

A network diagram consisting of various sized light blue circles connected by thin white lines, set against a solid blue background. The circles vary in size, with some being significantly larger than others, and they are interconnected in a complex, non-linear fashion.

KWR 2021.102 | December 2021

**Online monitoring van
Aeromonas in een
drinkwaterdistributie-
systeem zonder chloor**

Samenwerkingspartners



Rapport

Online monitoring van *Aeromonas* in een drinkwaterdistributiesysteem zonder chloor

KWR 2021.102 | December 2021

Opdrachtnummer

402535-001

Projectmanager

Ton van Leerdam

Opdrachtgever

TKI Watertechnologie (projectpartners: Biotrack, Evides, Oasen, PWN)

Auteur

dr. ir. Nikki van Bel

Kwaliteitsborger

dr. Paul van der Wielen

Verzonden naar

Gerard Schouten (Biotrack), Andries van Eckeveld, Julia Wunderer (Evides), Matthijs Rietveld
Emmanuelle Prest (PWN), Maarten Lut (Oasen)

Dit onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met Biotrack, PWN, Oasen en Evides. Deze activiteit is mede gefinancierd met PPS-financiering uit de Toeslag voor Topconsortia voor Kennis en Innovatie (TKI's) van het ministerie van Economische Zaken en Klimaat en de resultaten zijn openbaar.

Werkwijzen, rekenmodellen, technieken, ontwerpen van proefinstallaties, prototypen en door KWR gedane voorstellen en ideeën alsmede instrumenten, waaronder software, die in het onderzoeksresultaat zijn opgenomen, zijn en blijven het eigendom van KWR. Ook alle rechten die voortvloeien uit intellectuele- en industriële eigendom, alsmede de auteursrechten, blijven bij KWR berusten en derhalve eigendom van KWR.

Keywords

Aeromonas, TKI, online sensor, Biotrack

Jaar van publicatie
2021

Meer informatie
Nikki van Bel, PhD
T +31 30 606 9516
E Nikki.van.Bel@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl

KWR

December 2021 ©

Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - 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.

Voorwoord

Dit rapport beschrijft activiteiten die binnen het TKI-project 'Online monitoring *Aeromonas* in een drinkwater distributiesysteem zonder chloor' zijn uitgevoerd. In verband met de gevolgen van de coronamaatregelen voor Biotrack is in gezamenlijk overleg met alle partners besloten om het project vroegtijdig te beëindigen.

Ondanks het vroegtijdig stoppen van het project zijn binnen dit project wel alle voorbereidingen getroffen om experimenten in het laboratorium en het veld uit te voeren. De experimenten zelf zijn echter slechts in zeer beperkte mate uitgevoerd. In dit rapport worden de voorbereidingen beschreven alsof ze ook daadwerkelijk zijn uitgevoerd en worden ook enkele resultaten getoond. Aangezien het rapport geen (uitgebreid) onderzoek of testen beschrijft, bevat dit rapport geen discussie of conclusies.

Inhoud

Samenwerkingspartners	2
Rapport	3
Voorwoord	4
Inhoud	5
1 Aanleiding en doel onderzoek	6
1.1 Aanleiding	6
1.2 Doel	7
1.3 Opzet rapport	7
2 Opzet validatie <i>Aeromonas</i>-analyse op de Biotrack sensor	8
2.1 Validatie <i>Aeromonas</i> -analyse op de Biotrack vergeleken met de kweekmethode en qPCR-analyse	8
2.1.1 Relative trueness study	8
2.1.2 Accuracy Profily study	9
2.1.3 Limit of Quantification study	10
2.1.4 Inclusivity study en exclusivity study	11
3 Mogelijke testlocaties Evides	15
4 Analyse drinkwater en spuismonsters met Biotrack	16
5 Referenties	21

1 Aanleiding en doel onderzoek

1.1 Aanleiding

Huidige microbiologische analyses om de drinkwaterkwaliteit te monitoren hebben een aantal nadelen: 1) ze nemen relatief veel tijd in beslag, 2) zijn kostbaar, 3) er is altijd een monsternemer en analist nodig en 4) het gaat om een momentopname. Monsternamen en analyse van het drinkwater wordt grotendeels handmatig uitgevoerd waardoor continue monitoring niet mogelijk is. Sinds een aantal jaren komen er microbiologische sensoren beschikbaar, deze zijn met name gericht op de detectie van fecale indicatoren (*E. coli* en enterococci) of het monitoren van de algehele microbiële populatie (b.v. ATP, het totale aantal bacteriën en flow cytometrie). Een nadeel van deze laatste categorie kan echter zijn dat deze niet geschikt zijn om alleen specifieke bacteriën te meten. Een parameter waarvoor nog geen of weinig sensoren op de markt zijn, is het monitoren van groei in het distributienet. *Aeromonas* is een wettelijke parameter voor groei in het drinkwaterdistributienet.

Het aantal *Aeromonas* bacteriën overschrijdt in verschillende distributiegebieden de wettelijke norm. De huidige monitoringsgegevens van *Aeromonas*, maar ook van andere groeiparameters, uit het distributiegebied tonen dat deze in de tijd sterk variabel kunnen zijn. Om groei in het distributiesysteem in de toekomst nog beter te kunnen beheersen en om de betekenis van deze variatie, en de daaruit ontstane waterkwaliteitsproblemen, te kunnen beoordelen, is kennis nodig over de groeiemechanismen, gedrag en voorkomen van deze bacteriën in het distributiegebied. Met deze kennis kunnen vervolgens maatregelen worden ontwikkeld waarmee de groei tijdig en effectief kan worden bestreden. Hiervoor zijn meer, frequenter, online en semi-continue meetresultaten nodig. Met de conventionele microbiologische kweekmethoden is dit echter te kostbaar en ook vanuit praktisch oogpunt niet haalbaar. Pas minimaal 24 uur na het inzetten van het watermonster met de kweekmethode is het resultaat bekend. Er zijn snellere laboratoriumanalyses beschikbaar (b.v. qPCR), maar het nadeel is nog steeds dat er geen continue, inline en online metingen uitgevoerd kunnen worden, dat een monsternemer en/of analist nodig is en de kosten van deze analyses hoog zijn. Online microbiologisch meten heeft daarom al langer de belangstelling van de drinkwaterbedrijven. Ook vanuit het perspectief van de hygiënische drinkwaterkwaliteit na ingrepen is er al langer behoefte aan semi-online microbiologische meettechnieken en de verwachting is dat in de toekomst steeds meer snelle en online sensoren toegepast zullen worden in het distributienet. Microbiologische kwaliteitsproblemen worden zo sneller gedetecteerd en de waterkwaliteit kan gerichter worden verbeterd en kosten bespaard.

De online Biotrack-sensor van het gelijknamige bedrijf Biotrack kan het totale aantal bacteriën in water bepalen, maar kan ook verschillende, specifieke, bacteriën detecteren. Deze methode is gebaseerd op kleuring van het DNA met een fluorescente marker (Fluorescentie In Situ Hybridisatie). Door vervolgens de fluorescente bacteriën in 3D te analyseren kan het aantal bacteriën worden bepaald. Door de Biotrack en de achterliggende software verder te ontwikkelen zou in principe ook informatie kunnen worden verkregen over hoe deze bacteriën in het watermonster voorkomen (b.v. enkele cellen, gehecht aan deeltjes, vitaliteit van de bacteriën).

Biotrack heeft ook al een analyse beschikbaar waarbij met behulp van de Biotrack *Aeromonas* bacteriën worden gedetecteerd, maar deze wordt nu nog niet online ingezet door de drinkwaterbedrijven. Voordat de sensor in het distributienet gebruikt kan worden, moet de methode eerst onderzocht en mogelijk geoptimaliseerd worden. Daarom is een validatiestudie opgezet om te achterhalen hoe de *Aeromonas*-aantallen met de Biotrack sensor zich verhouden tot de aantallen die worden verkregen met conventionele kweek of de qPCR (een

moleculairbiologische techniek). Na dit onderzoek kan de bruikbaarheid van de sensor onderzocht worden in verschillende praktijksituaties om de toepassing op drinkwater te onderzoeken. Onderdeel hiervan is in kaart brengen welke resultaten met de Biotrack behaald kunnen worden, of en hoe dit uitgebreid en verbeterd kan worden en welke inzichten dit oplevert. In deze laatste stap kan worden achterhaald in hoeverre de sensor geschikt is om de dynamiek van specifieke bacteriesoorten in drinkwaterleidingen te monitoren gedurende 24-uur (dag-nacht ritme waterverbruik), of de bacteriën aanwezig zijn als losse cellen of gehecht zijn aan deeltjes en wat de verhouding is tussen het aantal levende en dode bacteriën dat in het water voorkomt. Deze onderzoekstools leveren veel inzichten op voor de drinkwaterbedrijven in het vóórkomen van *Aeromonas* waardoor de dynamiek in het distributienet beter wordt begrepen. Door deze mogelijkheden te onderzoeken en hier ervaring mee op te doen, wordt meer inzicht verkregen in hoe de sensor het beste gebruikt kan worden door potentiële klanten en ook in de markt gezet kan worden in Nederland en daarbuiten.

1.2 Doel

Doorontwikkelen, testen en onderzoek doen naar de praktische toepasbaarheid van de Biotrack methode voor een snelle, kwantitatieve, semi-continue online meetmethode van *Aeromonas* in drinkwater tijdens distributie.

1.3 Opzet rapport

De voorbereidingen en opzet van de activiteiten, ondanks dat slechts een klein deel is uitgevoerd, worden in dit rapport beschreven.

In hoofdstuk 2 wordt de opzet van het validatieonderzoek van de Biotrack beschreven. In het validatieonderzoek worden de prestatiekenmerken van de *Aeromonas*-analyse op de Biotrack conform NEN-EN-ISO 16140:2 (1) onderzocht. De Biotrack wordt vergeleken met de conventionele kweekmethode (NEN 6263, (2)) en qPCR-methode.

In hoofdstuk 3 worden mogelijke locaties van Evides besproken waar de Biotrack neergezet kan worden. Hiermee wordt ervaring opgedaan met het gebruik van de Biotrack in de praktijk en wordt ook duidelijk welke van de onderstaande onderzoeksvragen wel en niet beantwoord kunnen worden:

- Hoe komt *Aeromonas* in het drinkwaterdistributienet voor? Is *Aeromonas* in het drinkwaternet b.v. gehecht aan deeltjes, zijn het enkele, losse cellen of komt *Aeromonas* in een andere vorm voor?
- Is er sprake van een dag-nachtritme in *Aeromonas*-aantallen in het distributienet gedurende 24 uur? Treedt er bijvoorbeeld variatie in de *Aeromonas*-aantallen op door verschillende stroomsnelheden in het distributienet gedurende de dag/nacht?
- Wat is de dynamiek van de *Aeromonas*-aantallen in het drinkwater in de periode na een spuiactie of andere maatregelen in het leidingnet die uitgevoerd worden om de nagroeicondities te verbeteren?

Om deze onderzoeksvragen te beantwoorden is verdere ontwikkeling van de achterliggende software nodig.

In hoofdstuk 4 worden de resultaten die in het project zijn behaald beschreven. Omdat er weinig testen zijn uitgevoerd, worden de resultaten niet bediscussieerd en worden er ook geen conclusies aan verbonden.

2 Opzet validatie *Aeromonas*-analyse op de Biotrack sensor

Bij de start van het project is de validatie van de Biotrack geheel uitgeschreven en zijn de hieronder genoemde *Aeromonas*-stammen besteld. Door het vroegtijdig stoppen van het project is de validatie echter niet uitgevoerd. De opzet wordt wel hieronder beschreven.

2.1 Validatie *Aeromonas*-analyse op de Biotrack vergeleken met de kweekmethode en qPCR-analyse

De Biotrack wordt kwantitatief gevalideerd volgens hoofdstuk 6 van NEN ISO 16140-2: 2016 (1).

De Biotrack wordt hierin vergeleken met de kweekbepaling (conform NEN 6263) (3) en vergeleken met de *Aeromonas*-specifieke qPCR (2). De interlaboratorium studie (ringonderzoek) wordt niet uitgevoerd.

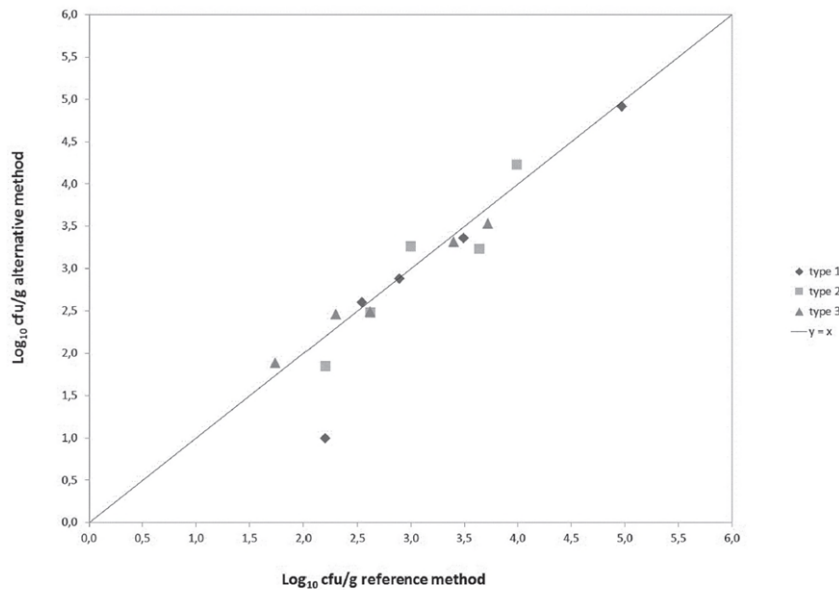
De validatiestudie bestaat uit vijf onderdelen (gegeven is het corresponderende hoofdstuk in de NEN ISO 16140-2: 2016, (1)):

- Relative trueness study (hoofdstuk 6.1.2)
- Accuracy Profile (AP)-study (hoofdstuk 6.1.3)
- LoQ-study (hoofdstuk 6.1.4)
- Inclusivity (hoofdstuk 6.1.5)
- Exclusivity (hoofdstuk 6.1.5)

De *Aeromonas*-analyse van de Biotrack wordt alleen gebruikt op drinkwater. Voor de validatiestudie is drinkwater daarom de enige categorie en in principe ook het enige type water binnen deze categorie. Wel wordt drinkwater van verschillende locaties en distributiegebieden gebruikt omdat deze mogelijk de analyse kunnen beïnvloeden.

2.1.1 Relative trueness study

In een 'relative trueness study' worden watermonsters met verschillende hoeveelheden van nature aanwezige *Aeromonas*-bacteriën gemeten met de nieuwe methode (Biotrack) en vergeleken met de referentiemethode (kweek conform NEN 6263 (3)). Hiervoor kunnen verschillende typen watermonsters gebruikt worden, b.v. spuiwater en drinkwater. Maar daarnaast kan ook gekozen worden voor drinkwater uit verschillende distributiegebieden. Hierin moet gekozen worden voor watertypen waarop de Biotrack ook daadwerkelijk gebruikt zou gaan worden. Met de resultaten wordt vervolgens een grafiek zoals in Figuur 1 opgesteld.



Figuur 1. Voorbeeldgrafiek van de resultaten van een 'relative trueness study'. Figuur is afkomstig uit NEN ISO 16140-2: 2016. (1)

Natuurlijk besmette drinkwatermonsters hebben de voorkeur voor de 'relative trueness study'. Aangezien drinkwater in de periode mei-oktober *Aeromonas* bacteriën in verschillende aantallen bevat, zal de 'relative trueness study' in deze periode worden uitgevoerd met drinkwater uit het distributiesysteem.

Voor elke categorie (drinkwater) moeten minimaal 15 monsters getest worden, verdeeld over minimaal drie types (drinkwater van drie distributiegebieden). De *Aeromonas*-aantallen moeten daarbij representatief zijn voor de natuurlijke variatie in drinkwater waarbij de hele range (laag-midden-hoog) wordt getest. Om deze reden moeten drinkwatermonsters uit drie distributiegebieden worden gebruikt waarvan bekend is dat in de warme periode hoge aantallen *Aeromonas* aanwezig zijn. Om de spreiding tussen lage, gemiddelde en hoge aantallen *Aeromonas* te verkrijgen worden de drie gebieden bemonsterd in mei (laag), augustus en oktober (midden/hoog, Tabel 1). Alle watermonsters worden met de Biotrack, kweek en qPCR geanalyseerd

Tabel 1. Aantal drinkwatermonsters dat per keer per distributiegebied worden bemonsterd en geanalyseerd.

Distributiegebied	Aantal monsters		
	Mei	Augustus	Oktober
A	2	2	2
B	2	2	2
C	2	2	2

2.1.2 Accuracy Profily study

Met de 'accuracy profile study' worden artificeel besmette watermonsters gebruikt om de methoden met elkaar te vergelijken. Hiervoor worden verschillende, realistische, bacterieaantallen gebruikt die de hele range overspannen van wat normaal gesproken in het distributienet aan *Aeromonas*-aantallen wordt gemeten. Daarnaast wordt elk watermonster meerdere keren met dezelfde methode gemeten. Hiermee wordt bepaald hoe constant en reproduceerbaar de methode is.

Per categorie (drinkwater) wordt één type water getest (drinkwater uit één distributiegebied) met minimaal zes watermonsters per distributiegebied. Het gaat om artificeel besmette watermonsters. Hiervan moeten er twee een laag aantal *Aeromonas* hebben, twee een gemiddeld en twee een hoog aantal. Deze range moet

overeenkomen met de natuurlijke variatie die in het distributienet wordt aangetroffen. De laagste concentratie (30 kve/100 ml) is zo gekozen dat deze net boven de detectiegrens van de Biotrack (10 kve/100 ml) ligt en overeenkomt met lage aantallen in het leidingnet (Tabel 2). Als hoogste waarde is 5000 kve/100 ml gekozen, hogere aantallen *Aeromonas* in het leidingnet komen weinig voor.

Tabel 2. Watermonsters met aantal *Aeromonas*-bacteriën die gemaakt worden en met elke methode in vijfvoud worden gemeten.

Concentratie		
	kve/100 ml	kve/ml
Laag, 1	30	0,3
Laag, 2	60	0,6
Midden, 1	200	2
Midden, 2	600	6
Hoog, 1	1000	10
Hoog, 2	5000	50

Deze zes drinkwatermonsters worden vijf keer met elke methode gemeten. Hiervoor worden tien *Aeromonas*-stammen (referentiestammen, geen drinkwaterisolaten) individueel opgekweekt op niet-selectief medium gedurende minimaal 24 uur. Een verse kolonie wordt geresuspendeerd in steriel PBS en de concentratie van de oplossing wordt bepaald met flowcytometrie. Vanuit deze oplossing wordt in (niet-steriel) drinkwater onderstaande oplossingen gemaakt. Hiervoor kan in de winter het drinkwater van KWR (afkomstig van productielocatie Tull en 't Waal) gebruikt worden, aangezien hierin in de winter in principe geen *Aeromonas*-bacteriën aanwezig zijn.

Daarnaast wordt van het drinkwater, zonder *Aeromonas*-dosering, de *Aeromonas*-aantallen op kweek bepaald om de *Aeromonas*-aantallen bij de start te bepalen.

2.1.3 Limit of Quantification study

Met de 'Limit of Quantification (LoQ) studie' wordt bepaald wat de onderste detectiegrens is van de methode. Deze studie hoeft niet gedaan te worden voor methoden die gebaseerd zijn op het tellen van zichtbare kolonies, maar wel voor alternatieve methoden, bijvoorbeeld fluorescentiemethoden waarbij het achtergrondsignaal moet worden bepaald. Omdat de Biotrack het aantal cellen telt op basis van FISH moet officieel de LoQ wel bepaald worden, al is de verwachting dat er geen achtergrondsignaal (of ruis) aanwezig is. Waarschijnlijk is deze studie daarom niet heel relevant voor de Biotrack, desondanks wordt de studie voor de zekerheid wel uitgevoerd.

Minimaal tien blanco's moeten getest worden per categorie en drinkwater uit één distributiegebied moet worden getest. Dit is (niet-steriel) drinkwater zonder dosering van gekweekte *Aeromonas* of *Aeromonas*-bacteriën die mogelijk van nature aanwezig zijn, b.v. drinkwater van KWR of van Evides/PWN/Oasen bemonsterd in de winter als de kans groot is dat er geen *Aeromonas* bacteriën aanwezig zijn. Op basis van deze resultaten wordt dan het gemiddelde achtergrondsignaal, met standaard deviatie, berekend.

In principe hoeft deze test alleen uitgevoerd te worden met de Biotrack, maar om zeker te zijn dat er geen (kweekbare) *Aeromonas*-bacteriën aanwezig zijn, worden ook de andere analyses ingezet.

2.1.4 Inclusivity study en exclusivity study

Met de 'inclusivity study' wordt getest of de Biotrack een groot aantal verschillende *Aeromonas*-stammen kan detecteren. Met de 'exclusivity study' wordt juist getest of de Biotrack niet-*Aeromonas*-stammen ook als niet-*Aeromonas*-bacterie determineert.

De te gebruiken bacteriesoorten en –stammen zijn bij voorkeur afkomstig uit drinkwater. Echter, volgens de norm moeten de te gebruiken stammen afkomstig zijn uit internationale stammenbanken, wat het gebruik van drinkwaterisolaten lastig maakt, omdat deze niet of nauwelijks voorkomen in stammenbanken. De projectgroep acht het van groot belang om met name drinkwaterisolaten te testen. Daarom is voor de 'inclusivity study' gekozen voor *Aeromonas*-soorten die afkomstig zijn uit stammenbanken (36x) en voor drinkwaterisolaten (14x) (Tabel 3).

Tabel 3. *Aeromonas*-stammen voor de 'inclusivity study'. Aangegeven is uit welke studie het drinkwaterisolaat afkomstig is: (4) en (2)

Genus	Species	Monstercodenummer KWR/DSMZ/ATCC
Drinkwaterisolaten		
DSMZ	DSMZ	DSMZ
DSMZ	DSMZ	DSMZ
DSMZ	DSMZ	DSMZ
DSMZ	DSMZ	DSMZ
DSMZ	DSMZ	DSMZ
DSMZ	DSMZ	DSMZ
<i>Aeromonas</i>	<i>rivuli</i>	Berenplaat (4)
<i>Aeromonas</i>	<i>veronii</i>	Berenplaat (4)
<i>Aeromonas</i>	<i>veronii</i>	Andijk (4)
<i>Aeromonas</i>	<i>bestiarum</i>	Braakman (4)
<i>Aeromonas</i>	<i>bestiarum</i>	Andijk (2)
<i>Aeromonas</i>	<i>media</i>	Andijk (4)
Referentiestammen		
<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila-M800</i>	Positieve controle KWR
<i>Aeromonas</i>	<i>media</i>	Berenplaat (2)
<i>Aeromonas</i>	<i>aquariorum</i>	DSM 18362 (CECT 7289)
<i>Aeromonas</i>	<i>aquatica</i>	DSM 110827 (CECT 8025)
<i>Aeromonas</i>	<i>bestiarum</i>	DSM 13956 (ATCC 51108)
<i>Aeromonas</i>	<i>bestiarum</i>	DSM 30019
<i>Aeromonas</i>	<i>caviae</i>	DSM 7323 (ATCC 15468)
<i>Aeromonas</i>	<i>caviae</i>	DSM 30025
<i>Aeromonas</i>	<i>caviae</i>	DSM 29415
<i>Aeromonas</i>	<i>dhakensis</i>	DSM 17689
<i>Aeromonas</i>	<i>enteropelogenes</i>	DSM 7312 (ATCC 49657)
<i>Aeromonas</i>	<i>enteropelogenes</i>	DSM 9381
<i>Aeromonas</i>	<i>enteropelogenes</i>	DSM 9383
<i>Aeromonas</i>	<i>enteropelogenes</i>	DSM 9384

<i>Aeromonas</i>	<i>eucrenophila</i>	DSM 17534 (ATCC 23309)
<i>Aeromonas</i>	<i>finlandensis</i>	DSM 100828
<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	DSM 6173 (ATCC 35654)
<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	DSM (HWL)
<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i> spp. <i>anaerogenes</i>	DSM 30188 (ATCC 15467)
<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i> ssp. <i>hydrophila</i>	DSM 30187 (ATCC 7966)
<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i> ssp. <i>ranae</i>	DSM 17695 (CCM 7147)
<i>Aeromonas</i>	<i>jandaei</i>	DSM 7311 (ATCC 49568)
<i>Aeromonas</i>	<i>media</i>	DSM 30020
<i>Aeromonas</i>	<i>media</i>	DSM 30021
<i>Aeromonas</i>	<i>media</i>	DSM 30022
<i>Aeromonas</i>	<i>rivuli</i>	DSM 22538
<i>Aeromonas</i>	<i>rivuli</i>	DSM 22539
<i>Aeromonas</i>	<i>salmonicida</i>	DSM 46293 (CCM 1318)
<i>Aeromonas</i>	<i>salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i>	DSM 19634 (ATCC 33658)
<i>Aeromonas</i>	<i>sobria</i>	DSM 19176 (ATCC 43979)
<i>Aeromonas</i>	<i>veronii</i>	DSM 7386 (ATCC 35624)
<i>Aeromonas</i>	<i>veronii</i>	DSM 17676 (MTCC 3249)
<i>Aeromonas</i>	<i>allosaccharophila</i>	DSM 11576 (ATCC 51208)
<i>Aeromonas</i>	<i>bivalvium</i>	DSM 19111 (CECT 7113)
<i>Aeromonas</i>	<i>encheleia</i>	DSM 11577 (CECT 4342)
<i>Aeromonas</i>	<i>ichthiosmia</i>	DSM 6393 (ATCC 49904)
<i>Aeromonas</i>	<i>lacus</i>	DSM 100829 (CECT 8024)
<i>Aeromonas</i>	<i>piscicola</i>	DSM 23451 (CECT 7443)

Voor de 'exclusivity study' zijn bacteriënsoorten en/of -stammen gekozen die biochemisch en/of genetisch aan *Aeromonas* verwant zijn en gerelateerd zijn aan drinkwater. *Aeromonas* bacteriën behoren tot het genus *Aeromonas*, de familie *Aeromonadaceae* van de order *Aeromonadales* en behorend tot de klasse van gammaproteobacteriën. De families die het dichtst bij de *Aeromonadaceae* liggen en ook gerelateerd zijn aan drinkwater zijn de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* en *Legionellaceae*. Uit deze families worden daarom de bacteriestammen gekozen voor de 'exclusivity study'. Dit zijn nagenoeg allemaal referentiestammen die afkomstig zijn uit internationale stammenbanken (32x, b.v. *Aquaspirillum* en *Flavobacterium*) en een aantal drinkwaterisolaten ('positieve controle KWR' in Tabel 4).

Tabel 4. Bacteriestammen voor de 'exclusivity study'. Aangegeven is waar de bacteriestam vandaan komt.

	Genus	Species	Stam	Familie	Monstercodenummer KWR/DSM/ATCC
1	<i>Aquaspirillum</i>	<i>spp.</i>	NOX	<i>Neisseriaceae</i>	ATCC 49643
2	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	DSM 30039
3	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	n.n.b.
4	<i>Cronobacter</i>	<i>sakazakii</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	DSM 4485
5	<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	EPA 202 (ATCC 49701)
6	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	WR3 (NCTC 13168)

7	<i>Escherichia</i>	<i>fergusonii</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	DSM 13698
8	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	WR1	<i>Enterobacteriaceae</i>	Positieve controle KWR
9	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	O157	<i>Enterobacteriaceae</i>	ATCC 11775
10	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	O157	<i>Enterobacteriaceae</i>	ATCC 700378
11	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	O157	<i>Enterobacteriaceae</i>	ATCC 700376
12	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	n.n.b.
13	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	n.n.b.
14	<i>Flavobacterium</i>	<i>johnsoniae</i>	A3	<i>Flavobacteriaceae</i>	Positieve controle KWR
15	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	DSM 5175
16	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	DSM 30104
17	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	n.n.b.
18	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	n.n.b.
19	<i>Kluyvera</i>	<i>ascorbata</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	DSM 4611
20	<i>Legionella</i>	<i>anisa</i>		<i>Legionellaceae</i>	ATCC 35292
21	<i>Legionella</i>	<i>pneumophila</i>		<i>Legionellaceae</i>	ATCC 33152
22	<i>Legionella</i>	<i>pneumophila</i>		<i>Legionellaceae</i>	ATCC 22284
23	<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	DSM 3493
24	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	WP1	<i>Pseudomonadaceae</i>	Positieve controle KWR
25	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	P17	<i>Pseudomonadaceae</i>	ATCC 49642
26	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	BR12	<i>Pseudomonadaceae</i>	Positieve controle KWR
27	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>		<i>Pseudomonadaceae</i>	n.n.b.
28	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>		<i>Pseudomonadaceae</i>	n.n.b.
29	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>		<i>Pseudomonadaceae</i>	n.n.b.
30	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>		<i>Pseudomonadaceae</i>	n.n.b.
31	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>		<i>Pseudomonadaceae</i>	n.n.b.
32	<i>Pseudomonas</i>	<i>chlororaphilus</i>		<i>Pseudomonadaceae</i>	n.n.b.
33	<i>Raoultella</i>	<i>terrigena</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	n.n.b.
34	<i>Salmonella</i>	<i>senftenberg</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	ATCC 43845
35	<i>Salmonella</i>	<i>typhimurium</i>	WG49	<i>Enterobacteriaceae</i>	Positieve controle KWR
36	<i>Salmonella</i>	<i>panama</i>	SP5	<i>Enterobacteriaceae</i>	Positieve controle KWR
37	<i>Salmonella</i>	<i>arizonae</i>	SALA	<i>Enterobacteriaceae</i>	Positieve controle KWR
38	<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	DSM 30121
39	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	WR10	<i>Staphylococcaceae</i>	Positieve controle KWR
40	<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	n.n.b.

In zowel de 'inclusivity study' als 'exclusivity study' wordt elke bacteriestam éénmalig getest met de Biotrack, kweek op selectief medium (NEN 6263), qPCR en kweek op niet-selectief medium (Tabel 5).

Voor de 'inclusivity study' moet de concentratie minimaal 100x hoger zijn dan de LoQ, zoals bepaald in hoofdstuk 2.1.3. Volgens de technische informatie van Biotrack ligt deze op 1 *Aeromonas*/10 ml. Uitgaande van deze waarde moet de doseerconcentratie daarom minimaal 1000 *Aeromonas*/10 ml zijn, gelijk aan 100 *Aeromonas*/ml (Tabel 5).

Voor de 'exclusivity study' moet de concentratie gelijk zijn aan de hoogste concentratie verontreiniging van één bacteriesoort die in drinkwater voor kan komen. Dit is echter lastig vast te stellen. Gemiddeld zitten er 10^5 cellen/ml in drinkwater. Voor deze studie is aangenomen dat 10^3 cellen/ml (1% van totaal) de maximale verontreiniging van één soort kan zijn. Dit aantal moet aanwezig zijn in het testvolume van de Biotrack (Tabel 5).

Elke stam wordt opgekweekt op niet-selectief medium gedurende minimaal 24 uur. Een verse kolonie wordt geresuspendeerd in steriel PBS en de concentratie van de oplossing wordt bepaald met flowcytometrie. Vanuit deze oplossing wordt in steriel PBS de te testen oplossing met de juiste concentratie gemaakt.

Tabel 5. Analyses van de stammen die met de 'inclusivity' en 'exclusivity' studie worden uitgevoerd. Gegeven is ook het testvolume en het aantal *Aeromonas*- of niet-*Aeromonas*-bacteriën dat in het testvolume en dus de analyse aanwezig is.

Methode	Testvolume	Aantal bacteriën in testvolume	
		Inclusivity study	Exclusivity study
Biotrack	10 ml	>1000	>1000
Kweek Selectief medium	1 ml	>100	>100
qPCR	100 ml filtreren, omgerekend 10 ml in qPCR analyseren	>1000	>1000
Kweek Niet-selectief medium	1 ml	>100	Niet van toepassing

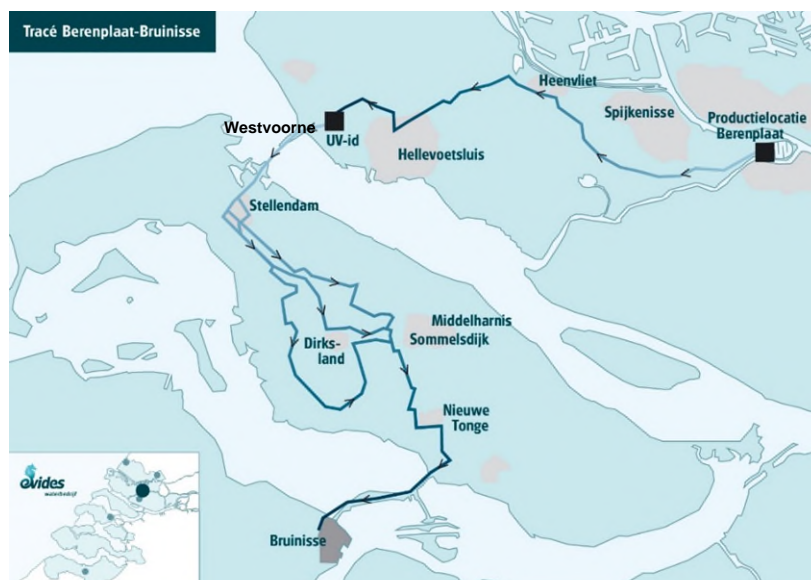
3 Mogelijke testlocaties Evides

Vanuit Evides zijn een aantal onderzoeksvragen opgesteld om de Biotrack mee te testen:

1. Wat is de dynamiek van de snelle *Aeromonas*-toename in het leidingnet in ruimte (afstand/verblijftijd) en tijd (b.v. dag-nacht ritme, ochtendpiek).
2. Wat is het effect van ingrepen in het leidingnet (o.a. spuien, UV-desinfectie, distributie van drinkwater van een andere productielocatie) op de *Aeromonas*-aantallen;
3. Hoe is *Aeromonas* in het drinkwater aanwezig en is het geassocieerd aan deeltjes;
4. Wat is de verhouding tussen levende en dode *Aeromonas*-aantallen.

Om deze onderzoeksvragen te testen, zijn een aantal locaties geselecteerd (Figuur 2):

- Westvoorne: vóór de lokale UV-desinfectie
- Westvoorne: na de lokale UV-desinfectie
- Sommelsdijk in tracé: ca. 26 uur na Westvoorne



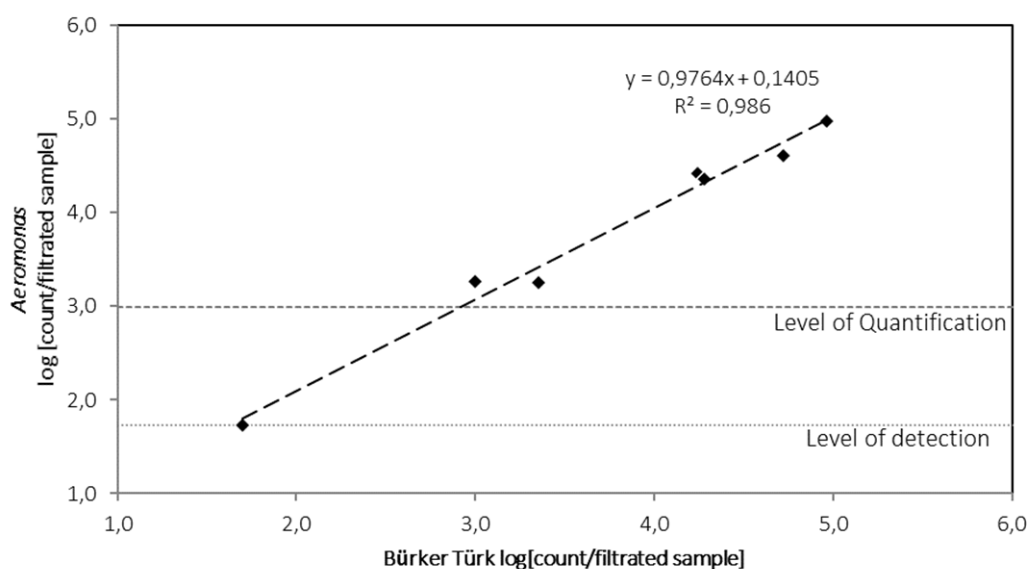
Figuur 2. Overzichtskaart van het tracé Berenplaat – Bruinisse van Evides. Voorstel was om één Biotrack vóór en één na de UV-desinfectie op Westvoorne te plaatsen, en één systeem in Sommelsdijk.

Door voor de UV te meten kan de *Aeromonas*-dynamiek in de transportleiding vanaf Berenplaat worden bepaald. Door gedurende korte tijd vaak te meten, bijvoorbeeld elke 2 uur een meting, kan bepaald worden of en hoe de *Aeromonas*-aantallen variëren gedurende de dag en of er sprake is van een dag-nachtritme. Door ook na de UV te meten kan worden bepaald of het effect van UV-desinfectie gedetecteerd kan worden met de Biotrack. Het dag-nachtritme in een transportleiding wordt ook in kaart gebracht door de Biotrack op Sommelsdijk. Met dit systeem kan tevens gemeten worden of en hoe sterk *Aeromonas* toeneemt tussen de UV-desinfectie in Westvoorne en Sommelsdijk op 26 uur verblijftijd.

4 Analyse drinkwater en spuimonsters met Biotrack

Hieronder is kort beschreven welke testen zijn uitgevoerd met de Biotrack-sensor en wat de resultaten waren.

Een verdunningsreeks van *Aeromonas hydrophila* bacteriën in een PBS-buffer is getest met de Biotrack-sensor en de resultaten laten een goede kalibratiecurve zien (Figuur 3). De celtellingen zijn nagenoeg gelijk met de Biotrack, al gaat het om een beperkt aantal punten en een grote concentratierange (1,7 log₁₀ tot 5,0 log₁₀ cellen).



Figuur 3. Calibratiecurve van *Aeromonas* bacteriën op de Biotrack

In een voorstudie zijn 53 bacteriesoorten en –stammen met handmatige FISH-experimenten getest waarvoor de probes zijn gebruikt die op de Biotrack voor de *Aeromonas*-analyse (AER06 in) en het totaal aantal cellen (Eub in) worden gebruikt. Geen van de niet-*Aeromonas*-bacteriën wordt gedetecteerd, terwijl alle geteste *Aeromonas hydrophila*-stammen wel worden gedetecteerd met de *Aeromonas spp.* probe.

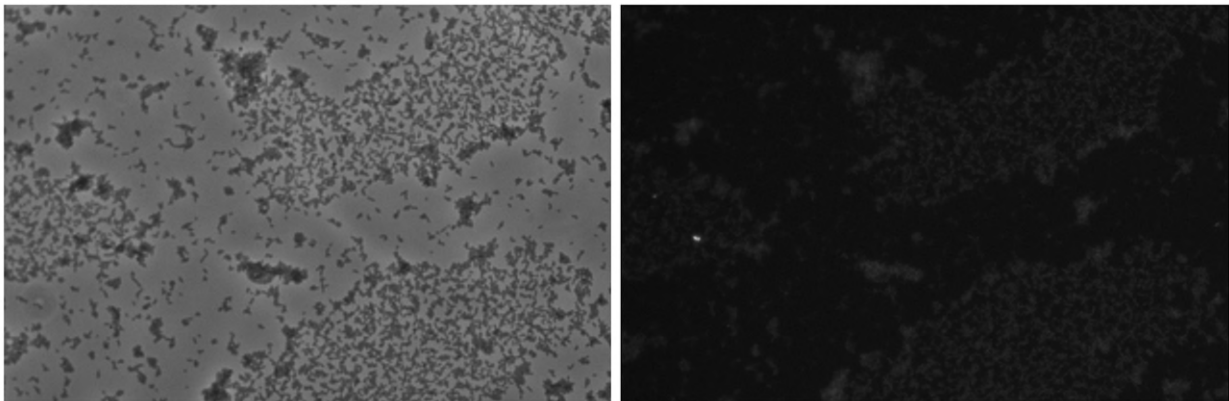
Tabel 6. Specificiteit van *Aeromonas* (AER06) en het totaal aantal cellen (Eub) probe. De testen zijn uitgevoerd met handmatige FISH-experimenten. Non-Eub is de negatieve controle waarbij geen probe is gebruikt in het FISH-experiment. N: negatief resultaat, bacterie wordt niet gedetecteerd door de probe. P: positief resultaat, bacterie wordt wel gedetecteerd door de probe.

Organisme	Source	AER06	Eub	Non-Eub
<i>Aeromonas hydrophila</i>	DSMZ 30015	P	P	N
<i>Aeromonas hydrophila</i>	DSMZ 17689	P	P	N
<i>Aeromonas hydrophila</i>	DSMZ 30016	P	P	N
<i>Aeromonas hydrophila</i>	DSMZ 30014	P	P	N
<i>Aeromonas hydrophila</i>	DSMZ 30017	P	P	N
<i>Aeromonas hydrophila</i>	DSMZ 30187	P	P	N
<i>Bacillus subtilis</i>	DSMZ 8563	N	P	N

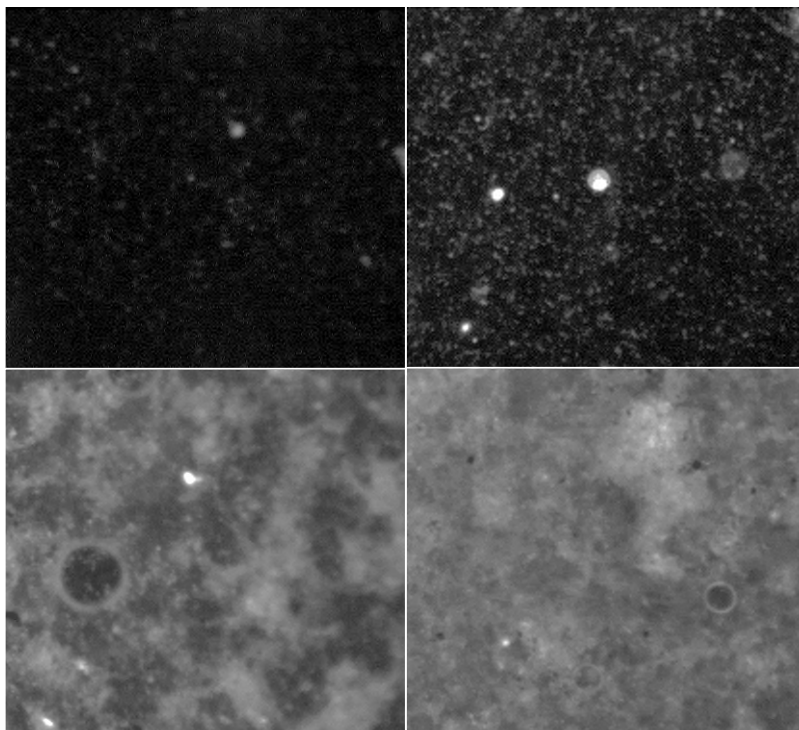
<i>Bacillus subtilis subsp. Subtilis</i>	DSMZ 10	N	P	N
<i>Bacillus subtilis subsp. Spizizenii</i>	DSMZ 347	N	P	N
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	DSMZ 4593	N	P	N
<i>Citrobacter braakii</i>	DSMZ 30040	N	P	N
<i>Citrobacter braakii</i>	DSMZ 17596	N	P	N
<i>Citrobacter freundii</i>	DSMZ 30039	N	P	N
<i>Citrobacter koseri</i>	DSMZ 5470	N	P	N
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSMZ 12058	N	P	N
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSMZ 12058	N	P	N
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSMZ 30053	N	P	N
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSMZ 6234	N	P	N
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSMZ 30060	N	P	N
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSMZ 3264	N	P	N
<i>Enterobacter cloacae</i>	Friesland Food	N	P	N
<i>Enterobacter gergoviae</i>	DSMZ 9245	N	P	N
<i>Enterococcus durans</i>	DSMZ 20633	N	P	N
<i>Enterococcus faecium</i>	DSMZ 20477	N	P	N
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSMZ 20478	N	P	N
<i>Erwinia carotovora</i>	DSMZ 30168	N	P	N
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	DSMZ 4610	N	P	N
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	DSMZ 30177	N	P	N
<i>Erw. ECC</i>	HZPC 2161	N	P	N
<i>Erw. Soort ECC</i>	HZPC 2208	N	P	N
<i>Erw. Soort ECC</i>	HZPC 2209	N	P	N
<i>Escherichia coli</i>	DSMZ 301	N	P	N
<i>Escherichia coli</i>	DSMZ 10650	N	P	N
<i>Escherichia coli</i>	DSMZ 30083	N	P	N
<i>Escherichia coli</i>	DSMZ 22664	N	P	N
<i>Escherichia coli</i>	DSMZ 10737	N	P	N
<i>Escherichia coli</i>	DSMZ 10781	N	P	N
<i>Escherichia coli</i>	DSMZ 10792	N	P	N
<i>Escherichia coli</i>	DSMZ 10762	N	P	N
<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSMZ 4798	N	P	N
<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSMZ 5175	N	P	N
<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSMZ 16963	N	P	N
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSMZ 1629	N	P	N
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSMZ 9376	N	P	N
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSMZ 11678	N	P	N
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSMZ 16609	N	P	N
<i>Klebsiella sp.</i>	DSMZ 7460	N	P	N

<i>Micrococcus spp.</i>	DSMZ 1057	N	P	N
<i>Proteus mirabilis</i>	DSMZ 788	N	P	N
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSMZ 1104	N	P	N
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DSMZ 3270	N	P	N
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	DSMZ 20229	N	P	N
<i>Streptococcus pyogenes</i>	DSMZ 2071	N	P	N

In Figuur 4 en Figuur 5 zijn voorbeelden gegeven van drinkwater van Evides dat met de Biotrack is geanalyseerd.



Figuur 4. Voorbeeld van een fasecontrast-belichting (links) en fluorescentie-belichting (rechts) van Evides-drinkwater (monsterpunt: QMONS203). Op de rechterfoto is één *Aeromonas*-cel te zien.

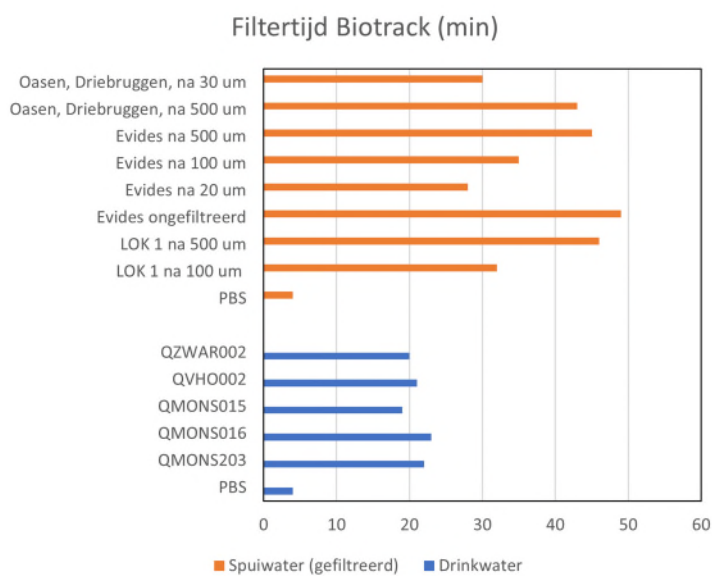


Figuur 5. Voorbeelden fluorescentiebeelden van drinkwater van Evides bemonsterd op vier verschillende locaties en gemeten met de Biotrack. Boven: locaties QHOV002 (links), QZWAR002 (rechts). Onder: locaties QMONS016 (links), QMONS015 (rechts)

De ervaringen met drinkwater en spuiwater in de Biotrack hebben laten zien dat de filters snel verstopt raken, zowel bij drink- als spuiwater. Daarnaast vallen de filters, met daarop gefiltreerde bacteriën, droog waardoor het filter niet langer bruikbaar is. Er zijn daarom verschillende hardware aanpassingen uitgevoerd door Biotrack

waarmee deze problemen zijn opgelost en zo alsnog de *Aeromonas*-metingen uitgevoerd kunnen worden. Daarnaast werd gezien dat *Aeromonas* in drinkwater of spuiwater zich anders gedraagt dan andere bacteriën in de Biotrack.

Spuiwatermonsters van 10 ml waren niet te filtreren (10 ml monsters, Figuur 6) en dus ook niet te analyseren door de Biotrack. Kleinere monstervolumes van 1 ml konden wel gefiltreerd worden, maar leverden geen analyseerbaar beeld op. De Biotrack is, zonder aanpassingen of extra voorfiltratiestappen, daarom niet geschikt om spuiwater te meten.

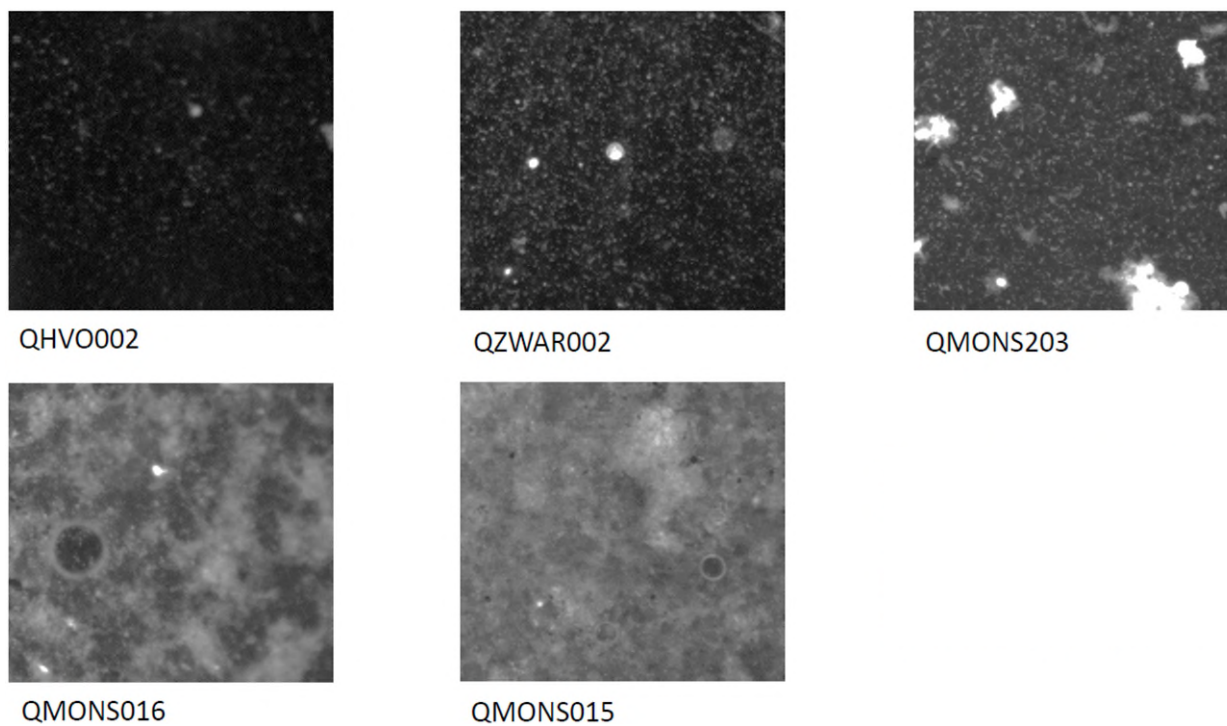


Figuur 6. Filtratietijd van drinkwater en (on)gefiltreerde spuiwatermonsters in de Biotrack. Gegeven is met welk voorfilter het spuiwater is gefiltreerd.

Aeromonas bacteriën die zijn opgekweekt in medium met weinig voedingsstoffen (entflessen) zijn met de Biotrack goed te meten. *Aeromonas* bacteriën die zijn opgekweekt in medium met veel voedingsstoffen zijn echter niet goed te detecteren. De hypothese is dat er een soort slijmlaag om de bacteriën heen zit die voorkomt dat de DNA-probe het DNA van de bacterie bereikt. Als deze gekweekte *Aeromonas*-cellen zes dagen worden bewaard (kamertemperatuur, donker) is de slijmlaag weg en de detectie beter, maar dit is niet representatief voor de realiteit. *Aeromonas*-bacteriën in het distributienet lijken het meest op de gekweekte *Aeromonas*-bacteriën uit entflessen aangezien de hoeveelheid voedingsstoffen in drinkwater erg laag is. Een validatie zou daarom uitgevoerd moeten worden met *Aeromonas*-bacteriën die in entflessen zijn opgekweekt.

Drinkwatermonsters uit het distributienet zijn goed te filtreren (10 ml monsters, Figuur 4) door de Biotrack en redelijk goed of goed te analyseren. Drinkwater bevat echter vaak aggregaten van micro-organismen die als 'blobs' te zien zijn met de fluorescentie-belichting (Figuur 5, rechtsboven). In een aggregaat zijn meerdere micro-organismen aanwezig die vaak aan deeltjes zijn gehecht, maar hoeveel *Aeromonas*-bacteriën dit zijn is onbekend en varieert per aggregaat. Een voorfiltratie met een 10 µm filter verwijdert de aggregaten, maar daarmee ook informatie over het aantal *Aeromonas*-bacteriën in het watermonster en is daardoor ongewenst.

In een test van vijf drinkwatermonsters waren drie ongefiltreerde watermonsters goed analyseerbaar (bovenste rij in Figuur 7). Deze waren bemonsterd aan een luchtkraan of in een monsterkast. De andere twee watermonsters zijn aan een hydrant bemonsterd en lijken daardoor meer op spuiwater omdat ze meer deeltjes bevatten. De aanwezigheid van deeltjes geeft dus problemen met de analyse in de Biotrack.



Figuur 7. Fluorescentiebeelden van drinkwatermonsters. De bovenste rij is goed analyseerbaar, de onderste rij redelijk tot slecht.

Hiermee zijn alle metingen beschreven die met de Biotrack zijn uitgevoerd tijdens de opstartfase van het project, voordat het project voortijdig is beëindigd. Mocht in de toekomst toch aanvullende metingen met de Biotrack worden uitgevoerd op *Aeromonas* in drinkwater, dan kunnen deze resultaten als startpunt dienen voor verder onderzoek.

5 Referenties

1. NEN-EN-ISO. 2016. Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden - Deel 2: Protocol voor de validatie van alternatieve (eigendomsrechtelijke) methoden tegen een referentiemethode.
2. van der Wielen FWM, Wullings B. 2013. Moleculaire methoden voor kwantificatie en identificatie van *Aeromonas* in drinkwater. KWR, BTO 2013.228(s). Nieuwegein.
3. NEN-ISO. 2009. Water - Detection and enumeration of *Aeromonas*, vol NEN 6263:2009.
4. van Bel N, Wullings BA, Hijnen WAM. 2016. Isolatie en identificatie van *Aeromonas* stammen uit vijf DPWE voorzieningsgebieden en hun groeikarakteristieken. KWR, KWR 2016.073. Nieuwegein.