



Adrie Atsma, Vitens

Simon in 't Veld, Vitens

Bendert de Graaf, Vitens

Snelle methode voor aantonen coliformen in drinkwater

Drinkwaterbedrijven controleren de (drink)waterkwaliteit voortdurend. Dit doen ze onder andere bij de drinkwaterzuivering en in het voorzieningsgebied. Deze controle omvat bijvoorbeeld het meten van microbiologische parameters. Eén van die parameters betreft het testen op de aanwezigheid van coliformen, wat duidt op een verstoring van de drinkwaterkwaliteit. Voor het aantonen van coliformen wordt in het Waterleidingbesluit een methode beschreven. Deze neemt echter twee dagen in beslag alvorens definitief uitsluitsel kan worden gegeven. Het laboratorium van Vitens maakt sinds kort gebruik van een nieuwe methode waarmee coliformen binnen 18 uur kunnen worden aangetoond. Deze methode is gebaseerd op het bevestigen van coliformverdachte bacteriën met behulp van de *realtime polymerase kettingreactietechniek*.

Coliformen zijn bacteriën welke behoren tot de Enterobacteriën groep. Ze komen voor in oppervlaktewater, grond, plantmateriaal en feces. *Escherichia coli* en *Klebsiella* zijn enkele voorbeelden van coliformen. Eén van de eigenschappen ervan is dat deze relatief snel aan te tonen zijn. Waterbedrijven gebruiken daarom coliformen als indicator voor het lokaliseren van verstoringen van de drinkwaterkwaliteit, welke een gevolg kunnen zijn van bijvoorbeeld lekkages in het distributienetwerk of storingen bij het drinkwaterwinningsproces^{1),2)}.

Dagelijks worden bij ruim 300 tappunten in de drinkwaterketen watermonsters genomen en in het laboratorium van Vitens getest op de aanwezigheid van coliformen. Van elk watermonster filtreert men 100 ml. Het filter wordt op een lactoserijk medium gelegd. Na een voorincubatie van vier uur bij 25°C wordt gedurende twaalf uur verder gekweekt bij 37°C. De aanwezigheid van coliforme bacteriën is zichtbaar door de vorming van gele kolonies op het filter. Ondanks het gebruik van een selectief medium zijn er andere bacteriesoorten die in staat zijn om onder dezelfde condities (gele) kolonies te vormen. Hierdoor is het gebruik van een aanvullende test voor het bevestigen op coliformen noodzakelijk.

Vitens gebruikt in het laboratorium hiervoor de in ISO 9308-1 beschreven oxidasetest^{3),4)}. Bij deze test worden de verdachte coliformen

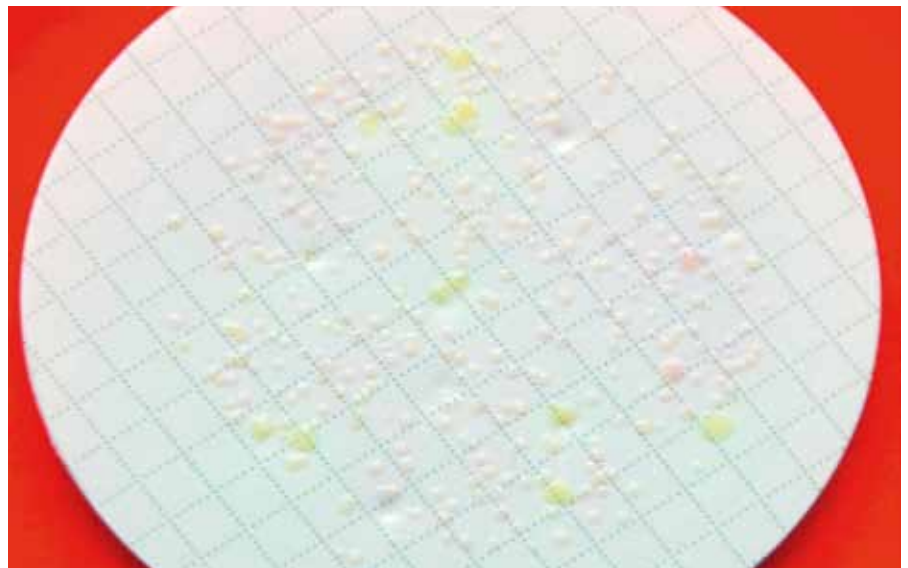
eerst rein gekweekt. Dit ervaart men als nadelig, omdat de totale analysetijd hierdoor 18 uur langer duurt. Dit betekent een langere onzekerheid omtrent de drinkwaterkwaliteit. De behoefte om sneller uitspraak te doen over de aanwezigheid van coliformen is groot. Onderzoek van Vitens leidde uiteindelijk naar de *realtime polymerase kettingreactie* (coliformen *realtime* PCR), waarbij binnen 18 uur na het begin van de analyse

definitief uitsluitsel komt of coliformen aanwezig zijn.

Coliformen *realtime* PCR

Realtime polymerase kettingreactie is een methode die Vitens in het laboratorium gebruikt voor het typeren van bacteriën. Het principe er achter is dat een uniek stukje DNA vermenigvuldigd wordt. Dit unieke stukje DNA heet een (genetische) marker. De

Een kweekresultaat van een getest watermonster dat besmet is met (verdachte) coliformenspecies. De gele kolonies op het filter zijn verdachte coliformspecies. Om te bepalen of dit watermonster daadwerkelijk coliformen bevat, worden de gele kolonies me behulp van een aanvullende test bevestigd.

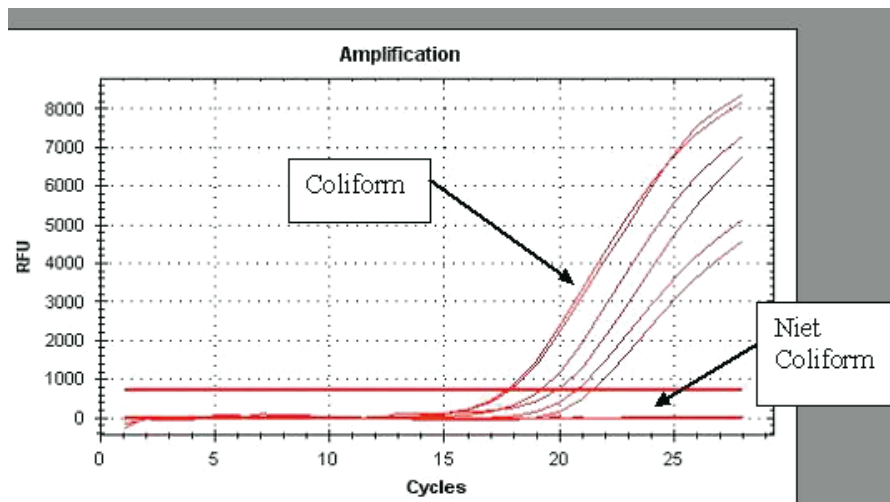


vermenigvuldiging wordt door PCR-software gemeten en uitgezet in een grafiek (zie afbeelding 1). Bij het ontwikkelen van een actuele PCR voor coliformen is het noodzakelijk om een genetische marker te vinden welke uniek is voor coliformen. Daarnaast moet deze genetische marker voor het ontwerpen van een PCR voldoen aan criteria, zoals de lengte van de DNA-sequentie en de nucleotide samenstelling. Een instrument voor het vinden van genetische markers is een Alignment-studie. Hiermee worden de nucleotide volgordes van een bepaald type gen die in bacteriesoorten voorkomen, met elkaar vergeleken. Het type gen dat voor dit onderzoek is gekozen, is het bacterie-specifieke 16s rRNA-gen⁴. Hiervan zijn van vele bacteriesoorten de nucleotide volgordes reeds gepubliceerd.

De nucleotide volgordes zijn gearchiveerd in een online genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) en kunnen door onderzoekers gebruikt worden voor bijvoorbeeld Alignment-studies. Hiervoor zijn vanuit de genbank van alle geslachten van de coliformengroep en enkele niet-coliformgeslachten, de 16s rRNA DNA-sequenties verzameld. Deze zijn met elkaar vergeleken met behulp van CLUSTALW Alignment-software. CLUSTALW rangschikt de geselecteerde 16s rRNA-sequenties, waarna snel duidelijk wordt welke genetische markers coliformspecifiek zijn. Uit dit onderzoek blijkt dat één DNA-fragment geschikt is als marker voor coliformen. Van deze marker is een actuele coliformen PCR ontwikkeld, welke is getest op coliforme en niet-coliforme bacteriën, zoals *Aeromonas*. Uit dit onderzoek blijken de actuele coliformen PCR goed te functioneren (zie afbeelding 1 voor de toelichting op de resultaten).

Interne validatie

De actuele coliformen PCR blijkt vanuit functioneel oogpunt goed te werken. De volgende stap is het vaststellen van de prestatiekenmerken van deze methode. Als referentiemethode wordt de oxidasetest gebruikt^{3,4}. Als eerste is de inclusief/exclusiefstest uitgevoerd. Hiermee zijn (103) referentiestammen getest met beide bevestigings-



Afb 1: Weergave van de resultaten van de actuele coliformen PCR. Het principe is dat een uniek stukje DNA (genetische marker) wordt vermeerderd, waarbij tijdens de vermeerdering een fluorescente probe vrij komt. Dit vrijkomen wordt gemeten door een PCR-module. De software zet dit signaal uit in een curve. Wanneer het unieke stukje DNA afwezig is, vindt geen vrijgave van een fluorescente probe plaats. Het PCR-systeem meet bij deze situaties geen signaal en er wordt geen curve gegenereerd; het resultaat is hierbij coliform negatief. De grafiek geeft het resultaat van de testen weer, waarbij de geteste coliformenspecies een positieve curve genereren en de niet-coliformenspecies geen curve.

methodes. Referentiestammen zijn bacteriecultures uit cultuurcollecties zoals ATCC en NTTC. De keuze van soorten referentiestammen is deels gebaseerd op een inventarisatie van coliformen die in 2008 vanuit drinkwatermonsters zijn geïsoleerd en geïdentificeerd. Uiteindelijk zijn 65 coliformgerelateerde en 38 niet-coliformgerelateerde referentiestammen getest. De resultaten van beide bevestigingsmethodes op deze referentiestammen zijn vervolgens met elkaar vergeleken. Naast de inclusief/exclusiefstest zijn in 2009 577 verschillende verdachte coliformen getest op beide bevestigingstechnieken. Ook hierbij zijn de resultaten van beide bevestigingsmethodes met elkaar vergeleken en vervolgens getoetst aan de eisen die zijn gesteld voor kwalitatieve analyses in ISO 16140⁵. De resultaten van deze interne validatie staan in de tabellen 1a en 1b.

Conclusies en aanbevelingen

Na het vaststellen van de prestatie-

kenmerken is de conclusie dat tussen bevestiging met de actuele coliformen PCR en de oxidasetest relatief weinig verschillen zijn gevonden. Dit blijkt onder andere uit de inclusief/exclusiefstest, waarbij van de 104 geteste referentiestammen er slechts twee soorten (*Salmonella* en *Proteus*) zijn met een verschil in bevestigingsresultaat; bij de actuele coliformen PCR zijn deze species (coliform) negatief en bij de oxidasetest (coliform) positief. Maar *Salmonella* en *Proteus* behoren niet tot de coliformengroep^{6,7}. Bij de kweek op LSA worden deze twee soorten als coliformnegatief beoordeeld, omdat deze species geen karakteristieke gele kolonies vormen. Ook bij het bevestigen van de 577 coliformverdachte kolonies zijn er slechts 16 verschillen tussen de onderlinge bevestigingsresultaten gevonden. Omgerekend betekent dat meer dan 97 procent van de onderlinge bevestigingsresultaten overeenkomstig zijn.

Voor het aantonen van de gelijkwaardigheid van twee verschillende analysemethoden zijn de in ISO 17994 beschreven richtlijnen gebruikt. Deze beschrijven dat vanuit een vergelijkingsstudie een χ^2 moet worden berekend. Bij gelijkwaardigheid van beide analysemethoden moet $\chi^2 < 4$ zijn⁸. De in dit onderzoek berekende χ^2 -waarde is 0,4. Dit betekent dat aan de hand van dit onderzoek de actuele coliformen PCR gelijkwaardig is ten opzichte van de oxidasetest.

Het grote voordeel van de actuele PCR-methode ten opzichte van de oxidasetest is vooral snelheid. Bij het gebruik van de actuele coliformen PCR als bevestigingsmethode wordt een tijdsbesparing van 16 uur gehaald. Daarnaast is de methode relatief eenvoudig uit te voeren (zie voor de werkwijze afbeelding 2). Samen met de bevindingen van de interne validatie heeft dit ertoe geleid dat de oxidasetest nu vervangen is door de actuele coliformen PCR.

Tabel 1a: De resultaten van de interne validatie van 577 verschillende coliformen en niet-coliformen, waarbij de twee bevestigingsmethodes met elkaar zijn vergeleken.

variabele	'n' getest stammen
resultaat PCR/oxidasetest overeenkomstig bij coliformpositieve uitslag	393
resultaat PCR/oxidasetest overeenkomstig bij coliformnegatieve uitslag	168
resultaat bij PCR coliformpositief, oxidasetest coliformnegatief	4
resultaat bij PCR coliformnegatief, oxidasetest coliformpositief	12
totaal aantal species getest	577

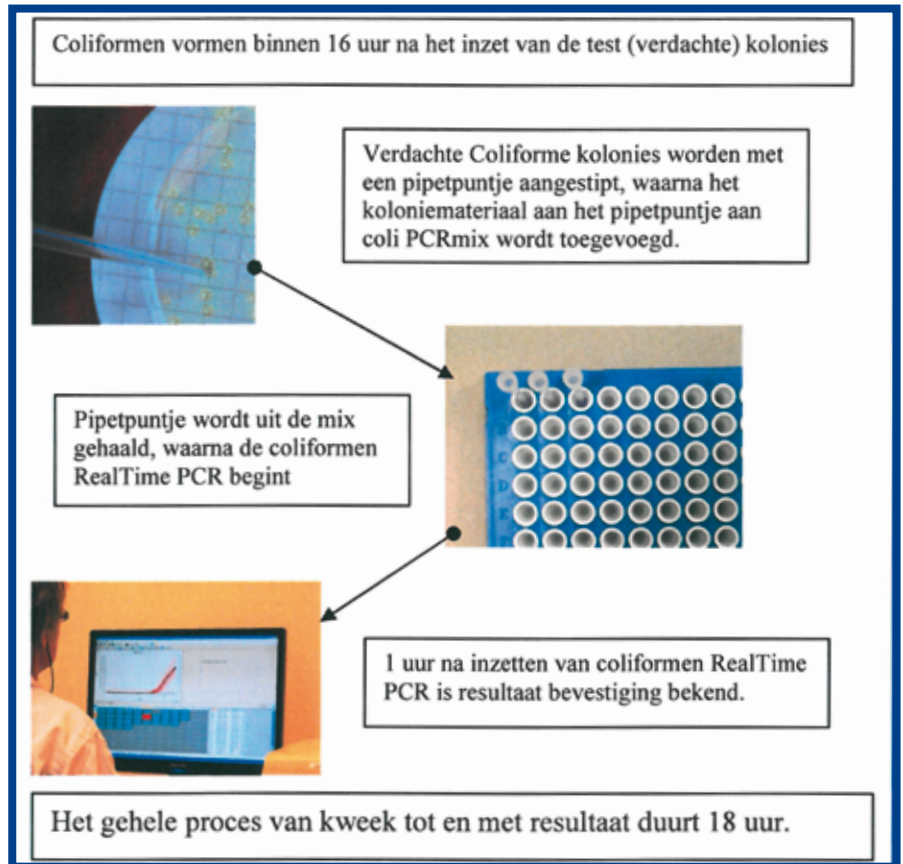
Tabel 1b: Vanuit de resultaten in tabel 1a zijn de ISO 16140 beschreven prestatiekenmerken berekend.

prestatiekenmerk	gevonden percentage	percentage minimale eis
relatieve juistheid (ISO 16140)	97,2%	>95%
relatieve specificiteit (ISO 16140)	97,7%	>95%
relatieve gevoeligheid (ISO 16140)	96,8%	>95%

Een positief gevolg hiervan is dat het drinkwaterbedrijf snel duidelijkheid heeft omtrent de aanwezigheid van coliformen. Hierdoor kan het sneller ingrijpen zodra sprake is van aanwezigheid van coliformen in de drinkwaterketen.

LITERATUUR

- 1) Edberg S. et al. (2000). *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. Journal of Applied Microbiology 88, pag. 1065-1165.
- 2) WHO (1993). Guidelines for drinking water quality, volume 1: recommendations. Second edition.
- 3) ISO (2000). ISO-9308-1 2e edition. Water quality - The detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - part 1; membrane filtration method.
- 4) Yarza P. et al. (2008). The all-species living tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. Systematic and Applied Microbiology 31, deel 4, pag. 241-250.
- 5) ISO (2003). ISO 16140 First edition. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods.
- 6) Barrel R. et al. (2002). The microbiology of drinking water. Hoofdstuk 2.4 - deel 1 - Water quality and public health. Department of the Environment.
- 7) Holt J. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology, hoofdstuk 5, 9e editie. Williams & Wilkins, Baltimore.
- 8) ISO (2004). ISO 17994. Water quality - Criteria for establishing equivalence between microbiological methods.



Afb 2: Werkwijze van de coliformen PCR. Coliformenverdachte kolonies worden binnen twee uur bevestigd.

advertentie

Dit is de toekomst van watertechnologie

Watercampus Leeuwarden

KIJK
dat is 't mooie van LEEUWARDEN

Zuiver water binnen handbereik. Het lijkt zo vanzelfsprekend, maar het is dé uitdaging voor de toekomst. De beschikbaarheid van zoet water staat wereldwijd onder druk terwijl de waterbehoefte explosief groeit. Dit vraagt in de hele watersector om innovatieve oplossingen en nieuwe technieken.

De Watercampus Leeuwarden neemt hierin het voortouw. Wetenschappers uit alle delen van de wereld doen op de Watercampus onderzoek naar oplossingen op het gebied van o.a. drinkwaterproductie en afvalwaterzuivering.

De Watercampus biedt bedrijven, kennisinstututen en onderwijsinstellingen alle voorwaarden om kennis te bundelen en innovatie mogelijk te maken. Hiermee is Leeuwarden hard op weg om de Europese hoofdstad van watertechnologie te worden.

Meer informatie?
Kijk op www.wetsus.nl of www.wateralliance.nl

GIET UW WERFING VOOR OPLEIDING & PERSONEEL IN HET JUISTE VAT

Reserveer ook uw personeelsadvertentie in H₂O, hét tijdschrift voor watervoorziening en waterbeheer.

010 - 4274180