



Bedrijfstakonderzoek
BTO 2023.016 | December 2023

**Het isoleren van
bacteriofagen uit
afvalwater met
Legionella en
Campylobacter als
gastheer.**

Rapport

Het isoleren van bacteriofagen uit afvalwater met *Legionella* en *Campylobacter* als gastheer.

BTO 2023.016 | December 2023

Dit onderzoek is onderdeel van het collectieve Bedrijfstakonderzoek van KWR, de waterbedrijven en Vewin.

Opdrachtnummer

402045/230

Projectmanager

Jolijn van Engelenburg

Opdrachtgever

BTO - Verkennend onderzoek

Auteur

Paul W.J.J. van der Wielen

Kwaliteitsborgers

Frank Oosterholt en Gertjan Medema

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Keywords

Bacteriofagen, *Legionella pneumophila*, *Campylobacter*, faagtherapie, afvalwater

Jaar van publicatie
2023

Meer informatie

Dr. Paul W.J.J. van der Wielen

T +31 (0) 30 60 69 642

E paul.van.der.wielen@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 2023 ©

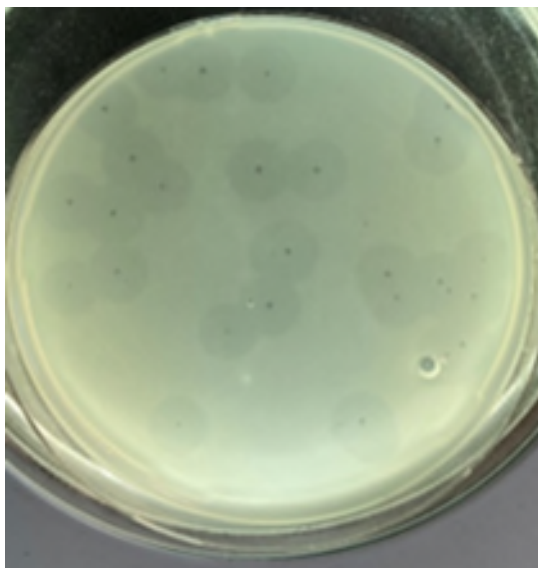
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen,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

Managementsamenvatting

Met bestaand protocol nog geen bacteriofagen die *Legionella pneumophila* of *Campylobacter* infecteren uit afvalwater geïsoleerd

Auteur Paul W.J.J. van der Wielen.

Er bestaat steeds meer interesse in de toepassing van faagtherapie om ongewenst bacteriën te bestrijden in mens en milieu. Daarbij worden bacteriofagen ingezet, virussen die (specifieke) bacteriën infecteren. Faagtherapie kan ook helpen om ongewenste ziekteverwekkers zoals *Legionella pneumophila* of *Campylobacter* in afvalwater te bestrijden. Hiervoor is het onder andere nodig om reïncultures van deze specifieke bacteriofagen te verkrijgen. In het Verkennend Onderzoek is daarom gepoogd uit afvalwater bacteriofagen rein te kweken die *L. pneumophila* (legionellafagen) of *Campylobacter* (*Campylobacter*-fagen) infecteren. Protocollen die door andere onderzoekers zijn gebruikt om legionellafagen en *Campylobacter*-fagen uit het milieu te isoleren, zijn toegepast op monsters uit verschillende rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's). Het is met deze protocollen niet gelukt om legionellafagen en *Campylobacter*-fagen te isoleren, maar wel zijn bacteriofagen geïsoleerd uit het influent van verschillende RWZI's die *Shigella flexneri* of *Escherichia fergusonii* infecteren. Deze twee bacteriën zijn ziekteverwekkend, maar waarvan de prevalentie in Nederland relatief laag of onbekend is.



Op een agarplaat zijn *S. flexneri*-bacteriën gekweekt, die de plaat vertroebelen. Waar de bacteriofagen *S. flexneri* hebben geïnfecteerd zijn heldere zones ontstaan doordat de bacteriofagen de bacteriën hebben afgedood.

Belang: betere manieren vinden om ziekteverwekkende bacteriën uit afvalwater te bestrijden

Afvalwater bevat ziekteverwekkende micro-organismen die afkomstig kunnen zijn uit fecaliën van mens en dier (zoals *Campylobacter*) of die gaan

groeien onder voor hen gunstige condities in sommige processen (zoals *Legionella pneumophila*). Bestrijding van deze ziekteverwekkers in afvalwater is ingewikkeld omdat veel beheersmaatregelen niet alleen de ziekteverwekkers afdoden, maar ook de

micro-organismen die in biologische processen het afvalwater zuiveren. Mogelijk kunnen bacteriofagen helpen bij de bestrijding van ongewenste micro-organismen, omdat die in staat zijn om specifieke (ziekteverwekkende) organismen te doden. Daarvoor zijn reïnculturen van dergelijke bacteriofagen nodig. Daarom is gepoogd uit afvalwater bacteriofagen rein te kweken die *L. pneumophila* of *Campylobacter* infecteren.

Aanpak: legionella- en *Campylobacter*-fagen opkweken uit afvalwater

Protocolen die door andere onderzoekers zijn gebruikt om legionellafagen en *Campylobacter*-fagen uit het milieu te isoleren, zijn toegepast op monsters uit verschillende rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's). Bij twee RWZI's met een historie van groei van *L. pneumophila* in de warme deelstroom is afvalwater uit die stroom gebruikt om *L. pneumophila* en legionellafagen op te kweken. Daarnaast is influent van zes verschillende RWZI's gebruikt om *Campylobacter* en *Campylobacter*-fagen op te kweken. Om de fagen te isoleren, zijn de afvalwatermonsters zo behandeld dat een bacteriofaagsuspensie zonder micro-organismen werd verkregen. Deze bacteriofaagsuspensie is toegevoegd aan reïnculturen van *L. pneumophila* en vermoedelijke *Campylobacter*-stammen op agarplaten. Wanneer legionella- of *Campylobacter*-fagen aanwezig zijn in de bacteriofaagsuspensie, ontstaan heldere zones waar de bacteriofagen de bacteriën hebben gedood (zie figuur).

Resultaten: geen legionellafagen en *Campylobacter*-fagen geïsoleerd

Met het toegepaste protocol is het niet gelukt om bacteriofagen te isoleren die *L. pneumophila* infecteren. Dit is in lijn met eerdere studies van andere onderzoekers, die ook niet in staat waren om legionellafagen te isoleren. Bacteriofagen zijn wel geïsoleerd uit de verschillende RWZI's met de vermoedelijke *Campylobacter*-stammen die ook uit de RWZI's zijn geïsoleerd op een agarmedium dat specifiek voor *Campylobacter* zou zijn. Verdere karakterisering van deze vermoedelijke *Campylobacter*-stammen liet echter zien dat het geen *Campylobacter*-soorten waren, maar *Escherichia fergusonii*, *Escherichia coli*, en *Shigella flexneri*. De fagen die uit het influent van de RWZI's

zijn geïsoleerd, bleken uiteindelijk fagen te zijn die *E. fergusonii* of *S. flexneri* infecteren. *S. flexneri* is een ziekteverwekker die regelmatig diarree veroorzaakt in Nederland en die wordt verspreid via mens, voedsel en water. *E. fergusonii* is een ziekteverwekker voor mens en dier waarvan de prevalentie in Nederland onbekend is.

Toepassing: identiteit bacteriën bevestigen, kandidaten voor faagtherapie inventariseren

Met het protocol voor isolatie van *Campylobacter*-fagen is het gelukt om bacteriofagen te isoleren die *S. flexneri* of *E. fergusonii* infecteren. Het is daarom raadzaam om in eventueel vervolgonderzoek dit protocol toe te passen om *Campylobacter*-fagen te isoleren met bevestigde *Campylobacter*-stammen als gastheer. Doordat de ziekteprevalentie door *S. flexneri* en/of *E. fergusonii* in Nederland laag is, is verder onderzoek om deze bacteriën met fagen in afvalwater te bestrijden weinig zinvol. Tot slot wordt aanbevolen om samen met de watersector na te gaan welke ongewenste bacteriesoorten met faagtherapie bestreden zouden kunnen worden en vervolgens een uitgebreide literatuurstudie uit te voeren naar bacteriofagen van deze doelsoorten en toepassing van faagtherapie om bacteriën te bestrijden.

Rapport

Dit Verkennend onderzoek is beschreven in het rapport *Het isoleren van bacteriofagen uit afvalwater met Legionella en Campylobacter als gastheer* (BTO-2023.016).

Inhoud

Rapport	2
<i>Managementsamenvatting</i>	3
Inhoud	6
1 Introductie	7
1.1 <i>Legionella pneumophila</i> in afvalwaterzuiveringen	7
1.2 Faagtherapie	7
1.3 Bacteriofagen die <i>L. pneumophila</i> infecteren	8
1.4 Fecale ziekteverwekker <i>Campylobacter</i> en <i>Campylobacter</i> -fagen in afvalwater	8
1.5 Doelstelling	8
2 Materiaal en methoden	9
2.1 Isolatie van legionellafagen	9
2.2 Isolatie van <i>Campylobacter</i> -fagen	10
3 Resultaten en discussie	12
3.1 Isolatie legionellafagen	12
3.1.1 Optimalisatie opkweken <i>L. pneumophila</i> stammen	12
3.1.2 Optimalisatie agarmedium voor detectie helder hof van legionellafagen	12
3.1.3 Eerste test isolatie legionellafagen	12
3.1.4 Tweede test isolatie legionellafagen	13
3.1.5 Testen of uitgestoken heldere zones legionellafagen zijn	13
3.2 Isolatie <i>Campylobacter</i> -fagen	14
3.2.1 Eerste test isolatie <i>Campylobacter</i> -fagen met influent RWZI Utrecht en RWZI Ede	14
3.2.2 Tweede test isolatie <i>Campylobacter</i> -fagen met influent van vier RWZI's	16
3.2.3 Karakteriseren vermoedelijke <i>Campylobacter</i> -stammen	17
3.2.4 Voorstel voor vervolgonderzoek	18
4 Conclusies en aanbevelingen	20
5 Referenties	21

1 Introductie

1.1 *Legionella pneumophila* in afvalwaterzuiveringen

In 2018 zijn in Nederland twee kleine uitbraken geweest van *Legionella pneumophila* die konden worden getraceerd naar industriële afvalwaterzuiveringsinstallaties (IWZI's) (Loenenbach *et al.*, 2018). Binnen deze afvalwaterzuiveringen werd *L. pneumophila* teruggevonden in een warm deelproces (~ 30°C) waar micro-organismen ammonium omzetten (Anammox proces). Sinds deze uitbraken heeft het RIVM een risicoclassificatie gemaakt van IWZI's en rioolwaterzuiveringsinstallatie (RWZI's), waarbij een redelijk aantal afvalwaterzuiveringen in de hoogste risicoklasse werd ingedeeld (Bartels *et al.*, 2019). Daarnaast heeft monitoring laten zien dat *L. pneumophila* ook met enige regelmaat wordt aangetroffen in de warme deelprocessen bij een aantal van deze afvalwaterzuiveringen (pers comm Imke Leenen, STOWA; Kevin Kanters, Hydroscope). In andere waterbronnen van *L. pneumophila* (bv drinkwater, koeltorens) wordt *Legionella* beheerst door het toepassen van een desinfectiemethode die micro-organismen afdoodt. Dergelijke beheersmaatregelen zijn in deze warme deelprocessen van de IWZI's en RWZI's niet eenvoudig, omdat daarmee de kans bestaat dat ook de bacteriën worden afgedood die nodig zijn om het afvalwater te zuiveren. Daarom is afdekking van deze warme deelstroomprocessen, zodat aerosolen met *L. pneumophila* niet langer in de lucht terechtkomen, momenteel één van de weinige beheersmaatregelen. Afdekking is echter duur en kan het lastig zijn om het gehele systeem afgesloten te krijgen van de omgevingslucht. Bovendien wordt de warme deelstroom nabehandeld in de hoofdstroom van de aeratietanks waarbij, ondanks de verdunning die daarbij optreedt, ook nog mogelijk sprake is van aerosolvorming met legionellabacteriën. Een andere mogelijke effectieve beheersmaatregel is het toedienen van bacteriofagen die specifiek *L. pneumophila* infecteren en daardoor afdoden, een methode die faagtherapie wordt genoemd.

1.2 Faagtherapie

Bacteriofagen die bij faagtherapie worden toegepast zijn virussen. Een virus is een stukje genetisch materiaal met daaromheen een eiwitmantel die in staat is om cellen van levende organismen (bacteriën, archaea, schimmels, planten en dieren) te infecteren, waarbij het virus de genetische machinerie van de cel overneemt om het viruseigen genetisch materiaal te vermenigvuldigen. Virussen die in staat zijn om bacteriën te infecteren worden dus bacteriofagen genoemd. Bacteriofagen zijn de meest aanwezige biologische entiteiten op de planeet (Suttle, 2007) en natuurlijke predatoren van bacteriën (Domingo-Calap & Delgado-Martinez, 2018). Het toepassen van bacteriofagen om specifiek ongewenste bacteriën af te doden wordt dus faagtherapie genoemd en de toepassing van faagtherapie is verkend voor bacteriële infecties bij mensen, maar ook voor bestrijding van bacteriën in de landbouw, in voedsel, in aquacultuur en in andere milieus inclusief aquatische systemen (Batinovic *et al.*, 2019; Kowalska *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2022). Daarbij is het een vereiste dat de bacteriofaag die de doelbacterie moet afdoden eerst wordt geïsoleerd en vermeerderd tot hoge aantallen, waarna het kan worden toegediend aan het milieu waar de doelbacterie moet worden afgedood. In de aquacultuur zijn bijvoorbeeld succesvolle toepassingen bekend van preventieve of therapeutische faagtherapie, waarbij bacteriofagen zijn gebruikt die de vispathogene bacteriën *Vibrio* sp. Va-F3, *Vibrio coralliilyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* en *Flavobacterium columnare* infecteren (Kowalska *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2022).

In actief slib van afvalwaterzuiveringen zijn bacteriofagen ook aanwezig in hoge aantallen (~10⁸ tot 10⁹ per ml) (Otowa *et al.*, 2007) en onder laboratoriumcondities is aangetoond dat toepassing van faagtherapie in afvalwater werkt om schuimvorming, dat veroorzaakt wordt door bepaalde bacteriesoorten, te beheersen (Petrovski *et al.*,

2012; Liu et al., 2015). Het is ook gesuggereerd dat faagtherapie kan worden toegepast om ziekteverwekkers in afvalwater, zoals *Escherichia coli*, *Salmonella* en *P. aeruginosa* te reduceren (Aracic et al., 2015; Jassim et al., 2016).

1.3 Bacteriofagen die *L. pneumophila* infecteren

Uit bovenstaande beschrijving wordt duidelijk dat om faagtherapie succesvol toe te kunnen passen, bacteriofagen geïsoleerd moeten worden die specifiek het doelorganisme kunnen infecteren. Daarom is in de literatuur gezocht naar artikelen die bacteriofagen beschrijven die *L. pneumophila* kunnen infecteren. Uit deze zoektocht bleek dat slechts één enkel artikel in een peerreviewed tijdschrift *L. pneumophila* fagen beschrijft (Lammertyn et al., 2008). Deze onderzoekers beschrijven de isolatie van vier bacteriofaagisolaten uit oppervlaktewater die in staat waren om *L. pneumophila* te infecteren. Op basis van de morfologie en de aanwezigheid van dubbelstrengs DNA in deze vier bacteriofaagisolaten werden deze virussen geïdentificeerd als lid van de *Myoviridae*-familie. Sequentieanalyse van een deel van het genetisch materiaal van één bacteriofaagisolaat liet zien dat deze bacteriofaag nog niet eerder is beschreven. Naast deze publicatie in een peerreviewed tijdschrift, zijn ook nog een proefschrift en een masterthesis gevonden (Nezam-Abadi, 2019; Ali Al-Kaabi, 2018). In beide studies lukte het om legionellafagen te isoleren. In het promotieonderzoek van Nezam-Abadi (2019) lukte het vervolgens niet om deze fagen ook rein te kweken, waardoor ze verloren zijn gegaan. Ali Al-Kaabi (2018) is het wel gelukt om een legionellafaag rein te kweken en wanneer deze faag onder laboratoriumcondities werd toegevoegd aan een watermonster waar ook *L. pneumophila* aan was toegevoegd, dan waren de legionella-aantallen significant lager dan in een watermonster waar de legionellafaag niet aan was toegevoegd. Dit resultaat duidt er dus op dat het toevoegen van legionellafagen aan water mogelijk werkt om de aantallen *L. pneumophila* te reduceren, alhoewel een aantal essentiële controles missen in de studie van Ali Al-Kaabi (2018). Bovendien zijn de condities van die laboratoriumexperimenten volstrekt anders dan die in een afvalwaterzuivering.

Een andere studie heeft zich niet gericht op isolatie van bacteriofagen die *L. pneumophila* kunnen infecteren, maar richtte zich op het achterhalen van de DNA-sequentie van het CRISPR-CAS systeem in het genoom van *L. pneumophila* (Deecker et al., 2021). Het CRISPR-CAS systeem gebruiken bacteriën als afweersysteem tegen bacteriofagen. Uit de verkregen DNA-sequentie van het CRISPR-CAS systeem in verschillende *L. pneumophila* stammen kon worden geconcludeerd dat *L. pneumophila* stammen met name door bacteriofagen uit de *Microviridae*-familie (subfamilie *Gokushovirinae*) worden geïnfecteerd, wat een andere virusfamilie is dan die gevonden in de eerder beschreven studie (Lammertyn et al., 2008).

1.4 Fecale ziekteverwekker *Campylobacter* en *Campylobacter*-fagen in afvalwater

Naast *L. pneumophila* zijn in communaal afvalwater vaak ook andere ziekteverwekkende bacteriën aanwezig, zeker in RWZI's waar het afvalwater een range aan fecale ziekteverwekkers kan bevatten. De zuivering bij de RWZI's is op dit moment niet ingericht om deze fecale ziekteverwekkers intensief te verwijderen. Hoewel de aantallen van fecale ziekteverwekkers wordt verlaagd in de zuivering van de RWZI, bevat het effluent nog steeds relatief hoge aantallen fecale ziekteverwekkers die op het oppervlaktewater worden geloosd. Faagtherapie met bacteriofagen die fecale bacteriële ziekteverwekkers infecteren zou ook kunnen helpen om de aantallen van deze organismen in de zuivering te reduceren. Eén belangrijke bacteriële fecale ziekteverwekker in afvalwater is *Campylobacter* en in tegenstelling tot *Legionella* zijn bacteriofagen die *Campylobacter*-soorten kunnen infecteren regelmatig geïsoleerd. Sommige van deze *Campylobacter*-fagen zijn ook toegepast in faagtherapie om bijvoorbeeld de aantallen *Campylobacter* in kippen en kippenboerderijen succesvol te reduceren (Chinivasgam et al., 2020).

1.5 Doelstelling

Het doel van dit verkennend onderzoek is om te achterhalen of bacteriofagen kunnen worden geïsoleerd uit afvalwater die specifiek *L. pneumophila* of *Campylobacter* kunnen infecteren.

2 Materiaal en methoden

2.1 Isolatie van legionellafagen

Geprobeerd is legionellafagen te isoleren met een protocol dat is gebaseerd op het protocol zoals beschreven door Lammertyn et al. (2008). Daarbij werd eerst onderzocht of het normale selectieve agarmedium voor *Legionella* wel geschikt is om eventuele heldere zones te zien die zijn veroorzaakt door legionellafagen, omdat het medium kool bevat wat het agarmedium zwart en troebel maakt. Hiervoor zijn colifagen gebruikt met *E. coli* als gastheer en uit de resultaten bleek dat een medium zonder kool het beste werkt voor identificatie van heldere zones. Daarom is een aangepast agarmedium gebruikt om legionellabacteriën op te kweken, namelijk BYE agarplaat (zonder charcoal). Daarnaast is contact opgenomen met de onderzoeksgroep uit België (Lammertyn et al., 2008) en de Verenigde Arabische Emiraten (Ali Al-Kaabi, 2018) om legionellafagen te vragen die dan als positieve controle konden worden gebruikt. De Belgische onderzoeksgroep liet weten dat hun legionellafagen verloren zijn geraakt door een verhuizing en van de onderzoeksgroep in de Verenigde Arabische Emiraten is geen respons gekomen. Hierdoor kon geen positieve controle worden meegenomen.

Het uiteindelijke protocol dat is gebruikt voor isolatie en ophoping van legionellafagen uit afvalwater is hieronder beschreven.

Protocol

A. Verkrijgen bacteriofaagsuspensie afvalwatermonster

1. Neem 100 ml watermonster uit twee afvalwaterzuiveringen die positief zijn voor *Legionella pneumophila*.
2. Centrifugeer het monster 30 minuten bij 4.650xg zonder rem.
3. Filtreer het supernatant door een 0.2 µm filter.

B. Opkweken gastheer die wordt gebruikt voor isolatie legionellafagen

4. Een celsuspensie van twee verschillende *L. pneumophila* stammen wordt gemaakt door materiaal op te hopen van een agarplaat waar beide stammen op hebben gegroeid.

C. Vermeerdering van legionellafagen in de gastheer

5. Inoculeer 40 ml supernatant van stap 3 met 20 ml celsuspensie *L. pneumophila* (apart met stam uit onze eigen collectie en geïsoleerde stam) verkregen met stap 4.
6. Incubeer 48 uur bij 37°C.

D. Verkrijgen verrijkte legionellafaagsuspensie

7. Behandel na incubatie gedurende twee minuten met hoog energie sonificatie (45%).
8. Centrifugeer 30 minuten bij 4.650xg en pipetteer supernatant in nieuwe buis.
9. Concentreer het supernatant met centricon100 tot minimaal 300 µl, resuspendeer het verkregen volume met 1 ml SM-buffer (8 mM MgSO₄, 100 mM NaCl, 0.01% gelatin, 50 mM Tris-HCl pH 7,5) en bewaar bij -20°C.

E. Detectie van legionellafagen op agarplaten met *L. pneumophila*

10. Giet 3 ml van BCYE met 0.5% agarose en 800 µl van een *L. pneumophila* celsuspensie op een BYE agarplaat (zonder charcoal zodat de lysiszones zichtbaar zijn).
11. De celsuspensie/BCYE mix wordt gezwenkt zodat het de gehele agar bedekt.

12. Wanneer de agarose is gestold wordt 10 µl SM-faagsuspensie op de agarose gespot en worden de platen na 2 tot 7 dagen incuberen bij 37°C geïnspecteerd op heldere zones.

F. Verder reinkweken van *legionellafaagisolaten*

13. Na incubatie worden geïsoleerde plaques met een pipetpunt individueel verzameld, gesuspenseerd in 100 µl SM-buffer en ingevroren bij -20°C.
14. Mix 100 µl van diverse verdunningen van de faagsuspensie met 200 µl van een celsuspensie van *L. pneumophila* en incubeer 30 minuten bij 37°C.
15. Voeg vervolgens 3 ml BCYE met 0.5% agarose toe aan de faag/celsuspensie en giet deze softagar over gestolde BYE agarplaat (zonder charcoal, zodat de lysiszones zichtbaar zijn).
16. Inspecteer de agarplaten op heldere zones na 24, 48, 72 en 96 uur incuberen bij 37°C.

Als gastheer werd een *L. pneumophila* SG1 stam LMB126375 uit afvalwater en een *L. pneumophila* SG1 stam M031063 uit drinkwater gebruikt. Daarnaast werd afvalwater van de volgende RWZI's ingezet: Zwolle (maart) en Apeldoorn (mei).

2.2 Isolatie van *Campylobacter*-fagen

De isolatie van *Campylobacter*-fagen werd geprobeerd met het protocol van Chinivasagam et al. (2020). Daarbij is een *Campylobacter*-faag uit de cultuurcollectie van de ATCC opgevraagd (ATCC 43136-B1), die als positieve controle is gebruikt. Het protocol voor isolatie en ophoping van legionellafagen is hieronder beschreven:

A. Verkrijgen bacteriofaagsuspensie afvalwatermonster

1. Neem 100 ml monster van influent bij zes verschillende afvalwaterzuiveringen.
2. Voeg 10 ml monster toe aan 90 ml SM-buffer (10 mM MgSO₄, 100 mM NaCl, 0.01% gelatin, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) en 50 ml monster toe aan 150 ml SM-buffer.
3. Incubeer de suspensie overnacht bij 4°C.
4. Filtreer de volgende ochtend de overnachtsuspensie over een 0,2 µm filter
5. Concentreer vervolgens het ~100 of ~200 ml filtraat met Centricon 100 terug tot ongeveer 300 – 700 µl en vul met SM-buffer aan tot 1000 µl.

B. Opkweken gastheer die wordt gebruikt voor isolatie *Campylobacter*-fagen

Campylobacter-stammen werden uit het influent van de RWZI geïsoleerd door ophoping in Preston vloeibaar medium met selectief supplement, gevolgd door uitplaten op Karmali agarmedium met selectief supplement, beide selectief voor de kweek van *Campylobacter*. Tevens werd twee *Campylobacter*-stammen uit de cultuurcollectie van de ATCC opgekweekt (ATCC 43136 en ATCC 33559) in Preston vloeibaar medium en deze werd uitgeplaat op TSA met paardenbloed. Alle incubaties zijn gedaan bij 42°C en onder micro-aerofiele omstandigheden.

C. Vermeerdering van *Campylobacter*-fagen in de gastheer en detectie op agarplaten

6. Voeg vervolgens 100 µl van het verkregen concentraat toe aan 200 µl *Campylobacter*-cultuur (10⁸ kve/ml) met stam uit de collectie of met stam geïsoleerd uit het te onderzoeken afvalwater.
7. Incubeer het concentraat/*Campylobacter*-mengsel vervolgens 30 minuten bij 42°C, zodat de *Campylobacter*-faag aan de *Campylobacter*-cellen kan binden.
8. Voeg daarna 200 µl, 100 µl en 10 µl (RWZI's Utrecht en Ede) en 500, 300 en 100 µl (RWZI's Sleeuwijk, Tiel, Culemborg en Vianen) van het concentraat/*Campylobacter*-mengsel toe aan 5 ml gesmolten 0.6% NZCYM soft agar overlay (48°C) en giet de softagar over agarplaat van gestolde 1% NZCYM agar.
9. Incubeer de platen daarna onder micro-aerofiele condities voor 24 uur bij 42°C en inspecteer de platen vervolgens op heldere zones.

F. Verder reinkweken van *Campylobacter*-faagisolaten

10. Na incubatie worden geïsoleerde plaques met een pipetpunt individueel verzameld en gesuspendeerd in 100 µl SM buffer.
11. Vervolgens wordt stap 3 – 10 twee keer herhaald, zodat een reïncultuur van de faag wordt verkregen.

Het influent van RWZI's Utrecht, Ede, Sleeuwijk, Tiel, Culemborg en Vianen werd ingezet met bovenstaand protocol.

3 Resultaten en discussie

3.1 Isolatie legionellafagen

3.1.1 Optimalisatie opkweken *L. pneumophila* stammen

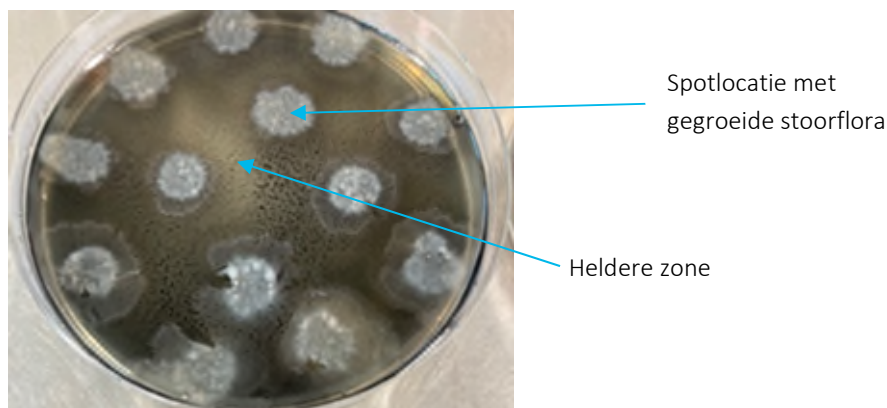
Om de legionellafagen uit afvalwater te kunnen isoleren, zijn hoge aantallen van de gastheerstammen van *L. pneumophila* nodig. Het opkweken van *L. pneumophila* stam LMB126375 en M031063 lukte echter niet goed op BYE + antibiotica bouillon. Groei trad wel op in BYE bouillon zonder antibiotica, maar mogelijk dat dit groei is van niet-legionellasoorten, aangezien *L. pneumophila* zich ook moeten kunnen vermeerderen in BYE-bouillon met antibiotica. Daarom zijn eerst aanvullende experimenten uitgevoerd om te achterhalen wat het beste vloeibare medium is waar deze twee *L. pneumophila* stammen op groeien. Dat leidde niet tot een verbetering. Uiteindelijk is gekozen om de twee stammen door groei op te hopen op BCYE-agarplaten en dat te gebruiken om een celsuspensie van te maken.

3.1.2 Optimalisatie agarmedium voor detectie helder hof van legionellafagen

In het normale agarmedium om *L. pneumophila* op te kweken zit antraciet dat waarschijnlijk toxische stoffen voor *Legionella* bindt, CO₂ wegvangt of de oppervlaktespanning verandert (Feeley et al., 1979). Door toevoeging van antraciet worden de agarplaten echter zwart en troebel. De zwarte en troebele kleur zou het detecteren van een helder hof (veroorzaakt door groei van legionellafagen) kunnen vermoeilijken. Daarom is onderzocht in hoeverre antraciet in een agarmedium problemen geeft bij detectie van bacteriofagen. Deze experimenten zijn uitgevoerd met somatische colifagen, bacteriofagen die *Escherichia coli* infecteren, en die onder laboratoriumcondities gemakkelijk op te kweken zijn. De resultaten hiervan lieten zien dat de somatische colifagen ook een duidelijk waarneembaar helder hof lieten zien in de agarplaten met antraciet, waardoor in de vervollexperimenten om legionellafagen te isoleren antraciet is toegevoegd aan het agarmedium.

3.1.3 Eerste test isolatie legionellafagen

De eerste test om legionellafagen te isoleren zijn uitgevoerd in maart 2022, waarbij de twee stammen van *L. pneumophila* werden opgekweekt op BCYE-medium met antibiotica. De *L. pneumophila* bacteriën zijn vervolgens eerst geconcentreerd middels centrifuge en vervolgens in geconcentreerde concentratie in soft agarlaag over BCYE agarmedium gegoten. Met een spottest is vervolgens de verrijkte legionellafaagsuspensie (zie stap D in paragraaf 2.1) op verschillende plekken op de agarplaten gespot. Indien legionellafagen in het afvalwater aanwezig zijn, zouden deze op de spotplek een heldere zone moeten geven, omdat *L. pneumophila* daar niet groeit door infectie met de legionellafaag. Daarbij is in deze eerste test slechts één afvalwatermonster van een warm deelproces van RWZI Zwolle ingezet, om te achterhalen of de methode leidt tot een waarneembare heldere hof rond de spots. Een karakteristiek heldere hof dat normaal wordt waargenomen voor bacteriofagen die bacteriën infecteren werd echter niet gezien (Figuur 3.1). Daarnaast groeiden sommige andere bacteriën die aanwezig waren in het afvalwater ook op het selectieve medium voor *Legionella*, waardoor op de spotlocaties groei optrad van bacteriën anders dan *Legionella*. Hierdoor waren de platen moeilijk te beoordelen op de aanwezigheid van een helder hof, maar in totaal werden rond 13 spotlocaties (verdeeld over verschillende agarplaten) verdachte heldere zones waargenomen (Figuur 3.1). Deze heldere zones werden uitgestoken, gesuspendeerd en bij -20°C ingevroren. Op een later moment werden ze opnieuw ingezet met voorgekweekte *L. pneumophila* stammen, zodat definitief kon worden achterhaald of deze heldere zones door legionellafagen zijn veroorzaakt.



Figuur 3.1 Een BCYE agarplaat met 13 spots waar supernatant van afvalwater van RWZI Zwolle is toegevoegd. Op de dertien spotlocaties wordt groei van stoorflora waargenomen. Tussen de spots lijkt groei van *Legionella pneumophila* opgetreden te zijn en op sommige locaties worden heldere zones waargenomen.

3.1.4 Tweede test isolatie legionellafagen

De tweede test om legionellafagen te isoleren is in mei 2022 ingezet. Daarbij werden afvalwatermonsters van twee verschillende warme deelstromen van de RWZI Apeldoorn ingezet bij de spottest waaraan *L. pneumophila* SG1 stam LMB126375 uit afvalwater en een *L. pneumophila* SG1 stam M031063 uit drinkwater werden toegevoegd als gastheer. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 3.1. Net als bij de eerste poging werden geen karakteristieke heldere hoven waargenomen, maar werden er wel heldere zones gezien zoals na de eerste test (zie Figuur 3.1). In totaal werden tien heldere zones op een agarplaat waargenomen en uitgestoken, gesuspendeerd en bij -20°C opgeslagen. Deze werden op een later moment opnieuw ingezet met voorgekweekte *L. pneumophila* stammen, zodat definitief kon worden achterhaald of deze heldere zones door legionellafagen zijn veroorzaakt.

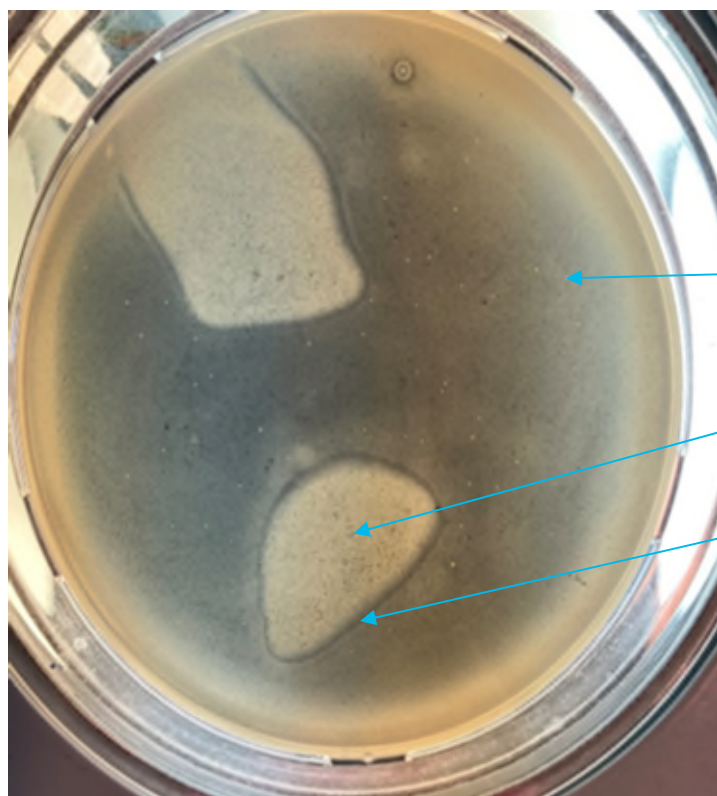
Tabel 3.1 Het aantal verdachte plaquevormende eenheden (pve) op de agarplaten geïnoculeerd met twee stammen van *L. pneumophila* en gespot met een faagsuspensie van warm deelprocesstraat 1 (AT1) en warm deelprocesstraat 2 (AT2) van RWZI Apeldoorn.

<i>L. pneumophila</i>	Faagsuspensie:	Aantal spots	Aantal verdachte pve
Stam AW 375	AT 1 + suspensie zonder bouillon	56	8
Stam AW 375	AT 1 + suspensie zonder bouillon	56	1
Stam ZH 063	AT 2 + suspensie zonder bouillon	56	0
Stam ZH 063	AT 2 + suspensie zonder bouillon	56	1

3.1.5 Testen of uitgestoken heldere zones legionellafagen zijn

De bij -20°C opgeslagen suspensies werden opnieuw ingezet met de twee *L. pneumophila* stammen als gastheer. De resultaten lieten geen karakteristieke heldere hoven zien, maar wel werden kolonies van andere bacteriën waargenomen (stoorflora) met daaromheen een heldere zone (Figuur 3.2). Uit deze resultaten is geconcludeerd dat het niet is gelukt om (lytische) legionellafagen uit het afvalwater te isoleren. Deze uitkomst komt overeen met de resultaten van een promotieonderzoek uit het Verenigd Koninkrijk, waarin een promovendus ook niet in staat was om legionellafagen uit verschillende watertypen rein te kweken (Nezam-Abadi; 2019). Hoewel uit de literatuur is gebleken dat het afweersysteem van *L. pneumophila* (het zogenoemde CRISPR-CAS systeem) aanwijzingen bevat dat bepaalde bacteriofagen *L. pneumophila* kunnen infecteren (Deecker et al., 2021), is het opkweken van deze bacteriofagen onder laboratoriumcondities uitermate lastig.

De heldere zones rond de andere bacteriekolonies laten zien dat *L. pneumophila* niet in staat is direct rond deze bacteriekolonies te groeien. Dat kan zijn veroorzaakt door een gebrek aan nutriënten voor *L. pneumophila* direct rond deze bacteriekolonies of doordat deze andere bacteriën stoffen produceren die *L. pneumophila* afdoden of hun groei remmen. In het laatste geval zou het misschien mogelijk zijn om groei van *L. pneumophila* in afvalwater te remmen door het toevoegen van deze andere bacteriën. Aanvullende experimenten zijn echter nodig om vast te stellen of deze bacteriën stoffen produceren die *L. pneumophila* afdoodt, maar dat valt buiten de doelstelling van dit project.



Egale troebeling door
groei van *L. pneumophila*

Kolonie van andere bacterie

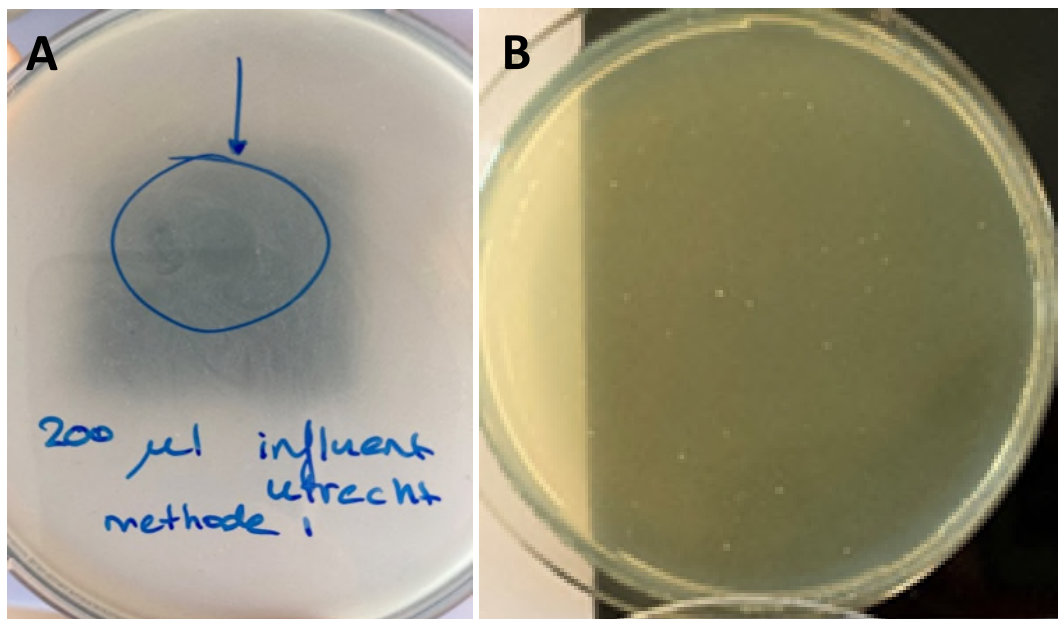
Heldere zone rond
bacteriekolonie waar geen
groei van *L. pneumophila*
plaatsvond

Figuur 3.2. Agarplaat met egaal troebele delen veroorzaakt door groei van *L. pneumophila* en waarin geen heldere zones werden waargenomen, en kolonies van andere bacteriën met daarom een heldere zone waar groei van *L. pneumophila* niet plaatsvond.

3.2 Isolatie *Campylobacter*-fagen

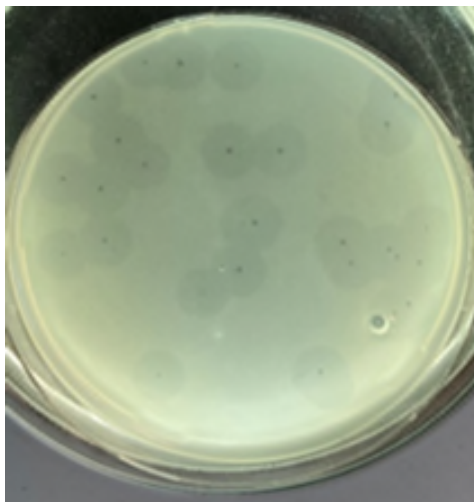
3.2.1 Eerste test isolatie *Campylobacter*-fagen met influent RWZI Utrecht en RWZI Ede

De eerste test om *Campylobacter*-fagen te isoleren werd uitgevoerd in augustus 2023 met het influent van RWZI Utrecht en RWZI Ede. Als eerste stap werd een vermoedelijke *Campylobacter*-stam geïsoleerd uit het influent van RWZI Utrecht en RWZI Ede door het influent in te zetten op het selectieve media voor *Campylobacter*. Daarbij werd eerst een ophoping gedaan in Preston vloeibaar medium en na de ophoping werd een klein volume uitgeplaat op Karmali agarmedium. Dit resulteerde in de vorming van karakteristieke kolonies voor *Campylobacter* op het agarmedium en per RWZI werd één van deze kolonies vervolgens rein gekweekt. Deze stammen (één uit RWZI Utrecht en één uit RWZI Ede) werden vervolgens samen met de *C. coli* stammen ATCC 33559 en ATCC 43136 gebruikt in een eerste test om *Campylobacter*-fagen uit het influent van RWZI Utrecht of RWZI Ede te kweken. Met het influent van RWZI Utrecht werd één verdachte heldere zone (ook plaque genoemd) waargenomen met de vermoedelijke *Campylobacter*-stam uit het influent van de RWZI Utrecht (Figuur 3.3), terwijl met het influent van RWZI Ede geen verdachte heldere zones werden waargenomen met zowel de *C. coli* stam ATCC 33559 als de vermoedelijke geïsoleerde *Campylobacter*-stam uit het influent van RWZI Ede. De positieve *Campylobacter*-faag (ATCC 43136-B1) gaf geen resultaat met alle *Campylobacter*-stammen. Met de ATCC-stammen kwam dit omdat geen goede homogene groei van de *C. coli* stammen werd verkregen op het NZCYM agarmedium, waardoor eventuele plaques niet goed waarneembaar waren. Doordat succesvol een faag werd geïsoleerd uit het influent van RWZI Utrecht, is besloten om niet langer de ATCC bacteriofaagstam als positieve controle te gebruiken, maar de bacteriofaag uit RWZI Utrecht.



Figuur 3.3 Agarplaten waaraan suspensie van behandeld influent met vermoedelijke *Campylobacter*-stam van RWZI Utrecht werd toegevoegd. De troebelheid op de platen wordt veroorzaakt door groei van de vermoedelijke *Campylobacter*-stam. A: ingezet met influent van RWZI Utrecht waarbij een heldere zone (ook plaque genoemd; binnen de blauwe cirkel) werd waargenomen, wat duidt op groei van een bacteriofaag. B: ingezet met influent van RWZI Ede, waarbij geen heldere zones werden waargenomen.

De plaque verkregen op de agarplaat met het influent van RWZI Utrecht werd vervolgens uitgestoken en gesuspenderd. Deze suspensie werd vervolgens opnieuw ingezet met de vermoedelijke *Campylobacter*-stam van RWZI Utrecht en na incubatie van de platen werden verschillende plaques op de agarplaat waargenomen (Figuur 3.4). Daarmee is bevestigd dat uit het influent van RWZI Utrecht een bacteriofaag is geïsoleerd. De verkregen plaques zijn vervolgens weer uitgestoken en geresuspenderd in 100 µl SM-buffer en vervolgens bij -80°C opgeslagen.



Figuur 3.4 Agarplaat waaraan suspensie van plaque Figuur 3.3A met vermoedelijke *Campylobacter*-stam uit RWZI Utrecht werd toegevoegd. De verschillende heldere zones (plaques) die zichtbaar zijn, laten zien dat de plaque van Figuur 3.3A een bacteriofaag is.

3.2.2 Tweede test isolatie *Campylobacter*-fagen met influent van vier RWZI's

Na de succesvolle isolatie van een bacteriofaag uit het influent van RWZI Utrecht, werd met ongeveer hetzelfde protocol getracht fagen uit het influent van RWZI Sleeuwijk, Tiel, Culemborg en Vianen te isoleren. Daarbij werden kleine aanpassingen gedaan door (i) naast 10 ml ook 50 ml van het influent van de RWZI's in te zetten en (ii) een iets hoger volume in te zetten met de vermoedelijke *Campylobacter*-suspensie (over het algemeen 500, 300 en 100 µl). Tevens werden zowel vermoedelijke *Campylobacter*-stammen gebruikt die waren geïsoleerd uit het te onderzoeken RWZI-influent als een vermoedelijke *Campylobacter*-stam die was geïsoleerd uit het influent van RWZI Utrecht. Verdachte plaques werden aangetroffen met het influent van alle vier de RWZI's (Tabel 3.2). De hoogste aantallen verdachte plaques werden aangetroffen bij RWZI Sleeuwijk gevolgd door RWZI Vianen en RWZI Tiel/RWZI Culemborg.

Tabel 3.2 Het aantal verdachte en bevestigde plaques van bacteriofagen geïsoleerd uit het influent van RWZI's Sleeuwijk, Tiel, Culemborg en Vianen.

RWZI	Influent (ml)	Concentraat (µl)	Vermoedelijke <i>Campylobacter</i> -stam	Ingezette volumes (µl)	Aantal verdachte plaques
Sleeuwijk	10	690	Sleeuwijk	500; 300; 100	>300
			Utrecht	100	11
	50	570	Sleeuwijk	300; 300; 100	NTB ^c
			Utrecht	100	36
Tiel	10	320	Tiel	500; 300; 100	0
			Utrecht	100	8
	50	1110	Tiel	500; 300; 210	0
			Utrecht	100	35
Culemborg	10	420	Culemborg	500; 300; 100	0
			Utrecht	100	92
	50	470	Culemborg	500; 300; 100	0
			Utrecht	100	300
Vianen	10	380	Vianen	500; 300; 100	4
			Utrecht	100	16
	50	370	Vianen	500; 300; 100	29
			Utrecht	100	15

^a Als positieve controle is de bacteriofaag gebruikt die is geïsoleerd uit het influent van RWZI Utrecht (zie paragraaf 3.2.1)

^b Niet van toepassing

^c Niet te beoordelen

De hoogste aantallen verdachte plaques uit het influent van RWZI Sleeuwijk werden waargenomen met de vermoedelijke *Campylobacter*-stam geïsoleerd uit RWZI Sleeuwijk, terwijl het aantal verdachte plaques uit het influent van RWZI Sleeuwijk met de vermoedelijke *Campylobacter*-stam geïsoleerd uit RWZI Utrecht meer dan 10 keer lager lag (Tabel 3.2). Opvallend was dat voor RWZI's Tiel en Culemborg het omgekeerde werd waargenomen. Met het influent van die RWZI's werden geen plaques waargenomen wanneer de vermoedelijke *Campylobacter*-stam geïsoleerd uit het influent van deze RWZI's werden gebruikt, terwijl wel plaques werden aangetroffen wanneer de vermoedelijke *Campylobacter*-stam uit RWZI Utrecht werd gebruikt. Het aantal verdachte plaques uit het influent van RWZI Vianen was tot slot vergelijkbaar met de vermoedelijke *Campylobacter*-stam geïsoleerd uit RWZI Vianen en de vermoedelijke *Campylobacter*-stam geïsoleerd uit RWZI Utrecht.

Als positieve controle werd de bacteriofaag gebruikt die uit het influent van RWZI Utrecht was geïsoleerd. Deze faag was in staat zich te vermeerderen in de vermoedelijke *Campylobacter*-stam die ook uit het influent van RWZI

Utrecht was geïsoleerd, maar plaques werden niet waargenomen wanneer deze faag werd geïnoculeerd met de vermoedelijke *Campylobacter*-stammen geïsoleerd uit het influent van de andere RWZI's.

3.2.3 Karakteriseren vermoedelijke *Campylobacter*-stammen

Eerder onderzoek heeft laten zien dat veelal *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* en *Campylobacter lari* in afvalwater worden aangetroffen, waarbij op de ene locatie *C. coli* dominant was en op een andere locatie *C. jejuni* (Zhang et al., 2023, Strakova et al., 2022, Koenraad et al., 1995). Het werd daarom mogelijk geacht dat de vermoedelijke *Campylobacter*-stammen die werden geïsoleerd uit de RWZI's tot verschillende *Campylobacter*-soorten behoorden. Om te achterhalen welke soort werd geïnfecteerd door de bacteriofagen, werden de vermoedelijke *Campylobacter*-stammen gekarakteriseerd door het volledige 16S rRNA gen te sequencen en de sequentie te vergelijken met de sequenties in een wereldwijde database. De resultaten lieten verrassend zien dat de geïsoleerde stammen tot andere bacteriesoorten dan *Campylobacter* behoorden. Dit was verrassend omdat in de experimenten twee selectieve kweekmedia voor *Campylobacter* zijn gebruikt (Preston vloeibaar medium en Karmali agarmedium) en dat de koloniemorfologie overeenkwam met de koloniemorfologie van *Campylobacter*-bacteriën op Karmali agarmedium. Dit betekent dus dat het niet gelukt is om *Campylobacter*-fagen te isoleren, maar dat bacteriofagen zijn geïsoleerd die andere bacteriesoorten infecteren. In Tabel 3.3 is de geïsoleerde bacteriesoort per RWZI weergegeven en in Tabel 3.4 de specifieke bacteriofagen die zijn geïsoleerd per RWZI.

Tabel 3.3 De geïsoleerde bacteriesoort uit het influent van de verschillende RWZI's die werden gebruikt voor isolatie van de bacteriofagen uit de verschillende influenten. Identificatie tot soortsniveau is gebaseerd op het volledige 16S rRNA gen.

RWZI	Bacteriesoort
Utrecht	<i>Escherichia fergusonii</i>
Sleeuwijk	<i>Shigella flexneri</i>
Tiel	<i>Escherichia coli</i>
Culemborg	<i>Shigella flexneri</i>
Vianen	<i>Escherichia fergusonii</i>

Tabel 3.4 Aantal bacteriofagen geïsoleerd met verschillende gastheerstammen geïsoleerd uit het influent van RWZI's Utrecht, Sleeuwijk, Tiel, Culemborg en Vianen.

RWZI	Gastheer	Aantal bacteriofagen
Utrecht	<i>Escherichia fergusonii</i>	1
Sleeuwijk	<i>Shigella flexneri</i>	> 300
Sleeuwijk	<i>Escherichia fergusonii</i> stam Utrecht	47
Tiel	<i>Escherichia coli</i>	0
Tiel	<i>Escherichia fergusonii</i> stam Utrecht	43
Culemborg	<i>Shigella flexneri</i>	0
Culemborg	<i>Escherichia fergusonii</i> stam Utrecht	392
Vianen	<i>Escherichia fergusonii</i> stam Vianen	33
Vianen	<i>Escherichia fergusonii</i> stam Utrecht	31

Uit Tabel 3.3 volgt dat bacteriesoorten uit de familie van de *Enterobacteriaceae*, waar ook bacteriën van de coligroep in vallen, zijn geïsoleerd op de *Campylobacter*-specifieke kweekmedia Preston vloeibaar medium en Karmali agarmedia. Deze kweekmedia bevatten de volgende antibiotica: polymyxine B, rifampicine, trimethoprim, cycloheximide, cefoperazone, vancomycine en amphotericine B. De antibiotica polymyxine B, trimethoprim en cefoperazone remmen normaliter de groei van bacteriën die behoren tot de *Enterobacteriaceae* (Hazeleger et al., 2016; Tang et al., 2022). De *Enterobacteriaceae*-soorten die toch groeiden op de media met deze antibiotica zijn dus antibioticaresistente stammen en vormen daarmee een mogelijk risico voor de volksgezondheid. Uit Tabel 3.4 volgt dat het uiteindelijk is gelukt om bacteriofagen te isoleren die de bacteriesoort *Escherichia fergusonii* of *Shigella flexneri* infecteren. Van *S. flexneri* zijn in Nederland over de periode 1993 tot 2015 747 ziektegevallen gemeld die de ziekte (diarree) binnen Nederland hebben opgelopen (Pijnacker et al., 2017). Daarmee lijkt *S. flexneri* dus niet een veelvoorkomende ziekteverwekker in Nederland. De verspreiding van *S. flexneri* vindt plaats door overdracht via mens, voedsel of water en een combinatie van antibiotica waaronder trimethoprim wordt als behandeling voorgesteld (LCI-richtlijn RIVM). De *S. flexneri* stam die uit het RWZI-influent werd geïsoleerd is dus resistent tegen trimethoprim en geeft daardoor mogelijk een verhoogd risico voor de volksgezondheid. De geïsoleerde fagen tegen deze resistente stam zouden dus mogelijk ingezet kunnen worden om antibioticaresistente *S. flexneri* in afvalwater te bestrijden, maar onduidelijk is in hoeverre verspreiding via effluent van de RWZI bijdraagt aan infectie van *S. flexneri*. *E. fergusonii* kan ook infecties veroorzaken bij mens en dier, maar de prevalentie van deze infecties in Nederland is onbekend (Gaastra et al., 2014).

De observatie dat de geïsoleerde stammen geen *Campylobacter*-soorten waren maar verschillende bacteriesoorten die behoren tot de *Enterobacteriaceae*, verklaart ook waarom met de ene stam wel bacteriofagen werden geïsoleerd uit het influent van een RWZI, maar met een andere stam niet. Zo werd bijvoorbeeld uit het influent van RWZI geen fagen geïsoleerd met *E. coli* als gastheer, maar wel met *E. fergusonii*. Mogelijke verklaringen voor dit verschil zijn dat (i) bacteriofagen van *E. coli* veel minder aanwezig waren in het influent dan fagen van *E. fergusonii*, (ii) het toegepaste protocol, dat was toegespitst op isolatie van fagen van *Campylobacter*, geschikt is om fagen te isoleren van *E. fergusonii* dan van *E. coli* of (iii) de stam van *E. fergusonii* gevoeliger is voor infectie met fagen dan de stam van *E. coli*. Doordat *E. coli* normaliter in hogere aantallen aanwezig is dan *E. fergusonii* in huishoudelijk afvalwater is het onwaarschijnlijk dat bacteriofagen van *E. coli* in lagere aantallen aanwezig zullen zijn in het geteste afvalwater dan *E. fergusonii*. In hoeverre de andere twee mogelijke verklaringen daadwerkelijk de oorzaak zijn van dit verschil kan met de huidige resultaten en kennis niet worden gegeven, daar is aanvullend onderzoek voor nodig.

Het onderzoek laat ook zien dat de bacteriofaag die de *E. fergusonii* stam uit het afvalwater van Vianen infecteerde, niet in staat was de *E. fergusonii* stam uit het afvalwater van Utrecht te infecteren. Deze bacteriofaag lijkt daarmee alleen bepaalde stammen van *E. fergusonii* te infecteren, maar niet alle *E. fergusonii* stammen die in afvalwater aanwezig kunnen zijn. De gastheerspecificiteit van geïsoleerde bacteriofagen is belangrijk wanneer bacteriofagen worden ingezet om bepaalde ongewenste bacteriesoorten te bestrijden. In dat geval is het nodig om of een bacteriofaag te gebruiken die een zeer breed stammenbereik heeft van de gastheersoort, of om meerdere bacteriofagen te gebruiken die tezamen een breed stammenbereik hebben van de te bestrijden gastheersoort.

Een deel van de verdachte plaques die werden waargenomen met het influent van de vier RWZI's werden uitgestoken en zijn bij -80°C opgeslagen. Tevens zijn ook de gastheerstammen opgeslagen in de -80°C vriezer, zodat de geïsoleerde fagen en hun gastheerstammen eventueel voor verdere experimenten kunnen worden gebruikt.

3.2.4 Voorstel voor vervolgonderzoek

Het onderzoek naar bacteriofagen die *L. pneumophila* of *Campylobacter* kunnen infecteren is geïnitieerd om uiteindelijk te onderzoeken of dergelijke bacteriofagen gebruikt zouden kunnen worden om *L. pneumophila* en/of *Campylobacter* te bestrijden in afvalwater. Om tot dat einddoel te komen is het als eerste noodzakelijk om deze bacteriofagen te isoleren uit afvalwater, wat de inzet was van deze studie. De resultaten laten zien dat het niet gelukt is om bacteriofagen uit afvalwater te isoleren die *L. pneumophila* of *Campylobacter* infecteren. Doordat ook

andere onderzoekers geen legionellafagen wisten te isoleren (Nezam-Abadi, 2019), kan worden geconcludeerd dat het niet evident is dat voor elk doelorganisme gemakkelijk bacteriofagen kunnen worden geïsoleerd. Gezien de ervaringen uit deze studie alsook de ervaringen bij andere onderzoeksinstellingen, lijkt het momenteel niet zinvol om het onderzoek naar legionellafagen voort te zetten. Daarbij is het wel aan te bevelen om de literatuur ten aanzien van legionellafagen te blijven monitoren en wanneer studies worden gepubliceerd waarbij legionellafagen zijn geïsoleerd contact te zoeken over de toegepaste isolatiemethode en om na te gaan of de onderzoeksgroep bereid is de legionellafagen te delen.

De isolatie van *Campylobacter*-fagen is niet gelukt omdat achteraf is gebleken dat geen *Campylobacter*-stammen zijn gebruikt voor de isolatie van *Campylobacter*-fagen. Het onderzoek zou daarom herhaald kunnen worden, waarbij wederom wordt getracht *Campylobacter*-stammen uit afvalwater te isoleren. Daarbij is het noodzakelijk om kolonies die zijn gevormd op selectieve agarmedia voor *Campylobacter* eerst te bevestigen, zodat zeker is dat in de vervollexperimenten *Campylobacter*-stammen als gastheer worden gebruikt bij de isolatie van bacteriofagen.

Verder onderzoek naar bestrijding van *S. flexneri* en *E. fergusonii* met bacteriofagen in afvalwater zou ook kunnen worden uitgevoerd, maar dat is alleen zinvol als de prevalentie van deze ziekteverwekkers significant is in Nederland en behandeld afvalwater een belangrijke route van verspreiding is. Uit een eerdere publicatie is gebleken dat de prevalentie van *S. flexneri* laag is in Nederland (Pijnacker et al., 2017). Informatie over ziektegevallen van *E. fergusonii* in Nederland is niet gevonden, wat een indicatie is dat ook de prevalentie van *E. fergusonii* in Nederland laag is. Op basis hiervan wordt daarom aanbevolen om geen verder onderzoek uit te voeren naar bestrijding van deze twee organismen met bacteriofagen in afvalwater.

Het onderzoek heeft uiteindelijk wel laten zien dat het mogelijk is om bacteriofagen tegen bepaalde ongewenste bacteriën te isoleren, hoewel deze ongewenste bacteriesoorten niet de doelbacteriesoorten van het onderzoek waren. Dit laat zien dat de eerste stap in het gebruik van faagtherapie in water, namelijk isolatie van bacteriofagen tegen bepaalde ongewenste bacteriesoorten uit afvalwater, in sommige gevallen mogelijk is. In vervolgonderzoek zou daarom kunnen worden ingezet op isolatie van bacteriofagen tegen bepaalde ongewenste bacteriesoorten in de watercyclus. Daarbij is het echter belangrijk om in samenspraak met de watersector na te gaan welke doelbacteriën dusdanig problematisch zijn, dat bestrijding met bacteriofagen zinvol en kosteneffectief kan zijn. Nadat doelbacteriën zijn geïdentificeerd is het aanbevelingswaardig om eerst een uitgebreide literatuurstudie uit te voeren naar isolatie en beschrijving van bacteriofagen die deze doelbacteriën infecteren alsook meer breder naar al bestaande toepassingen van faagtherapie om ongewenste bacteriën te bestrijden. Daarbij kan dan ook meegenomen worden wat de efficiëntie, duurzaamheid en kosteneffectiviteit is van faagtherapie ten opzichte van andere technieken (bv desinfectiemethoden) om bacteriën in water te bestrijden.

4 Conclusies en aanbevelingen

Bacteriofagen die *L. pneumophila* kunnen infecteren zijn niet geïsoleerd uit afvalwater van warme deelprocessen van de RWZI's Zwolle en Apeldoorn. Het is dus niet evident dat voor elk doelorganisme gemakkelijk bacteriofagen kunnen worden geïsoleerd uit een milieu waar het doelorganisme in relatief hoge aantallen aanwezig is.

Groei van *L. pneumophila* werd geremd direct rond enkele bacteriekolonies die als stoorflora op het legionellaspecifieke agarmedium groeiden. Deze bacteriën produceren mogelijk stoffen die remmend werken tegen *L. pneumophila*, maar dat dient verder onderzocht te worden.

Bacteriofagen die *Campylobacter* kunnen infecteren zijn niet geïsoleerd uit het influent van verschillende RWZI's doordat de vermoedelijke *Campylobacter*-stammen die hiervoor zijn gebruikt bleken te behoren tot stammen binnen de familie *Enterobacteriaceae*.

Bacteriofagen die *S. flexneri* en *E. fergusonii* infecteren zijn wel geïsoleerd uit het influent van verschillende RWZI's. Het toegepaste protocol lijkt dus wel geschikt om bacteriofagen uit afvalwater te isoleren. Daarom wordt aanbevolen om in eventueel vervolgonderzoek het protocol waarmee deze fagen zijn geïsoleerd ook toe te passen voor isolatie van *Campylobacter*-fagen, maar dan met *Campylobacter*-stammen als gastheerorganisme.

Doordat de prevalentie van ziekte veroorzaakt door *S. flexneri* en *E. fergusonii* (waarschijnlijk) laag is in Nederland, lijkt het weinig zinvol om aanvullend onderzoek te doen naar de effectiviteit van de geïsoleerde fagen om deze twee bacteriesoorten in afvalwater te bestrijden.

Ga met de watersector na welke doelbacteriesoorten dusdanig problematisch zijn in water, dat bestrijding met bacteriofagen zinvol en kosteneffectief kan zijn. Voer vervolgens een literatuurstudie uit (i) naar isolatie en beschrijving van bacteriofagen die deze doelbacteriesoorten infecteren en (ii) naar al bestaande toepassingen van faagtherapie om ongewenste bacteriën te bestrijden. Neem daarbij ook mee wat de efficiëntie, duurzaamheid en kosteneffectiviteit zijn van faagtherapie ten opzichte van andere technieken (bv desinfectiemethoden) om bacteriën in water te bestrijden. Op basis van de uitkomsten van een dergelijke literatuurstudie kan dan gekozen worden om experimenteel onderzoek uit te voeren naar toepassing van faagtherapie tegen de geselecteerde bacteriesoorten in de watercyclus.

5 Referenties

Ali Al-Khaabi, N.A. (2018) The use of bacteriophages to control *Legionella* spp in environmental water samples. Msc thesis, United Arab Emirates University, Al Ain, United Arab Emirates.

Aracic, S., Manna, S., Petrovski, S., Wiltshire, J.L., Mann, G. and Franks, A.E. (2015) Innovative biological approaches for monitoring and improving water quality. *Frontiers in Microbiology* 6(826).

Bartels, A.A., van Leerdam, R.C., Lodder, W.J., Vermeulen, L.C. and van den Berg, H.H.J.L. (2019) Inventarisatie van legionellarisico's bij afvalwaterzuiveringsinstallaties. RIVM Briefrapport 2019-0061. RIVM, Bilthoven, Nederland.

Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S.A., Rice, D.T.F., Stanton, C.R., Rose, J., Tucci, J., Nittami, T., Vinh, A., Drummond, G.R., Sobey, C.G., Chan, H.T., Seviour, R.J., Petrovski, S. and Franks, A.E. (2019) Bacteriophages in natural and artificial environments. *Pathogens* (Basel, Switzerland) 8(3).

Chinivasagam, H.N., Estella, W., Maddock, L., Mayer, D.G., Weyand, C., Connerton, P.L. and Connerton, I.F. (2020) Bacteriophages to control *Campylobacter* in commercially farmed broiler chickens, in Australia. *Frontiers in Microbiology* 11(632).

Deecker Shayna, R., Urbanus Malene, L., Nicholson, B., Ensminger Alexander, W. and Julia Pettinari, M. (2021) *Legionella pneumophila* CRISPR-Cas Suggests Recurrent Encounters with One or More Phages in the Family *Microviridae*. *Applied and Environmental Microbiology* 87(17), e00467-00421.

Domingo-Calap, P. and Delgado-Martínez, J. (2018) Bacteriophages: Protagonists of a post-antibiotic era. *Antibiotics* (Basel) 7(3).

Feeley, J.C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, J.K., Mackel, D.C. and Baine, W.B. (1979) Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 10(4), 437-441.

Gaastra, W., Kusters, J.G., van Duijkeren, E. and Lipman, L.J.A. 2014. *Escherichia fergusonii*. *Vet Microbiol* 172(1), 7-12.

Hazeleger, W.C., Jacobs-Reitsma, W.F. and den Besten, H.M.W. 2016. Quantification of Growth of *Campylobacter* and Extended Spectrum β -Lactamase Producing Bacteria Sheds Light on Black Box of Enrichment Procedures. *Frontiers in Microbiology* 7.

Jassim, S.A.A., Limoges, R.G. and El-Cheikh, H. (2016) Bacteriophage biocontrol in wastewater treatment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32(4), 70.

Koenraad, P., Ayling, R., Hazeleger, W., Rombouts, F., & Newell, D. (1995). The speciation and subtyping of *Campylobacter* isolates from sewage plants and wastewater from a connected poultry abattoir using molecular techniques. *Epidemiology & Infection*, 115(3), 485-494.

Kowalska, J.D., Kazimierczak, J., Sowińska, P.M., Wójcik, E.A., Siwicki, A.K. and Dastyh, J. (2020) Growing trend of fighting infections in aquaculture environment—opportunities and challenges of phage therapy. *Antibiotics* 9(6).

Lammertyn, E., Vande Voorde, J., Meyen, E., Maes, L., Mast, J. and Anné, J. (2008) Evidence for the presence of *Legionella* bacteriophages in environmental water samples. *Microbial Ecology* 56(1), 191-197.

Liu, M.; Gill, J.J.; Young, R.; Summer, E.J. Bacteriophages of wastewater foaming-associated filamentous *Gordonia* reduce host levels in raw activated sludge. *Sci. Rep.* 2015, 5, 13754.

Loenenbach, A.D., Beulens, C., Euser, S.M., van Leuken, J.P.G., Bom, B., van der Hoek, W., Husman, A.M.R., Ruijs, W.L.M., Bartels, A.A., Rietveld, A., den Boer, J.W. and Brandsema, P.S. (2018) Two community clusters of Legionnaires' disease directly linked to a biologic wastewater treatment plant, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 24(10), 1914-1918.

Nezam-Abadi, N. (2019) Isolation and characterisation of bacteriophages infecting *Legionella* spp. PhD thesis, University of Leicester, Leicester, UK.

Otawa, K.; Lee, S.H.; Yamazoe, A.; Onuki, M.; Satoh, H.; Mino, T. Abundance, diversity, and dynamics of viruses on microorganisms in activated sludge processes. *Microb. Ecol.* 2007, 53, 143–152.

Petrovski, S.; Tillett, D.; Seviour, R.J. Genome sequences and characterization of the related *Gordonia* phages GTE5 and GRU1 and their use as potential biocontrol agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78, 42–47.

Pijnacker, R., Friesema, I.H.M., Franz, E., van Pelt, W. Trends van shigellosemeldingen in Nederland, 1988-2015. *Infectieziekten Bulletin* 2017 28(4):121-128.

Strakova N, Shagieva E, Ovesna P, Korena K, Michova H, Demnerova K, Kolackova I, Karpiskova R. The effect of environmental conditions on the occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wastewater and surface waters. *J Appl Microbiol.* 2022 Jan;132(1):725-735.

Suttle, C.A. (2007) Marine viruses--major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology* 5(10), 801-812.

Tang B, Chang J, Chen Y, Lin J, Xiao X, Xia X, Lin J, Yang H, Zhao G. *Escherichia fergusonii*, an Underrated Repository for Antimicrobial Resistance in Food Animals. *Microbiol Spectr.* 2022 Feb 23;10(1):e0161721. doi: 10.1128/spectrum.01617-21. Epub 2022 Feb 9. PMID: 35138151; PMCID: PMC8826826.

Zhang S, Shi J, Li X, Tiwari A, Gao S, Zhou X, Sun X, O'Brien JW, Coin L, Hai F, Jiang G. Wastewater-based epidemiology of *Campylobacter* spp.: A systematic review and meta-analysis of influent, effluent, and removal of wastewater treatment plants. *Sci Total Environ.* 2023 Aug 18;903:166410.