema opgezet met de details van de experimenten. Omdat bij een drinkwaterverontreiniging veelal lage aantallen *E. coli* aanwezig zijn, is het onderzoek gestart in de range van 0 - 50 *E. coli* bacteriën in het te onderzoeken monstervolume. Gedurende het onderzoek is er voor gekozen om van het schema af te wijken: uit de tussentijdse resultaten bleek dat de hoeveelheid gedoseerde *E. coli* bacteriën te laag was om kwantitatief met de BACTcontrol te kunnen meten. In plaats daarvan zijn extra metingen uitgevoerd met schoon drinkwater om informatie over de duidelijkheid en stabiliteit van het achtergrondsignaal te krijgen, en zijn daarnaast hogere aantallen *E. coli* getest om toch kwantitatief te kunnen meten. Deze extra metingen zijn uitgevoerd in plaats van de geplande RT-PCR, zoals dit was beschreven in het projectplan, aangezien een vergelijking van RT-PCR met de resultaten van de BACTcontrol niet zinvol was. De RT-PCR wordt daarom verder niet genoemd in dit rapport.

De onderzoeksopzet, de aanpassingen en de redenering hiervoor gedurende het onderzoek zijn beschreven in dit rapport.



# 1 Introductie

## 1.1 Inleiding

Uit eerder onderzoek is gebleken dat het inzetten van een online *E. coli* sensor, zoals de BACTcontrol, als alternatief voor het reguliere monsterprogramma, een duidelijk grotere zekerheid van levering van hygiënisch betrouwbaar drinkwater kan geven en het beschermingsniveau van de klant stijgt (BTO 2017.014). De prestatiekenmerken, zoals gevoeligheid en nauwkeurigheid, van de online *E. coli* sensor moeten echter wel dusdanig zijn dat deze overeenkomen met die van de kweekmethoden die gebruikt worden voor de waterkwaliteitscontrole.

Voor de inzetbaarheid van online meetsystemen is ook de meetfrequentie van belang. Op dit moment geeft de leverancier van de BACTcontrol een meetcyclus aan van 2,2 tot 4 uur:

1. 10 minuten filtratie voor 100 ml monster (tot 120 minuten voor 4 liter monster);
2. 1 uur analysetijd om afwezigheid van *E. coli* aan te tonen;
3. 1 uur reinigingstijd voor de volgende meetcyclus.

N.B. bij stap 2: Wanneer de *E. coli* concentratie zo hoog is dat deze buiten het meetbereik is, wordt de meting eerder afgebroken en is het meetresultaat eerder bekend dan na 1 uur. Handmatig is nog eerder te zien of het monster waarschijnlijk positief is, maar dit is voor online metingen niet zo relevant.

In dit project zijn de prestatiekenmerken van de BACTcontrol voor de bepaling van *E. coli* in drinkwater gekwantificeerd.

## 1.2 Detectiemethoden voor *E. coli* bacteriën

Er zijn verschillende detectiemethoden om een fecale verontreiniging, via de indicatorbacterie *E. coli*, in een watermonster aan te tonen, waarvan een aantal in dit onderzoek worden gebruikt. Deze detectiemethoden zijn gebaseerd op verschillende principes en meten elk een andere eigenschap of onderdeel van de *E. coli* bacterie. Daarom verschillen de eenheden waarin het resultaat wordt uitgedrukt ook. Zo worden met de standaard kweekmethode kweekbare *E. coli* bacteriën opgekweekt op een agarbodem. Het aantal bacteriën wordt uitgedrukt in kolonie vormende eenheden (kve) per 100 ml. De Colilert is een MPN-methode die een specifieke kweekstap combineert met detectie van *E. coli* bacteriën op basis van enzymactiviteit. Hiervan worden de resultaten uitgedrukt in MPN/100 ml. De enzymreactie die onderdeel is van de Colilert wordt gebruikt in de BACTcontrol maar wordt sinds de jaren '90 ook handmatig in het laboratorium uitgevoerd. Bij deze methode wordt gemeten hoeveel substraat er in een bepaalde periode is omgezet. Dit wordt vervolgens omgerekend naar bijvoorbeeld pmol enzymactiviteit/100 ml. Een andere, recentere, methode is de RT-PCR waarbij het aantal genkopieën *E. coli* DNA in een watermonster wordt bepaald.

De Colilert is een ISO-norm (ISO 9308-2:2012) en geeft vergelijkbare resultaten als de kweekmethode (Eckner, 1998; Fricker, 2008). De enzymreactie, gebaseerd op het enzym  $\beta$ -D-glucuronidase, wordt al langere tijd gebruikt om *E. coli* bacteriën, of een fecale verontreiniging, in water aan te tonen. Meerdere wetenschappelijke artikelen hebben de

correlatie tussen de enzymatische activiteit en het aantal *E. coli* bacteriën van een watermonsters laten zien (Fiksdal, 1994; George, 2001; Farnleitner, 2001; Servias, 2005).

Ondanks dat de verschillende detectiemethoden overeenkomsten hebben (bijvoorbeeld een kweekstap of enzymdetectie), zijn de methoden niet één-op-één vergelijkbaar. Zo zijn de Colilert en de BACTcontrol (of andere enzymatische detectiemethoden) op dezelfde enzymatische reactie gebaseerd, maar verschillen de methoden door de tussentijdse kweekstap in de Colilert. Hierdoor zijn de resultaten niet direct vergelijkbaar.

### 1.3 Voorgaande testen van de BACTcontrol

De BACTcontrol/Coliguard is door een aantal labs (*Vienna, Vitens, TZW*) onderzocht op de bruikbaarheid voor onderzoek van (drink)water. In Oostenrijk en Duitsland is de BACTcontrol getest op oppervlaktewater bij hogere *E. coli* aantallen. In de eerste studie is de BACTcontrol gedurende 100 dagen op locatie aan een kleine rivier geplaatst (Zibuschka, 2010). Daarnaast is enkele keren water bemonsterd en is hierin het *E. coli* aantal met kweek bepaald. De *E. coli* concentratie varieert tussen ongeveer 50 en 1000 kve/100 ml. Dynamiek en variatie in de *E. coli* aantallen in het water zijn goed zichtbaar. In Duitsland is binnen het onderzoeksverband 'Sichere Ruhr' de BACTcontrol een periode van 1 jaar en een periode van 5 maanden aan de rivier de Ruhr geplaatst (Sichere Ruhr, 2015). Ook hier is de BACTcontrol gebruikt om de *E. coli* dynamiek in de rivier te monitoren en zijn hoge aantallen *E. coli* bacteriën gemeten (ongeveer 100 – 30000 kve/100 ml). Dit is in enkele gevallen vergeleken met de Colilert. Hieruit blijkt dat bij hogere *E. coli* concentraties de resultaten van de BACTcontrol correleren met de resultaten van de Colilert, maar bij lagere concentraties (< 2000 MPN/100 ml) is geen correlatie.

### 1.4 Prestatiekenmerken van de BACTcontrol

Doel van dit project is om de prestatiekenmerken van de *E. coli* bepaling met de BACTcontrol in Nederlands drinkwater vast te stellen. Hierbij is ISO 16140-2:2016 als leidraad genomen voor het opzetten van het protocol.

Idealiter wordt dit onderzoek uitgevoerd met een reproduceerbare positieve controle, in dit geval zou deze bestaan uit opgekweekte *E. coli* bacteriën. Van deze kweek kan nauwkeurig de *E. coli* concentratie worden bepaald, zodat voor elk experiment een goed gedefinieerd aantal bacteriën aan het water wordt gedoseerd. Van dit artificieel besmette water wordt vervolgens de enzymactiviteit, van het enzym  $\beta$ -D-glucuronidase, gemeten. De  $\beta$ -D-glucuronidase enzymactiviteit van deze opgekweekte bacteriën moet vergelijkbaar zijn met die van 'natuurlijke' *E. coli* bacteriën zoals die in drinkwater en oppervlaktewater aanwezig zijn. Echter, onder andere Vitens en TZW zijn hier niet in geslaagd. *E. coli* bacteriën die in een laboratorium zijn opgekweekt geven geen signaal in de BACTcontrol, waarschijnlijk doordat zij het enzym niet of nauwelijks tot expressie brengen. Tevens is in de wetenschappelijke literatuur geen positieve controle voor deze methode beschreven. Opgekweekte bacteriën kunnen daarom vooralsnog niet gebruikt worden als positieve controle in dit onderzoek.

Daarom is het protocol, in overleg met de themagroep, anders opgezet. Twee opties zijn besproken met de themagroep:

1. Onderzoek aan de hand van drinkwater waaraan oppervlaktewater, met daarin 'natuurlijke' *E. coli* bacteriën, wordt toegevoegd;
2. Een positieve controle ontwikkelen en vervolgens het onderzoek uitvoeren. De inschatting is dat de meest kansrijke optie hiervoor is om *E. coli* WR1 bacteriën op te kweken in Colilert-medium.

Het voordeel van de eerste optie is dat de resultaten met 'natuurlijke' *E. coli* bacteriën relevanter zijn voor de praktijk vergeleken met wanneer opgekweekte bacteriën worden gebruikt. De *E. coli* bacteriën die in drinkwater aanwezig zijn, kunnen direct uit een fecale verontreiniging afkomstig zijn, of direct of indirect uit oppervlaktewater. De enzymactiviteit van 'natuurlijke' *E. coli* bacteriën is waarschijnlijk niet constant in water, een deel van de bacteriën kan een hogere enzymactiviteit hebben, een ander deel een lagere enzymactiviteit. De verwachting is dat deze variatie niet belangrijk is bij hogere concentraties, maar wel als er slechts enkele *E. coli* bacteriën in het water aanwezig zijn. De BACTcontrol zal gevalideerd worden bij lage concentraties zodat duidelijk wordt of hier een effect van zichtbaar is. Ook het effect van de aanwezigheid van een autochtone flora in het oppervlaktewater wordt dan duidelijk. Een nadeel is dat de watermatrix van het drinkwater verandert door het toevoegen van afval- of oppervlaktewater, wat mogelijk een effect heeft op de resultaten. In de praktijk, bij het optreden van een besmetting wordt ook een verandering in de watermatrix verwacht, dus deze optie benadert de praktijk goed. Hoe groot en variabel het effect van de autochtone flora en de watermatrix is, is nog niet bekend. Door het gebruik van een natuurlijk watermonster als *E. coli* bron is het moeilijker om de resultaten te reproduceren als het onderzoek na verloop van tijd herhaald of uitgebreid moet worden. Hetzelfde watermonster met *E. coli* bacteriën, gelijke autochtone flora en watermatrix is niet meer beschikbaar en er zal een nieuw watermonster gebruikt moeten worden.

Met de tweede optie wordt geprobeerd om een gestandaardiseerde positieve controle te ontwikkelen. Voordeel hiervan is dat eerdere resultaten behaald met deze positieve controle reproduceerbaar zijn. De Colilert (Idexx) is gebaseerd op hetzelfde meetprincipe als de BACTcontrol, waarbij enzymactiviteit in het water wordt gemeten. Echter, in de Colilert is een 24-uurs kweekstap aanwezig waarbij (niet bekend gemaakte) stoffen die in het kweekmedium aanwezig zijn de enzymactiviteit stimuleren. Daarnaast neemt het aantal bacteriën in deze 24 uur sterk toe wat het signaal versterkt. De enzymactiviteit van *E. coli* bacteriën die in dit medium wordt opgekweekt wordt daardoor mogelijk gestimuleerd, wat deze bacteriën geschikt zou maken als positieve controle. Eerdere pogingen van onder andere Vitens en TZW hebben geen positieve controle voor de BACTcontrol opgeleverd en door het ontbreken van een positieve controle in de wetenschappelijke literatuur is het moeilijk in te schatten of deze aanpak zal werken en hoeveel tijd het kost om deze methode op te zetten. Voor de hierop volgende validatie is dan mogelijk onvoldoende tijd en geld beschikbaar.

In overleg met de themagroep is besloten voor optie 1: de prestatiekenmerken van de BACTcontrol vaststellen door natuurlijke *E. coli* bacteriën die in oppervlakte- of afvalwater aanwezig te doseren aan drinkwater. Daarnaast is een verkennende studie voor optie 2 uitgevoerd waarbij in een verkennend experiment *E. coli* bacteriën opgekweekt worden in het Colilert-medium en worden geanalyseerd in de BACTcontrol.

## 2 Methodes

### 2.1 Meetplan voor het bepalen van de prestatiekenmerken van de BACTcontrol

#### 2.1.1 Lage bacterieaantallen

Het schema voor het vergelijken van de BACTcontrol ten opzichte van de conventionele kweekmethode op LSA is opgezet volgens de NEN-ISO norm 16140-2:2016. Het gaat hierbij om een kwantitatieve vergelijking van de BACTcontrol. Omdat de Colilert op hetzelfde meetprincipe berust als de BACTcontrol, was het plan de prestaties van de BACTcontrol te vergelijken met deze twee methoden.

Per experiment wordt één watermonster bereid dat vervolgens verdeeld wordt over de verschillende analyses. Elke herhaling of meting wordt gezien als een nieuw experiment waarvoor een nieuw watermonster wordt bereid.

De watermatrix die wordt getest bestaat uit (niet steriel) Tull en 't Waal leidingwater. Hieraan wordt een bepaalde hoeveelheid geconcentreerd oppervlaktewater uit het Lekkanaal, met daarin 'natuurlijke' *E. coli*, gedoseerd. Het watermonster wordt per experiment gemaakt door het concentraat en het leidingwater homogeen te mengen (*Annex B* in de norm). Op dit watermonster worden meerdere analyses gelijktijdig uitgevoerd (Tabel 2-1).

TABEL 2-1. UIT TE VOEREN ANALYSES PER WATERMONSTER.

Analyse	Aantal metingen per watermonster	Test volume per meting	Resultaten
Colilert/QuantiTray	2	100 ml	MPN/100 ml
BACTcontrol, instrumentele blanco	1	2 ml	pmol/min
BACTcontrol, meting	1	100 ml	pmol/min/100 ml
Kweek met bevestiging	3	100 ml	kve/100 ml

Om *E. coli* te doseren aan het drinkwater is geconcentreerd oppervlaktewater uit het Lekkanaal gebruikt. De bacteriën in het Lekkanaalwater zijn geconcentreerd tot 1/100e van het volume met behulp van hemoflow en centrifuge, zoals beschreven in paragraaf 2.3. De *E. coli* concentratie van dit concentraat is bepaald met de kweekmethode, waarna het wordt ingevroren, en na ontdooien is nogmaals de *E. coli* concentratie bepaald. Voor elk experiment is de juiste hoeveelheid concentraat ontdooid en gedoseerd aan het drinkwater waarna meteen de analyses zijn gestart. Elke concentratie wordt meerdere malen gemeten waarbij voor elke meting een nieuwe verdunning wordt gemaakt. In Tabel 2-2 staat weergegeven welke watermonsters gemeten worden, het aantal metingen per watermonster en waarom voor dit watermonster wordt gemeten.

TABEL 2-2 OVERZICHT VAN HET VALIDATIEPROTOCOL MET DAARIN WELKE CONCENTRATIE WAAROM WORD GETEST.

<i>E. coli</i> concentratie (kve/100ml)	Aantal metingen	Samenstelling watermonster	Opmerkingen
0	5	leidingwater	basisniveau van de BACTcontrol op drinkwater
0	10	leidingwater + gefiltreerd, geconcentreerd oppervlaktewater (0,2 µm filter)	invloed van de watermatrix op het basisniveau van de BACTcontrol op drinkwater
50	3	leidingwater + geconcentreerd oppervlaktewater	hoogste concentratie in deze validatie
40	3	leidingwater + geconcentreerd oppervlaktewater	tussenliggend punt volgens validatieprotocol
30	3	leidingwater + geconcentreerd oppervlaktewater	tussenliggend punt volgens validatieprotocol
20	3	leidingwater + geconcentreerd oppervlaktewater	tussenliggend punt volgens validatieprotocol
15	3	leidingwater + geconcentreerd oppervlaktewater	tussenliggend punt volgens validatieprotocol
10	3	leidingwater + geconcentreerd oppervlaktewater	tussenliggend punt volgens validatieprotocol
5	4	leidingwater + geconcentreerd oppervlaktewater	bepaling van de detectiegrens
3	4	leidingwater + geconcentreerd oppervlaktewater	bepaling van de detectiegrens
1	4	leidingwater + geconcentreerd oppervlaktewater	bepaling van de detectiegrens

Totaal aantal uit te voeren testen: 45 testen en 45 blanco-metingen

De norm 16140-2:2016 stelt dat van 6 samples (verdeeld over 3 concentratieniveaus: laag, midden, hoog) elk minimaal 5 herhalingen uitgevoerd moeten worden (*paragraaf 6.1.3* in de norm). In totaal gaat het om 30 testen. Naar verwachting is het aantal gedoseerde *E. coli* niet exact te kiezen doordat het om een natuurlijk monster gaat dat een vries-dooi stap heeft doorlopen. Om rekening te houden met deze variatie worden de hogere concentraties (10 – 50 kve/100 ml) drie maal getest en de lagere concentraties (1 – 5 kve/100 ml) vier maal. In totaal worden zo 45 testen uitgevoerd, verdeeld over meerdere concentratieniveaus. Deze testen worden tegelijkertijd gebruikt voor het bepalen van de 'relative trueness' van de methode (*paragraaf 6.1.2* in de norm).

Tevens moet het negatieve controlemonster tien keer gemeten worden om een stabiel achtergrondsignaal te kunnen bepalen (*paragraaf 6.1.4* in de norm). Dit bestaat uit leidingwater met daaraan toegevoegd oppervlaktewaterconcentraat gefiltreerd over een 0,22 µm filter. Om de invloed van het oppervlaktewaterconcentraat op het signaal te bepalen, wordt ook 5 keer leidingwater zonder toevoeging gemeten.

De specificiteit van de BACTcontrol om alleen *E. coli* te detecteren en geen andere micro-organismen, de inclusiviteit en exclusiviteit studie (*paragraaf 6.1.5* in de norm) kan niet wordt uitgevoerd zoals beschreven in de norm. Opgekweekte bacteriën brengen het enzym niet tot expressie waardoor hier niet voor kan worden getest. Omdat er oppervlaktewater wordt gebruikt en het water op kweek, met *E. coli* bevestiging, wordt geanalyseerd is in ieder geval vast te stellen hoeveel bacteriën van de coligroep aanwezig zijn en valt mogelijk vast te stellen of deze interfereren met het signaal van de BACTcontrol.

### 2.1.2 Hoge bacterie-aantallen

Tijdens het uitvoeren van de geplande experimenten de gedoseerde aantallen *E. coli* te laag zijn om goed kwantitatief met de BACTcontrol te kunnen meten. Om deze reden is besloten om na uitvoering van ongeveer 75% van de geplande experimenten, de resterende experimenten niet uit te voeren. In plaats daarvan is verdund effluent van de RWZI in Kaatsheuvel gemeten (Tabel 2-3). Door verdund effluent en verschillende volumes te gebruiken zijn de *E. coli* aantallen in het water hoger dan de dosering volgens het schema in Tabel 2-2. Op deze manier kan getest worden bij welke *E. coli* aantallen de resultaten van de BACTcontrol een dosis-respons relatie vertonen. Voor deze laatste experimenten is samengewerkt met de producent van de BACTcontrol (microLAN), welke zelfstandig toegang heeft tot de RWZI in Kaatsheuvel. Het RWZI effluent is bemonsterd en verdund in kraanwater door microLAN en vervolgens tegelijkertijd gemeten door een BACTcontrol bij KWR en een BACTcontrol bij microLAN. De resultaten van beide apparaten waren grotendeels vergelijkbaar, behalve dat de BACTcontrol bij KWR bij alle metingen iets hogere waardes gaf dan de BACTcontrol bij microLAN (de resultaten van de metingen bij microLAN zijn niet gegeven).

TABEL 2-3. ANALYSES OP VERDUND RWZI EFFLUENT ALS ONDERDEEL VAN DE VALIDATIEPROCEDURE. DE VOLGORDE VAN DE ANALYSEVOLUMES IS GELIJK AAN DE VOLGORDE WAARIN DE EXPERIMENTEN ZIJN UITGEVOERD.

Datum RWZI effluent	Verdunning	Analysevolumes BACTcontrol
10-7-2017	1:100	1000 ml, 100 ml, 500 ml
	1:10	100 ml, 1000 ml, 100 ml
17-7-2017	1:100	1000 ml, 100 ml, 500 ml
	1:1000	1000 ml, 100 ml, 500 ml

### 2.2 Verkenning ontwikkeling van een positieve controle

De *E. coli* WR1 stam wordt opgekweekt in Colilert-medium tot een hoge concentratie, waarna deze gewassen en verdund wordt in drinkwater. Met flow cytometry wordt direct de concentratie bacteriecellen bepaald. Hierna worden meteen de *E. coli* bacteriën geanalyseerd met kweek, Colilert/QuantiTray en de BACTcontrol. De startconcentratie is 100 kve/100 ml. Als deze bacteriën een goed signaal geven in de BACTcontrol analyse, kunnen ook lagere concentraties worden getest.

Deze test is één keer uitgevoerd (met 100 kve *E. coli*), zonder een veelbelovend resultaat. Gezien de moeilijkheden met het uitvoeren van de validatie is ervoor gekozen om deze experimenten verder niet uit te voeren.

### 2.3 Microbiologische methoden

Een groot volume Lekkanaalwater is met hemoflow en centrifugatie 100x geconcentreerd. Hemoflowconcentratie is uitgevoerd volgens het standaardprotocol (LMB-053). Centrifugatie is uitgevoerd bij 3000 x *g* voor 30 minuten, waarbij de rem uitgeschakeld is. Aan dit concentraat is glycerol toegevoegd waarna het mengsel is uitgevuld en ingevroren bij -80°C. Voor het bepalen van het *E. coli* aantal in de aliquots zijn deze ontdooid en opgelost in drinkwater waarna direct de bepalingen zijn ingezet.

Voor elk experiment is de juiste hoeveelheid geconcentreerd Lekkanaalwater ontdooid en opgelost in drinkwater. Vanuit dit homogene mengsel zijn watermonsters genomen en de volgende coliformen en *E. coli* bepalingen ingezet:

- Kweek op LSA-platen bij 36°C gevolgd door bevestiging met achtereenvolgens een oxidase- en indol-test volgens LMB-042 en NEN-ISO 9308-1 → Het gemiddelde van de bevestigingspercentages van elke experiment is gebruikt voor de berekening van het aantal aanwezige coliformen en *E. coli* bacteriën. Daarna is het gemiddelde van drie testen gebruik voor verdere analyse.
- Kweek op LSA-platen bij 44°C gevolgd door bevestiging met achtereenvolgens een oxidase- en indol-test volgens LMB-042 en NEN-ISO 9308-1 → Het gemiddelde van de bevestigingspercentages van elke experiment is gebruikt voor de berekening van het aantal aanwezige coliformen en *E. coli* bacteriën. Daarna is het gemiddelde van drie testen gebruik voor verdere analyse
- Colilert 18/Quanti-Tray volgens ISO 9308-2:2012 → Het gemiddelde van twee testen is gebruikt voor verdere analyse.

Deze resultaten zijn vergeleken met de *E. coli* bepaling op de BACTcontrol. Voor dit onderzoek is het BACTcontrol-systeem van Vitens gebruikt (Coliguard-systeem, nummer 38, bouwjaar 2013). Vlak voor de start van dit onderzoek heeft microLAN onderhoud verricht aan dit systeem, zijn er testen uitgevoerd en is het systeem goedgekeurd. Elke meting met de BACTcontrol wordt voorafgegaan door een blanco-meting, waarbij de bacteriën uit het watermonster worden gefilterd voordat het monster gemeten wordt. Hiermee wordt gecorrigeerd voor effecten van de watermatrix op de enzymactiviteit.

Een meting met de BACTcontrol verloopt als volgt: De BACTcontrol spoelt eerst alle slangen met het monsterwater. Voor een normale meting wordt vervolgens het te onderzoeken volume gefiltreerd over een 0,45 µm keramisch filter en worden bacteriën en grotere deeltjes in de reactiekamer geconcentreerd. Voor een instrumentele blanco-meting is de vloeistofstroom tegengesteld en zijn er geen bacteriën aanwezig in de reactiekamer. Na dosering van de buffer en het substraat voor  $\beta$ -glucuronidase wordt gedurende 1 uur de vorming van fluorescent signaal gemeten. Dit wordt gevormd als het enzym  $\beta$ -glucuronidase de fluorescente groep van het substraat afsplitst. De hoeveelheid fluorescent signaal geeft weer hoeveel pmol enzym er in het watermonster aanwezig was.

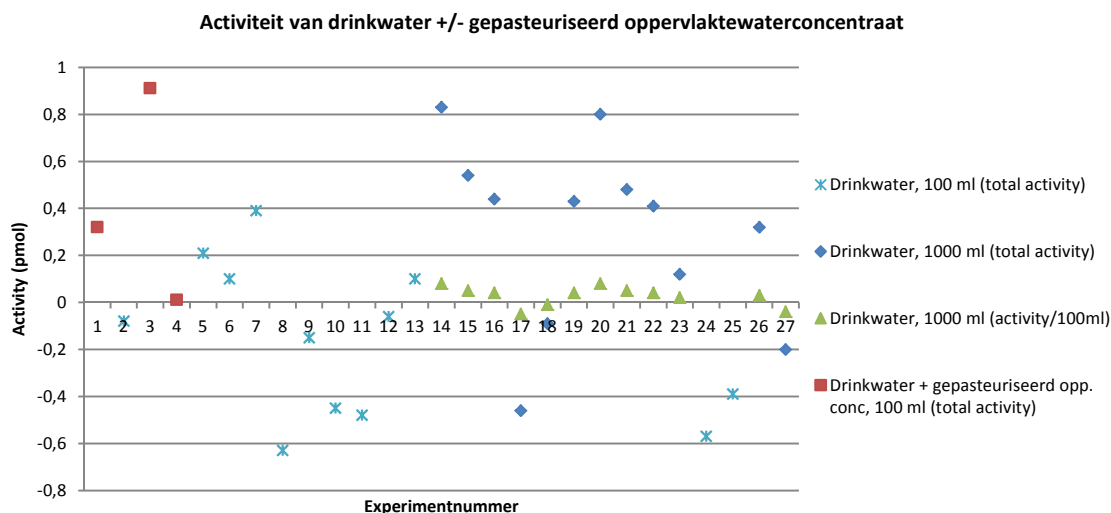


## 3 Prestatiekenmerken van de BACTcontrol

In totaal zijn er 66 metingen uitgevoerd met de BACTcontrol, waarvan 27 op drinkwater, 12 op verdund RWZI effluent en 27 op geconcentreerd oppervlaktewater van het Lekkanaal.

### 3.1 Drinkwater

De enzymactiviteit van een mogelijk besmet watermonster wordt vergeleken met de enzymactiviteit van schoon drinkwater. De enzymactiviteit van drinkwater vormt dus het achtergrondsignaal, of de ruis. Pas als de enzymactiviteit van een watermonster hierboven komt, kan betrouwbaar worden gezegd dat er *E. coli* bacteriën in het watermonster aanwezig zijn. Om daarnaast het effect van de watermatrix van geconcentreerd oppervlaktewater op de enzymactiviteit te bepalen, is drinkwater met en zonder toevoeging van gepasteuriseerd oppervlaktewaterconcentraat geanalyseerd (Figuur 3-1).



FIGUUR 3-1. ENZYMACTIVITEIT VAN DRINKWATER MET EN ZONDER GEPASTEURISEERD OPPERVLAKTEWATERCONCENTRAAT. GEGEVEN IS DE 'TOTAL ACTIVITY', DE ENZYMACTIVITEIT VAN HET GEHELE GETESTE VOLUME; EN DE 'ACTIVITY/100 ML', DE ENZYMACTIVITEIT VAN HET GETESTE VOLUME (100 OF 1000 ML) TERUGGEREKEND NAAR EEN VOLUME VAN 100 ML. IN DE EXPERIMENTEN 1 - 13 IS 100 ML WATER GEANALYSEERD WAARDOOR DE 'TOTAL ACTIVITY' EN 'ACTIVITY/100 ML' GELIJK ZIJN AAN ELKAAR. IN DE EXPERIMENTEN 14 - 27 IS 1000 ML GEANALYSEERD EN IS DE GEMETEN ACTIVITY VAN 1000 ML WATERMONSTER EEN FACTOR 10 HOGER DAN WANNEER DEZE ACTIVITEIT WORDT TERUGGEREKEND NAAR 'ACTIVITY/100 ML).

De gemeten activiteit van drinkwater varieert (Figuur 3-1). De analyse van 100 ml in experimenten 1 - 13 geeft een spreiding in de activiteit, waarbij een aantal metingen een negatief signaal geven. De activiteit van drinkwater ligt vrij hoog en de spreiding bij filtratie van 100 ml leidt tot een variërend achtergrondsignaal wat interpretatie van echte metingen van lage concentraties lastig maakt. Om het signaal van drinkwater te verlagen, is vanaf experiment 14 een groter volume van 1000 ml geanalyseerd. De totale activiteit van 1000 ml

drinkwater is ongeveer gelijk aan 100 ml drinkwater (Figuur 3-1). Echter, als de activiteit van 1000 ml wordt teruggerekend naar 100 ml ligt de activiteit veel lager en schommelt deze tussen de -0,1 en +0,1 pmol/100 ml. Dit achtergrondsignaal ligt in dezelfde range als wat in literatuur is terug te vinden voor water waarin geen tot heel weinig *E. coli* bacteriën aanwezig zijn: 0,1 – 0,2 pmol/100 ml (Ryzinska-Payer et al., 2014). In dit onderzoek meet de BACTcontrol continu het water in een Oostenrijkse bergrivier, waarin zeer waarschijnlijk geen *E. coli* aanwezig zijn en de enzymactiviteit constant laag is. De lage *E. coli* aantallen zijn hierbij bevestigd met de Colilert-methode in het laboratorium.

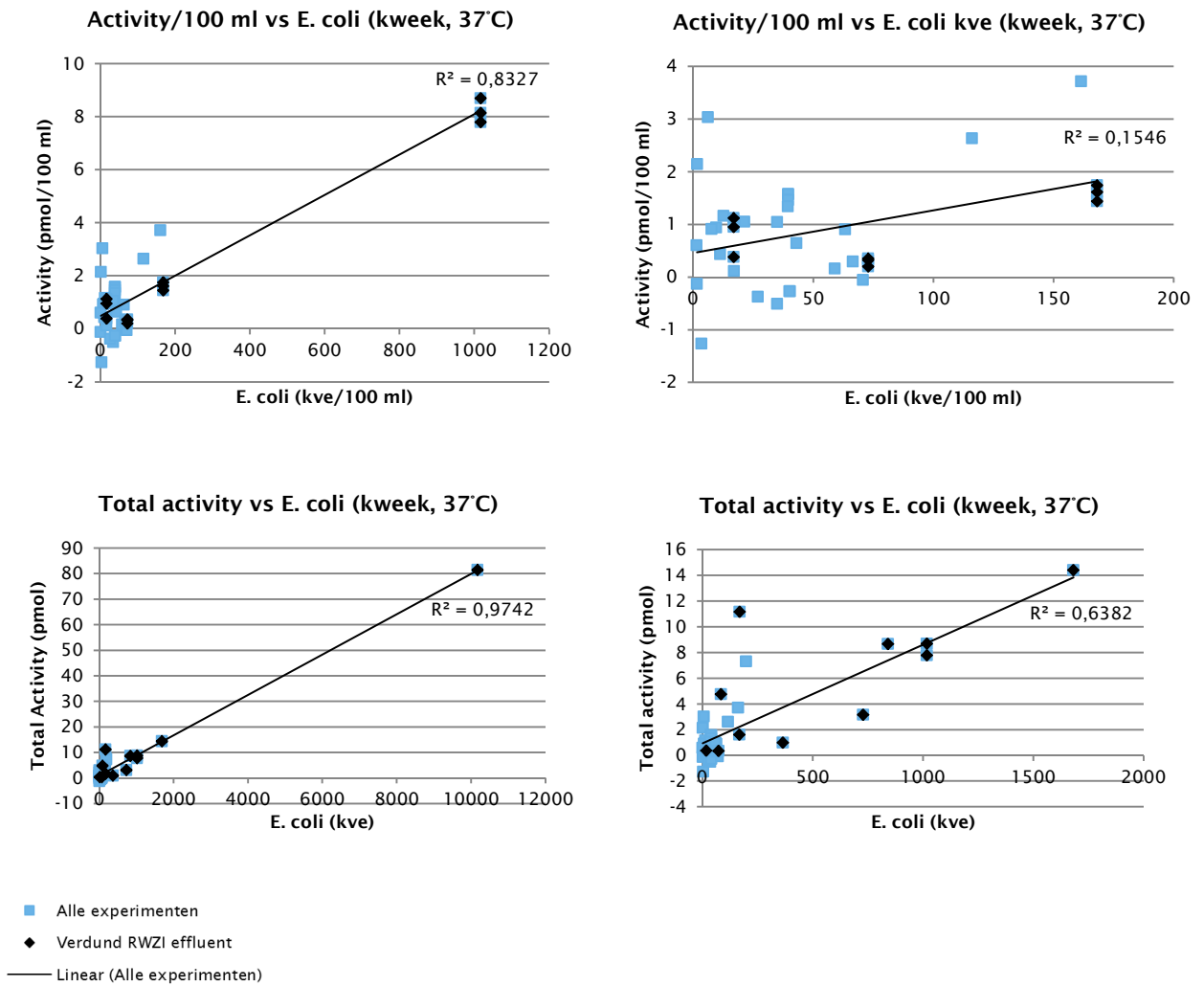
De aanbeveling is daarom om 1000 ml schoon drinkwater te analyseren om het achtergrondsignaal te bepalen en dit getal terug te rekenen naar 100 ml. De enzymactiviteit (per 100 ml) van het mogelijk besmette watermonster kan hier dan mee worden vergeleken.

### 3.2 Oppervlaktewater en RWZI effluent

Zoals beschreven in paragraaf 1.4 is het vooralsnog niet mogelijk om de BACTcontrol te valideren met in het lab opgekweekte *E. coli* bacteriën. In plaats daarvan is gebruik gemaakt van oppervlaktewater (Lekkanaal) dat is geconcentreerd en ingevroren. Per experiment is de juiste hoeveelheid bacteriën ontdooid en gemengd met drinkwater, hierop zijn de analyses uitgevoerd. Daarnaast is in een later stadium vers effluent van RWZI Kaatsheuvel verdund in drinkwater om ook hogere *E. coli* aantallen met de BACTcontrol te kunnen meten.

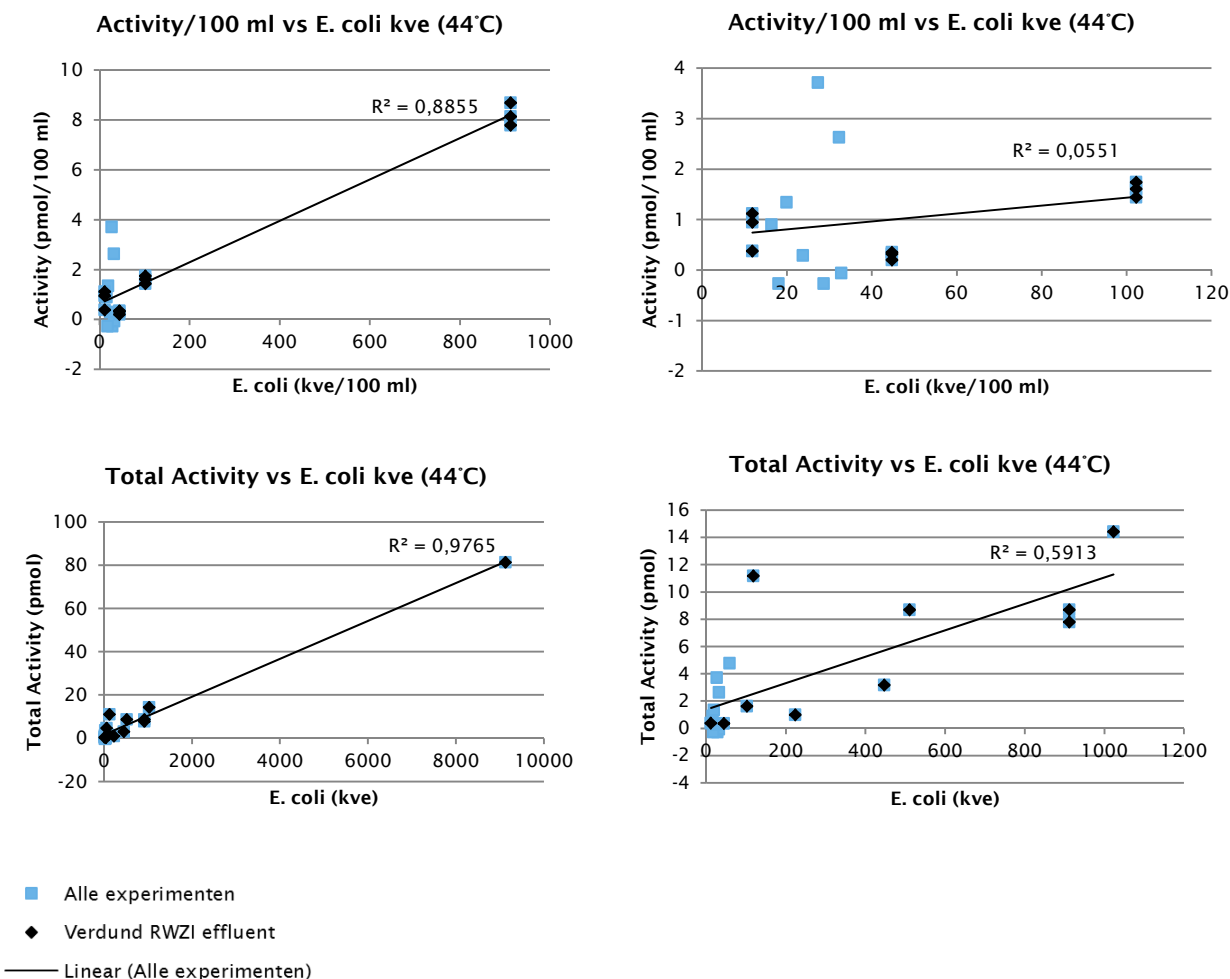
Vergelijking van de BACTcontrol-resultaten met de standaard kweekmethode van *E. coli* bij 37°C laat alleen een sterke correlatie zien wanneer hogere aantallen *E. coli* worden gedoseerd (meer dan ongeveer 100-200 kve; Figuur 3-2). Bij lagere aantallen is er geen dosis-respons relatie zichtbaar. In deze watermonsters zijn wel *E. coli* aanwezig (27 – 70,7 kve *E. coli*/100 ml,  $R^2 = 0,1546$ ), maar liggen een aantal BACTcontrol waarden onder het achtergrondsignaal van ongeveer 0,1-0,2 pmol/100 ml en sommige waarden zijn negatief. De correlatie op basis van 'total activity' ( $R^2 = 0,64$ ) lijkt beter dan die gebaseerd op 'activity/100 ml' ( $R^2 = 0,15$ ), echter, als alleen de *E. coli* aantallen lager dan 200 kve worden gebruikt, is er geen correlatie meer ( $R^2 = 0,08$ ; resultaten niet laten zien).

De BACTcontrol kan *E. coli* bacteriën uit oppervlaktewaterconcentraat of RWZI effluent meten, maar dit is pas kwantitatief bij hogere *E. coli* aantallen. Bij lagere aantallen liggen de meeste metingen wel boven de achtergrond, al geldt dit niet voor allemaal, maar is er geen duidelijk verband tussen de hoeveelheid *E. coli* bacteriën en de enzymactiviteit.



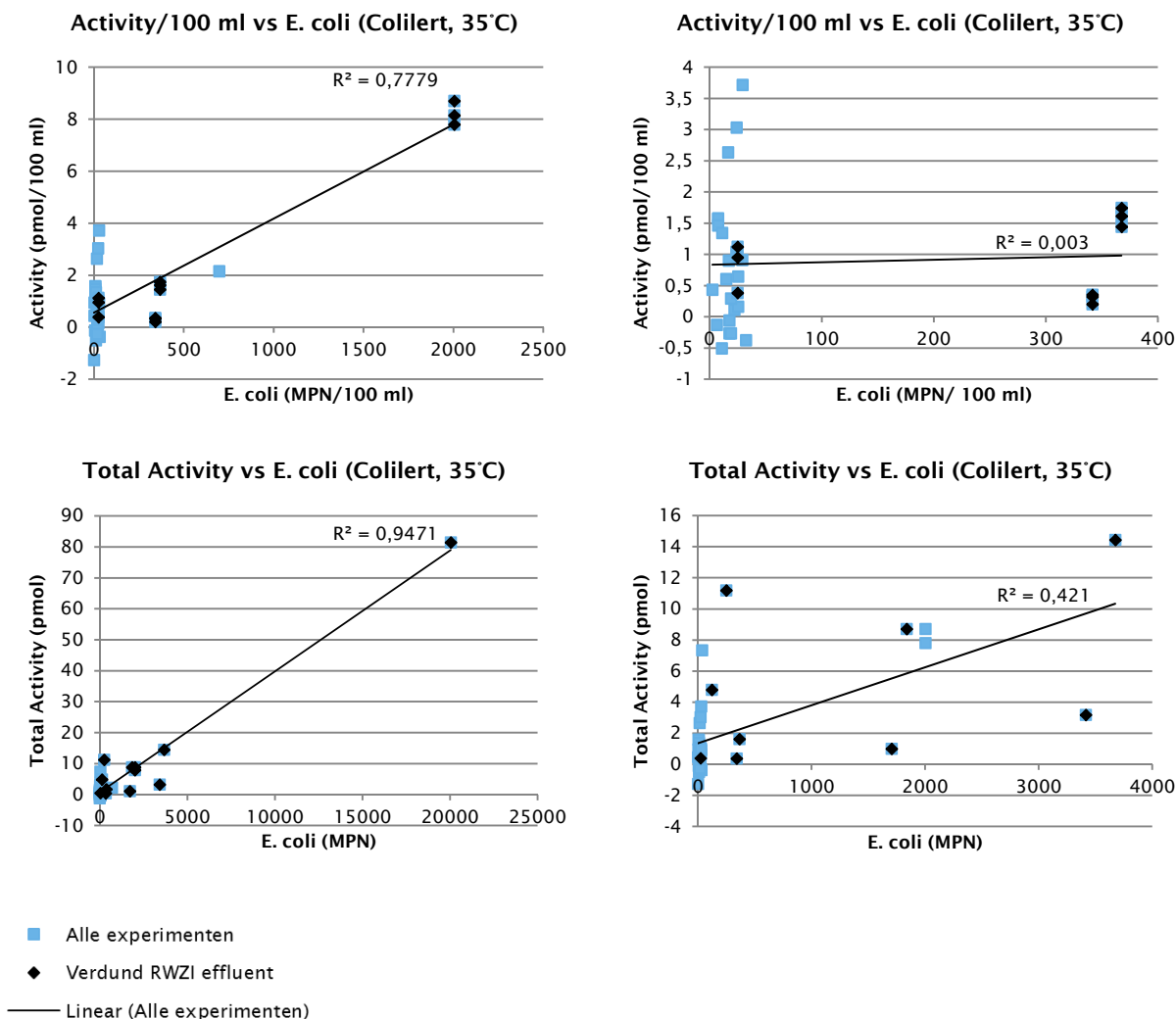
FIGUUR 3-2. ENZYMACTIVITEIT VAN HET HELE GEANALYSEERDE VOLUME VAN LEKKANAALCONCENTRAAT (ONDER) OF TERUGGEREKEND NAAR 100 ML (BOVEN) VERGELEKEN MET HET AANTAL KVE *E. COLI* BACTERIËN BEPAALD MET KWEEK BIJ 37°C. IN DE RECHTERFIGUREN ZIJN DE UITBIJTERS VERWIJDERD ZODAT DE DOSIS-RESPONS RELATIE BIJ LAGERE *E. COLI* AANTALLEN ZICHTBAAR WORDT. AANGEZIEN VOOR DE MEESTE EXPERIMENTEN HET GEANALYSEERDE VOLUME 100 ML IS, KOMEN DE FIGUREN GROTENDEELS OVEREEN.

Vergelijking van de BACTcontrol resultaten met *E. coli* aantallen (bepaald met kweek bij 44°C) geeft hetzelfde beeld (Figuur 3-3). Bij hoge *E. coli* aantallen is er een sterk verband tussen de enzymactiviteit en het aantal kve, bij lagere aantallen verdwijnt deze correlatie. Van niet alle watermonsters is het *E. coli* aantal bij 44°C bepaald, deze punten zijn daarom niet weergegeven in de grafiek.



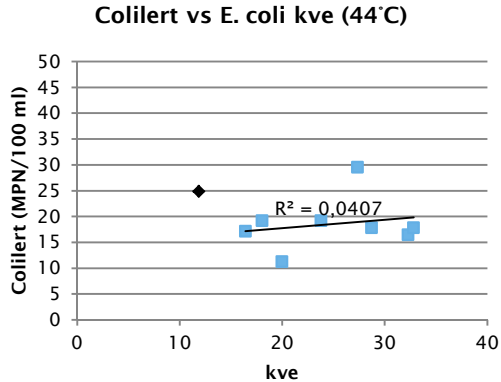
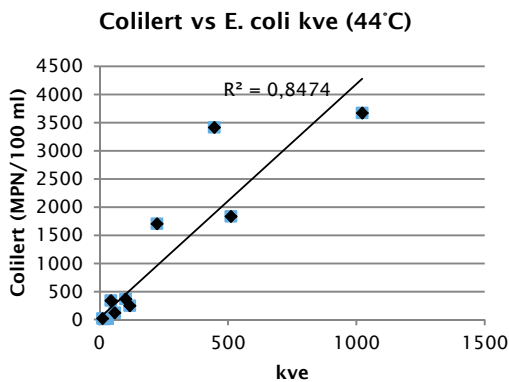
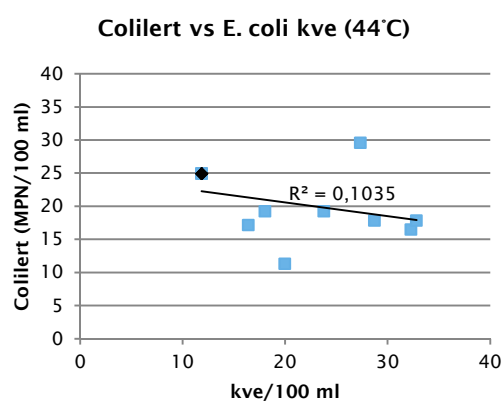
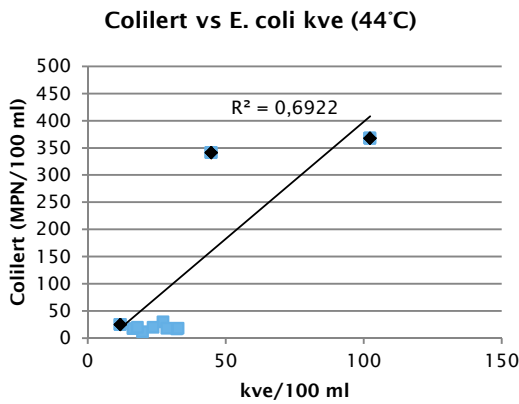
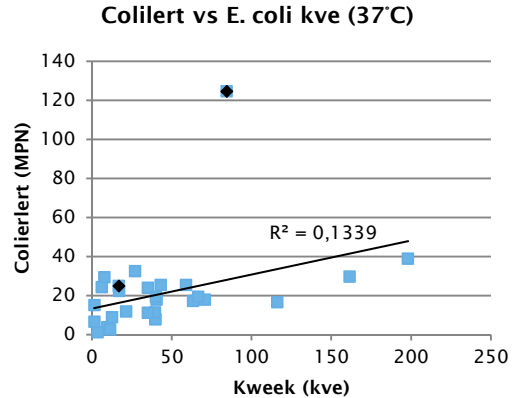
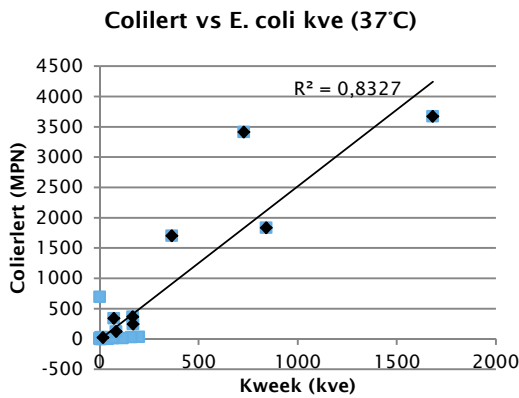
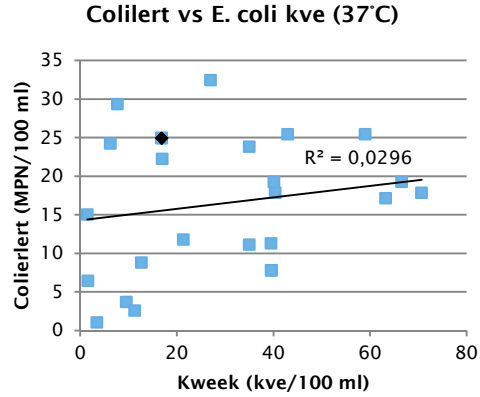
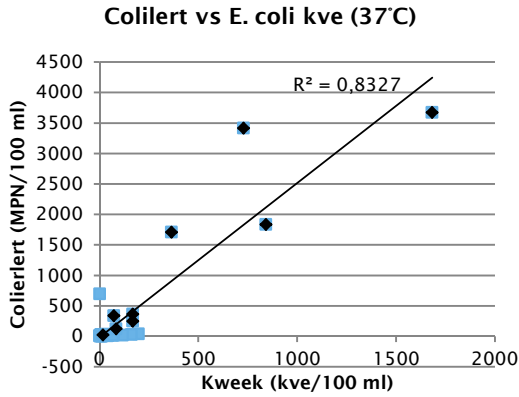
FIGUUR 3-3. ENZYMACTIVITEIT VAN HET HELE GEANALYSEERDE VOLUME LEKKANAALCONCENTRAAT (ONDER), OF TERUGGEREKEND NAAR 100 ML (BOVEN), VERGELEKEN MET HET AANTAL KVE *E. COLI* BACTERIËN BEPAALD MET KREEK BIJ 44°C. IN DE RECHTERFIGUREN ZIJN DE UITBIJTERS VERWIJDERD ZODAT DE DOSIS-RESPONS RELATIE BIJ LAGERE *E. COLI* AANTALLEN ZICHTBAAR WORDT. AANGEZIEN VOOR DE MEESTE EXPERIMENTEN HET GEANALYSEERDE VOLUME 100 ML IS, KOMEN DE FIGUREN GROTENDEELS OVEREEN.

De vergelijking van de BACTcontrol met de *E. coli* bepaling van de Colilert laat hetzelfde beeld zien (Figuur 3-4). Bij hoge *E. coli* aantallen is er een sterk verband tussen de enzymactiviteit en het aantal MPN (Most Probable Number), bij lagere aantallen verdwijnt deze correlatie grotendeels.



FIGUUR 3-4. ENZYMACTIVITEIT VERGELEKEN MET HET *E. COLI* MPN GETAL BEPAALD MET DE COLILERT. BOVEN: ENZYMACTIVITEIT EN MPN TERUGGEREKEND NAAR 100 ML, ONDER: TOTALE ENZYMEACTIVITEIT VAN HET GEANALYSEERDE VOLUME. IN DE RECHTERFIGUREN ZIJN DE UITBIJTERS MET EEN HOGE MPN, EN RELATIEF LAGE ACTIVITEIT, VERWIJDERD.

Vergelijking van de *E. coli* bepaling met de kweekmethode en de Colilert laat een vergelijkbaar beeld zien (Figuur 3-5). Bij hogere *E. coli* aantallen is er een sterk verband tussen de enzymactiviteit en het aantal kve, bij lagere aantallen verdwijnt deze correlatie. Met name bij de lage aantallen is de correlatie erg laag ( $R^2$ : 0,03 – 0,13).



- Alle experimenten
- ◆ Verdund RWZI effluent
- Linear (Alle experimenten)

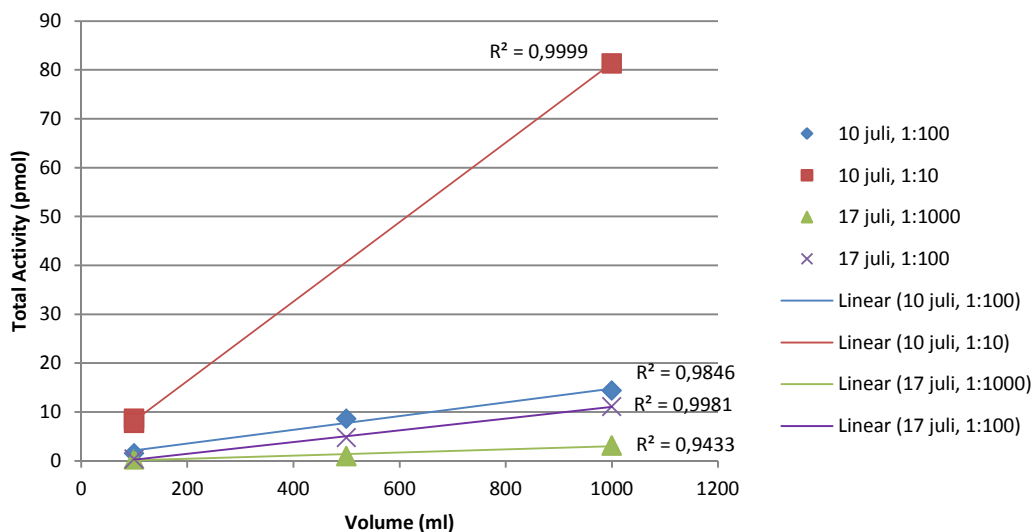
FIGUUR 3-5. *E. COLI* BEPALING MET DE COLILERT VERGELEKEN MET DE KWEEK BIJ 37°C (BOVEN) EN 44°C (ONDER). HET KVE OF MPN AANTAL IS GEGEVEN PER 100 ML OF VOOR HET TOTAAL GEANALYSEERDE VOLUME. IN DE RECHTERFIGUREN ZIJN DE RESULTATEN MET EEN HOGE MPN OF KVE VERWIJDERD.

Van één watermonster kunnen meerdere volumes worden geanalyseerd met de BACTcontrol. Deze metingen worden na elkaar, en dus niet tegelijkertijd, uitgevoerd. Door meerdere volumes te meten kan worden nagegaan of de gemeten enzymactiviteit recht evenredig stijgt met het geanalyseerde volume (Figuur 3-6, Tabel 3-1). Dit is gedaan voor de watermonsters met verdund RWZI effluent en er is duidelijk een lineair verband aanwezig tussen de enzymactiviteit en het gefiltreerde volume. De analyse van 100 ml van de 1:1000 verdunning op 17 juli geeft een activiteit van 0,38 pmol/100 ml bij 12-25 *E. coli* bacteriën. Vergeleken met de metingen op drinkwater ligt 0,38 pmol/100 ml net boven het achtergrondsignaal van +0,1 tot -0,1 pmol/100 ml. De volgende meting (500 ml) geeft een enzymactiviteit van 0,95 pmol/100 ml en zit duidelijk boven de ruis. Deze experimenten wijzen op een detectielimiet van rond de 12-25 *E. coli* bacteriën, dit is lager dan wat uit de experimenten met het oppervlaktewater kan worden geconcludeerd.

TABEL 3-1. BACTCONTROL EN KWEEK RESULTATEN VAN DE WATERMONSTERS MET VERDUND RWZI EFFLUENT

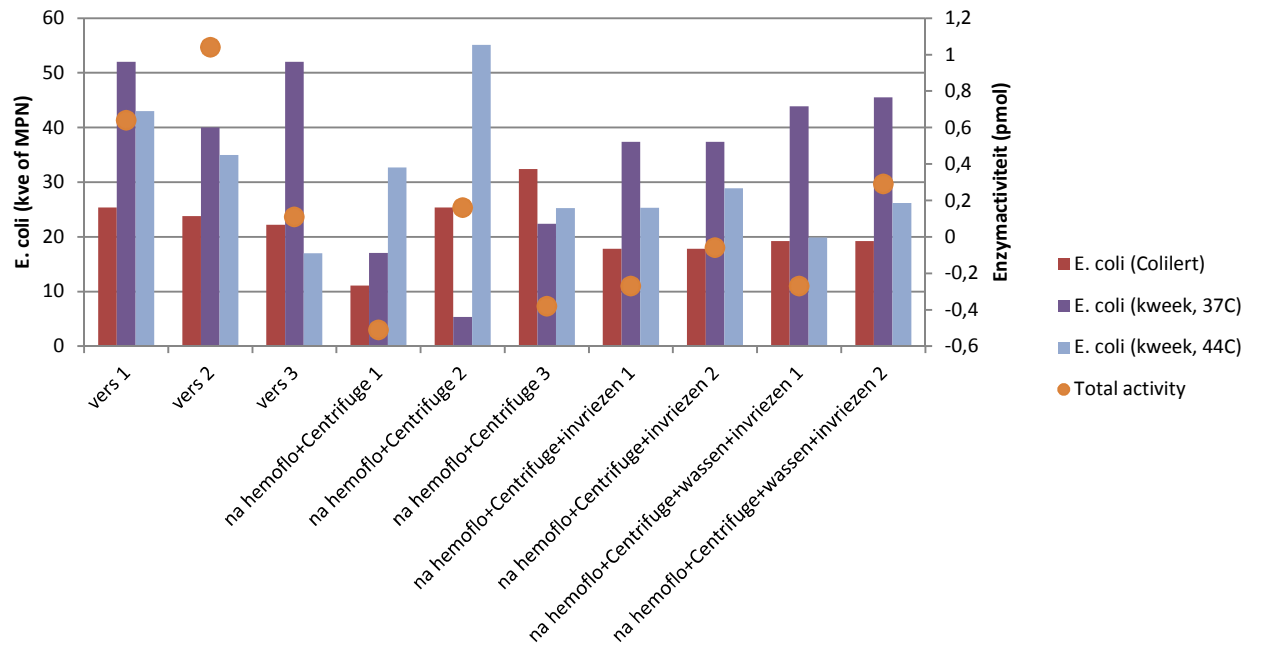
	Verdunning	BACTcontrol, <i>E. coli</i> bepaling					Colilert (MPN)
		Filtratie volume (ml)	Total activity (pmol)	Activity (pmol/100 ml)	<i>E. coli</i> , kweek 37°C (kve)	<i>E. coli</i> , kweek 44°C (kve)	
10 juli	1:100	100	1,61	1,61	168	102	368
		500	8,7	1,74	841	511	1838
		1000	14,41	1,44	1682	1023	3675
10 juli	1:10	100	7,79	7,79	1017	913	>2005
		100	8,69	8,69	1017	913	>2005
		1000	81,39	8,14	10169	9126	>20050
17 juli	1:100	100	0,35	0,35	73	45	342
		500	0,99	0,2	364	224	1708
		1000	3,16	0,32	728	448	3415
17 juli	1:1000	100	0,38	0,38	17	12	25
		500	4,77	0,95	84	59	125
		1000	11,17	1,12	169	118	249





FIGUUR 3-6. BACTCONTROL MEETRESULTATEN VAN DE WATERMONSTERS MET VERDUND RWZI EFFLUENT.

Om na te gaan of de opwerking en concentratie van het water uit het Lekkanaal effect heeft op de *E. coli* bepaling met de BACTcontrol, is van een nieuw watermonster na elke opwerkingsstap water apart gehouden en geanalyseerd met de BACTcontrol, Colilert en kweek (Figuur 3-7). De enzymactiviteit van het water is na de eerste opwerkingsstap (hemoflow + centrifuge) lager dan in het verse water. Met name bij monsters 1 en 2 daalt de enzymactiviteit sterk: bij de verse watermonsters is deze duidelijk positief (0,6 en 1 pmol), na opwerking is deze niet te onderscheiden van de ruis (-0,5 en 0,2 pmol). Dit suggereert dat de opwerking mogelijk een effect heeft op het *E. coli* gehalte en de enzymactiviteit zoals gemeten met de BACTcontrol. Maar dit kan niet met zekerheid worden vastgesteld aan de hand van deze resultaten en moet deze analyse vaker worden uitgevoerd.



FIGUUR 3-7. *E. COLI* BEPALING OP WATERMONSTERS DIE GEDURENDE DE OPWERKINGSPROCEDURE ZIJN GENOMEN.

## 4 Discussie

### 4.1 Detectiegrens

De vroegere producent van de BACTcontrol (mbOnline, met het systeem Coliguard), heeft altijd gesproken over een detectiegrens van 1-5 kve *E. coli*. Dit getal is overgenomen door de huidige leverancier microLAN. Er zijn echter geen gegevens beschikbaar van de testen die dit ondersteunen. Testen van Vitens op het eigen laboratorium en het gebruik van de BACTcontrol bij calamiteiten geven ook een detectiegrens van 1-5 kve (persoonlijke communicatie Marije Ijszenga, Vitens). Uit het huidige onderzoek blijkt dat de detectiegrens hoger ligt, tussen de 20 - 100 kve, al is het door de variatie in de metingen lastig om een detectiegrens te bepalen.

Het is onduidelijk of de hogere detectiegrens veroorzaakt wordt door de experimentele opzet, bijvoorbeeld door het opwerken en invriezen van het Lekkanaalwater. Mogelijk daalt de enzymactiviteit van de *E. coli* bacteriën, waardoor deze minder goed detecteerbaar zijn met de BACTcontrol. Aanbevolen wordt onderzoek te doen met onbehandeld oppervlaktewater om vast te stellen of dit de detectiegrens van de BACTcontrol verlaagt.

In de literatuur is de BACTcontrol/Coliguard, of de onderliggende enzymatische reactie, vaker vergeleken met kweekmethoden. Onderzoek uit Oostenrijk waarbij oppervlaktewater is getest met de Coliguard en de metingen enkele keren zijn vergeleken met de kweekmethode, laat ook een verband tussen enzymactiviteit en *E. coli* zien bij hogere aantallen (Zibuschka et al., 2011). Hetzelfde geldt voor onderzoek in de rivier de Ruhr, waarbij de correlatie tussen enzymactiviteit en *E. coli* bij hoge aantallen ( $10^4$  MPN/100 ml) sterk is, maar zwak tot niet aanwezig bij aantallen onder de  $2 \times 10^3$  MPN/100 ml (Sichere Ruhr, 2015).

De enzymatische methode die ten grondslag ligt aan de BACTcontrol metingen is eerder toegepast op oppervlaktewater of (on)behandeld rioolwater en daarbij vergeleken met de kweekmethode (Servais et al., 2005; George et al., 2001; Farnleitner et al., 2001 en review in Fiksdal and Tryland, 2008). In deze studies is een duidelijke dosis-respons relatie aanwezig tussen het aantal *E. coli* bacteriën en de enzymactiviteit, met name bij hogere aantallen ( $10^2$ - $10^9$  kve/100 ml). De detectiegrens ligt in deze studies rond de 20 - 100 kve/100 ml. Lagere detectiegrenzen zijn tot nu toe nog niet gerapporteerd.

### 4.2 Gebruik van BACTcontrol in Nederlandse setting

De *E. coli* bepaling met de BACTcontrol lijkt niet geschikt voor monitoring in het distributienet waarbij lage aantallen *E. coli* gedetecteerd moeten kunnen worden. Hogere aantallen, zoals bij een stevige besmetting, kunnen wel worden gedetecteerd. De BACTcontrol kan wel als 'early-warning' systeem gebruikt worden om bijvoorbeeld de *E. coli* aantallen bij de innamepunten van oppervlaktewater als bron voor drinkwater te monitoren. De BACTcontrol is in verschillende onderzoeken op deze manier toegepast (Sichere Ruhr, 2015; Ryzinska-Paier et al, 2014). Het gaat dan meestal om grotere aantallen *E. coli* bacteriën en er wordt gedurende langere periode gemeten. Op deze manier wordt de variatie en de dynamiek van het aantal *E. coli* bacteriën in de tijd in kaart gebracht wat informatie geeft over (oorzaken van) piekverontreinigingen en lozingsbronnen.

## 5 Aanbevelingen

De BACTcontrol lijkt niet geschikt om lage aantallen *E. coli* te detecteren in het drinkwaterdistributienet. Met het systeem kan niet de wettelijke norm van <1 kve/100 ml worden aangetoond. Hogere aantallen, zoals bij een stevige besmetting, kunnen wel worden gedetecteerd. Ook kan het systeem gebruikt worden om oppervlaktewater, dat als bron voor drinkwaterproductie wordt gebruikt, te monitoren zodat verslechtering van de waterkwaliteit snel wordt opgemerkt. Tevens wordt dan de variatie in de aantallen *E. coli* en de dynamiek over langere periode in kaart gebracht. Deze gegevens kunnen bijvoorbeeld gebruikt worden voor de AMVD.

Indien de BACTcontrol op drinkwater wordt toegepast, moet eerst bepaald worden hoe hoog en variabel het achtergrondsignaal is. Hiervoor moet een groot volume (1000 ml) worden geanalyseerd zodat het achtergrondsignaal zo laag mogelijk is en eventuele besmettingen goed gedetecteerd kunnen worden.

Er zijn aanpassingen aan de standaardinstellingen van de BACTcontrol mogelijk, zoals een langere analysetijd of een groter monstervolume, om te proberen de prestatie van de BACTcontrol te verbeteren. Verder onderzoek is echter nodig om vast te kunnen stellen of dit de methode kan verbeteren.

## 6 Referenties

BTO 2017.014. Toegevoegde waarde online *E. coli* sensor in het distributienet

Eckner KF. Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the Colilert and Enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli*, and Enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in Southern Sweden. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 64, no 88, pp 3079 – 3083.

Farnleitner AH, Hocke L, Beiwl C, Kavka GG, Zechmeister T, Kirschner AKT, Mach RL. Rapid enzyme detection of *Escherichia coli* contamination in polluted river water. 2001. *Letters in Applied Microbiology*, vol 33, pp 246 – 250.

Fiksdal L, Pommepuy M, Caprais MP, Midttun I. Monitoring of fecal pollution in coastal waters by use of rapid enzymatic techniques. 1994. *Applied and Environmental Microbiology*., vol 60, no 5, pp 1581 - 1584.

Fiksdal L, Tryland I. Application of rapid enzyme assay techniques for monitoring of microbial water quality. 2008. *Current Opinion in Biotechnology*, vol 19, pp 289 – 294.

Fricker CR, Bullock S, Murrin K, Niemela SI. Use of the ISO 9308-1 procedure for the detection of *E. coli* in water utilizing two incubation temperatures and two confirmation procedures and comparison with defined substrate technology. *Journal of Water and Health*, vol 6, no 5, pp 389 - 397.

George I, Crop P, Servais P. Use of  $\beta$ -D-galactosidase and  $\beta$ -D-glucuronidase activities for quantitative detection of total and fecal coliforms in wastewater. 2001. *Canadian Journal of Microbiology*, vol 47, pp 670 – 675.

Ryzinska-Paier G, Lendenfeld T, Correa K, Stadler P, Blaschke AP, Mach RL, Stadler H, Kirschner AKT, Farnleitner AH. A sensitive and robust method for automated online monitoring of enzymatic activities in water and water resources. 2014. *Water Science & Technology*, vol 69, no 6, pp 1349 – 1358.

Servais P, Garcia-Armisen T, Lepeuple AS, Lebaron P. An early warning method to detect faecal contamination of river waters. 2005. *Annals of Microbiology*, vol 55, no 5, pp 151 – 156.

Sichere Ruhr. Gemeinsamer Abschlussbericht aller Verbundprojektpartner  
Förderkennzeichen 02WRS1283A bis J. 2015

Zibuschka F, Lendenfeld T, Lindner G. Near real time monitoring von *E. coli* in Wasser. 2010. *Österreichische Wasser- und Abfallwirtschaft*, vol 62, issue 11-12, pp 215 - 219.