



KWR 2016.076 | September 2016

Snelle on-line detectie van Enterococcen



Snelle on-line detectie van Enterococcen

KWR 2016.076 | September 2016

Opdrachtnummer

400978

Projectmanager

Ton van Leerdam

Opdrachtgever

TKI project

Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

Auteur

Nikki van Bel

Verzonden aan

Joep Appels (microLAN), Marije Ijszenga (Vitens), Eric
Penders (HWL), Jaap van den Dries (microLAN)

Deze activiteit is mede gefinancierd uit de Toeslag voor Topconsortia voor Kennis en
Innovatie (TKI's) van het ministerie van Economische Zaken.

Jaar van publicatie
2016

Meer informatie

dr. Nikki van Bel
T 030-6069516
E Nikki.van.Bel@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl



KWR 2016.076 | September 2016 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

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

Inhoud

1	Introductie	4
2	Resultaten	5
2.1	Optimale pH buffer	5
2.2	β -glucosidase ijklijn	6
2.3	Drinkwater	6
2.4	Oppervlaktewater	8
2.5	Reproduceerbaarheid	11
2.6	Detectiegrens	11
3	Conclusies	13
4	Discussie	14
5	Vervolgtraject	15
5.1	Onderzoek van KWR:	15
5.2	Onderzoek van partners:	15
5.3	TKI subsidie 2017	15

1 Introductie

Wereldwijd is fecale verontreiniging de belangrijkste bedreiging van de gezondheid via water. De belangrijkste parameters voor de bewaking van de drink- en zwemwaterkwaliteit op microbiologische veiligheid zijn *Escherichia coli* en *enterococcen*. Deze parameters zijn daarom ook in de wetgeving opgenomen. Drink- en zwemwater wordt onderzocht op *E. coli* en *enterococcen* met kweekmethoden die 1 dag, respectievelijk 2 dagen, duren. Vanwege deze lange wachttijden heeft de waterleidingsector de wens om snelle methoden te hebben om fecale verontreiniging op te sporen. Die behoefte is vooral gevoeld door (i) de wens voor een snelle detectie van een besmetting als gevolg van bijv. leidingbreuken of geplande werkzaamheden, (ii) de nadelen van de lange wachttijden na werkzaamheden in het net voordat leidingsecties weer kunnen worden vrijgegeven en (iii) het willen monitoren of bij besmettingen beheersmaatregelen effectief zijn.

Zoals bovenstaand aangegeven worden de lange wachttijden veroorzaakt door de huidige microbiologische meetmethoden. Intussen zijn er snelle methoden voor *E. coli* ontwikkeld. Echter worden ze nog beperkt ingezet omdat voor *enterococcen* nog geen snelle methode beschikbaar is en daarmee de inzet van de snelle *E. coli* bepaling niet kostenbesparend is voor waterbedrijven. Een van de snelle methoden voor *E. coli* is de BACTcontrol van microLAN. *E. coli* wordt gedetecteerd door middel van fluorescentie die optreedt als gevolg van de omzetting van een fluorogeen substraat voor het enzym β -D-glucuronidase, dat voorkomt in vrijwel alle *E. coli*. Deze methode is geautomatiseerd, snel, gevoelig en betrouwbaar.

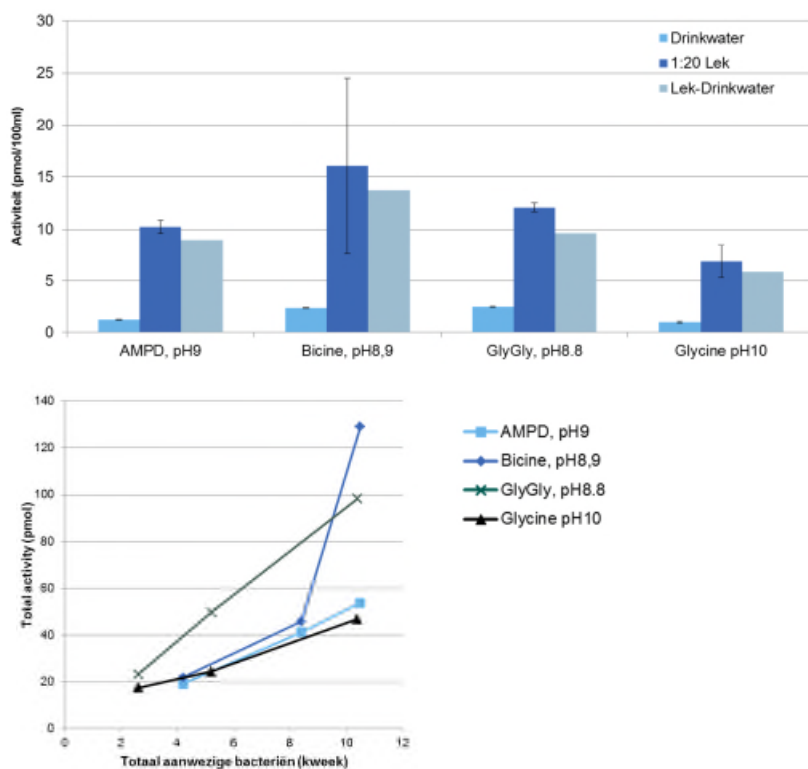
De opzet van het huidige TKI project is een vergelijkbare detectiemethode te ontwikkelen en te testen voor *enterococcen*, die het enzym β -D-glucosidase bevatten. Deze enzymreactie wordt al toegepast in kweekmedia (zie EPA methode 1600: Chromocult Enterococci agar, and mEI agar) en in commerciële testkits, zoals Enterolert, en is dus in principe geschikt.

Dit project beoogt de enzym-gebaseerde methode toepasbaar te maken binnen de on-line optische detectie – met voldoende snelheid, gevoeligheid en betrouwbaarheid – in de BACTcontrol. De specificaties van de analyse zullen worden gebruikt als basis voor de afweging voor het gebruik van on-line bepalingen van *enterococcen* en/of *E.coli*.

2 Resultaten

2.1 Optimale pH buffer

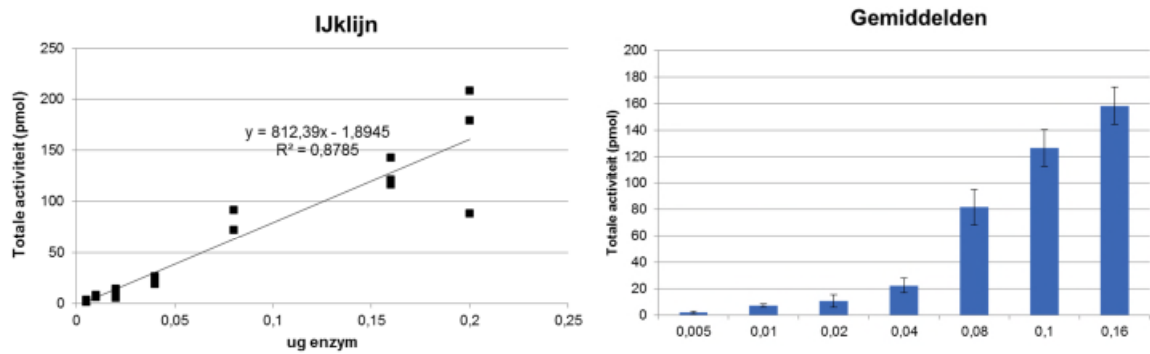
De optimale pH van het β -glucosidase enzym (pH 9,1; *enterococcen*) ligt hoger dan die van β -glucuronidase (pH 6,9; *E. coli*) en lager dan die Alkaline Phosphatase (pH 10; Total Activity). Om deze reden zijn drie buffers getest met een pH rond de 9 (Figuur 1). Hieruit bleek dat de GlyGly-buffer met pH8,8 de beste resultaten gaf. De resultaten zijn goed reproduceerbaar, geven een goede dosis-respons relatie en een ijklijn gemaakt met zuiver β -glucosidase enzym geeft een hoger signaal vergeleken met de andere buffers (laatste niet getoond). De activiteit op Tull en 't Waal drinkwater is licht hoger vergeleken met de andere buffers, maar het verschil tussen drinkwater en Lekkanaalwater bij deze buffer is het hoogst. Met de GlyGly pH8,8 buffer zijn alle hierna volgende experimenten uitgevoerd.



FIGUUR 1. TEST VAN BUFFERS MET EEN PH VAN ONGEVEER 9 IN DE BACTCONTROL. IN DE LINKERGRAFIEK IS VAN ÉÉN OPPERVLAKTEWATERMONSTER (LEKKANAAL) MET ELKE BUFFER DRIE VOLUMES GEMETEN. DOOR HET FILTEREN VAN DRIE VERSCHILLENDE VOLUMES KAN EEN DOSIS-RESPONS RELATIE WORDEN VASTGESTELD. IN DE RECHTERGRAFIEK IS VAN DRINKWATER EN LEKKANAALWATER (1:20 VERDUND IN DRINKWATER) DRIE MAAL HETZELFDE VOLUME GETEST IN DE BACTCONTROL. HIERVAN IS HET GEMIDDELDE BEPAALD EN IS DE STANDAARDDEVIATIE BEREKEND.

2.2 β -glucosidase ijklijn

Een ijklijn gemaakt van zuiver β -glucosidase enzym, verdund in gesteriliseerd drinkwater met buffer, laat zien dat enzymactiviteit reproduceerbaar en met een goede dosis-respons relatie wordt gemeten (Figuur 2). Bij 0,1 μg enzym komt de gemeten enzymactiviteit (8,21 pmol) boven de achtergrondruis van het drinkwatersignaal uit (2 - 4 pmol voor Tull en 't Waal water).

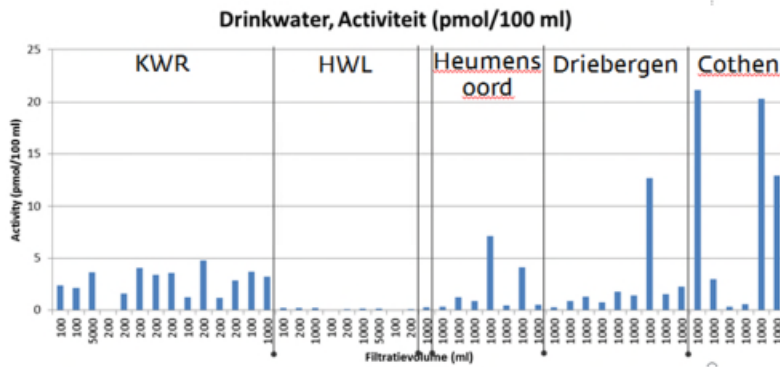


FIGUUR 2. β -GLUCOSIDASE IJKLIJN. VAN ELKE CONCENTRATIE (IN μg ENZYM) ZIJN 2 OF 3 METINGEN GEDAAN. VANWEGE MOGELIJK SNEL VERVAL VAN HET ENZYM IN EEN DRINKWATERMILIEU, IS VOOR ELKE METING EEN NIEUWE VERDUNNING GEMAAKT WAT DE SPREIDING IN DE RESULTATEN VERKLAART.

2.3 Drinkwater

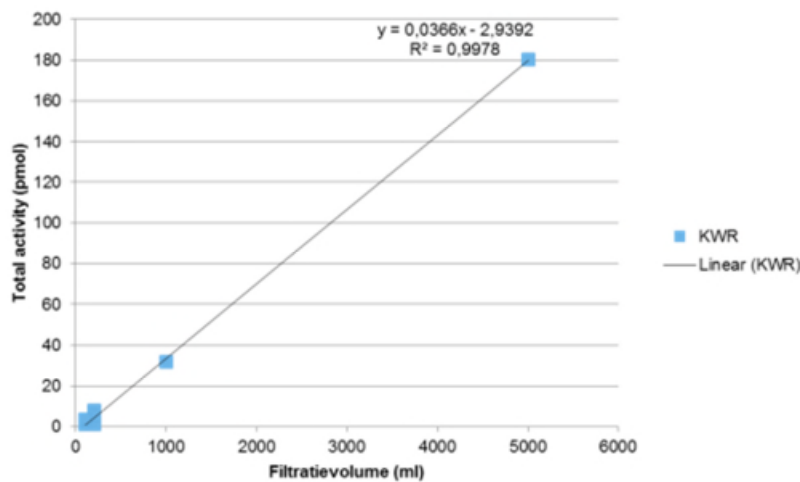
Door drie laboratoria zijn metingen uitgevoerd op drinkwater en/of oppervlaktewater (Figuur 3). De resultaten van het drinkwater zijn voor KWR en HWL stabiel en liggen op 1,15 - 4,74 pmol/100 ml en 0,06 - 0,24 pmol/100 ml, respectievelijk. De waarden van het Haarlemse drinkwater van HWL liggen 20x lager vergeleken met Tull en 't Waal water van KWR. De reden hiervoor is onbekend. Het laat duidelijk zien dat de verschillende soorten drinkwater andere resultaten geven in de BACTcontrol. Het is daarom belangrijk om het basissignaal van schoon drinkwater goed te leren kennen, om vervolgens mogelijke pieken in enzymactiviteit en dus verontreinigingen te identificeren.

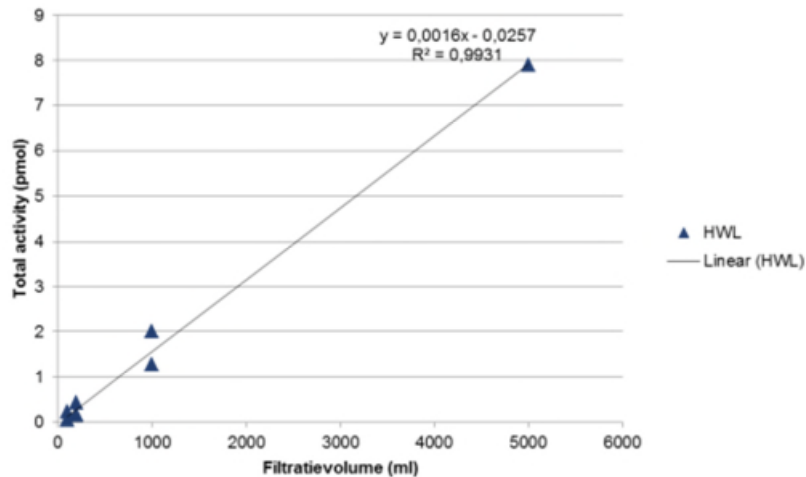
De drinkwatermonsters van Vitens zijn genomen bij calamiteiten en werkzaamheden in het distributiesysteem. De watermonsters zijn afkomstig van verschillende locaties en bleken na de conventionele analyse met kweek negatief voor de aanwezigheid van *enterococcen*. De enzymactiviteit van deze monsters varieert meer en er zijn enkele pieken gemeten. Deze pieken suggereren dat er op dat moment *enterococcen* aanwezig waren in het water, terwijl dit niet naar voren komt uit kweekresultaten en (indien uitgevoerd) de RT-PCR analyse. Een mogelijke oorzaak van de pieken zou kunnen zijn dat het water troebeler is, wat de meting verstoort. De blanco-meting (het achtergrond- of ruissignaal van het water) zou hiervoor moeten corrigeren, maar mogelijk kunnen de versturende factoren niet door het 0,45 μm filter heen waardoor de echte meting van het drinkwater ongunstiger uitvalt. Een andere mogelijkheid is dat er *enterococcen* aanwezig zijn, maar dat deze niet zijn gedetecteerd met de andere technieken.



FIGUUR 3. METINGEN OP DRINKWATER. GEGEVEN IS DE ENZYMACTIVITEIT PER 100 ML. DE METINGEN ZIJN GECLUSTERD PER LABORATORIUM (KWR: TULL EN 'T WAAL DRINKWATER, HWL: HAARLEMS DRINKWATER) EN PER PRODUCTIEBEDRIJF VOOR VITENS (HEUMENSOORD, DRIEBERGEN, COTHEN). DEZE LAATSTE MONSTERS ZIJN ZOWEL AF POMPSTATION ALS IN HET DISTRIBUTIENET GENOMEN.

Belangrijk is dat bij de metingen van de enzymactiviteit van drinkwater de activiteit per 100 ml wordt geanalyseerd, aangezien het gemeten signaal stijgt met het filtratievolume (Figuur 4). Wanneer deze waarden teruggerekend worden naar de activiteit per 100 ml, geeft dat een betrouwbare, lage waarde (zoals weergegeven in Figuur 3 voor KWR en HWL).

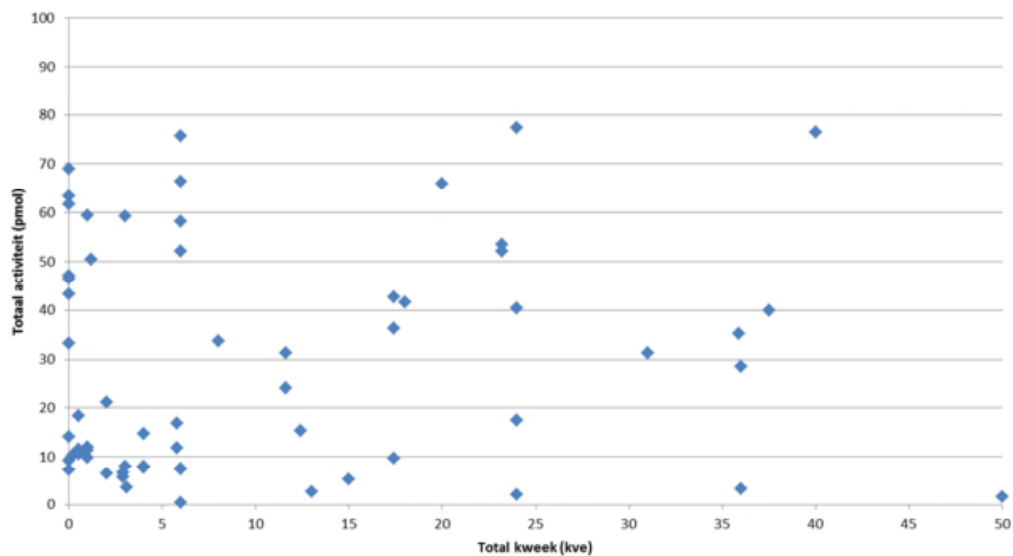




FIGUUR 4. EFFECT VAN GROOT VOLUME FILTRATIE VAN TULL EN 'T WAAL (KWR, LINKS) EN HAARLEMS DRINKWATER (HWL, RECHTS).

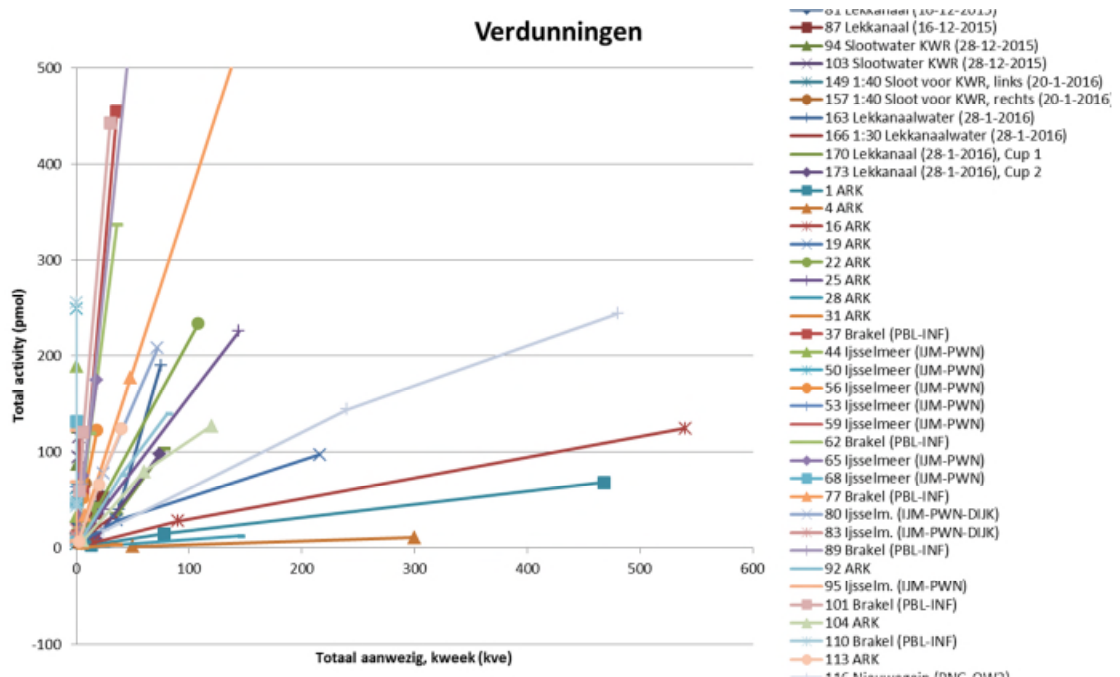
2.4 Oppervlaktewater

In totaal zijn door KWR en HWL 110 metingen op (verdund) oppervlaktewater uitgevoerd. Hierbij zijn 7 locaties bemonsterd en zijn meerdere volumes geanalyseerd. Er is geen correlatie wanneer alle resultaten tegelijk worden geanalyseerd en er geen rekening wordt gehouden met b.v. locatie of een andere parameter (Figuur 5).



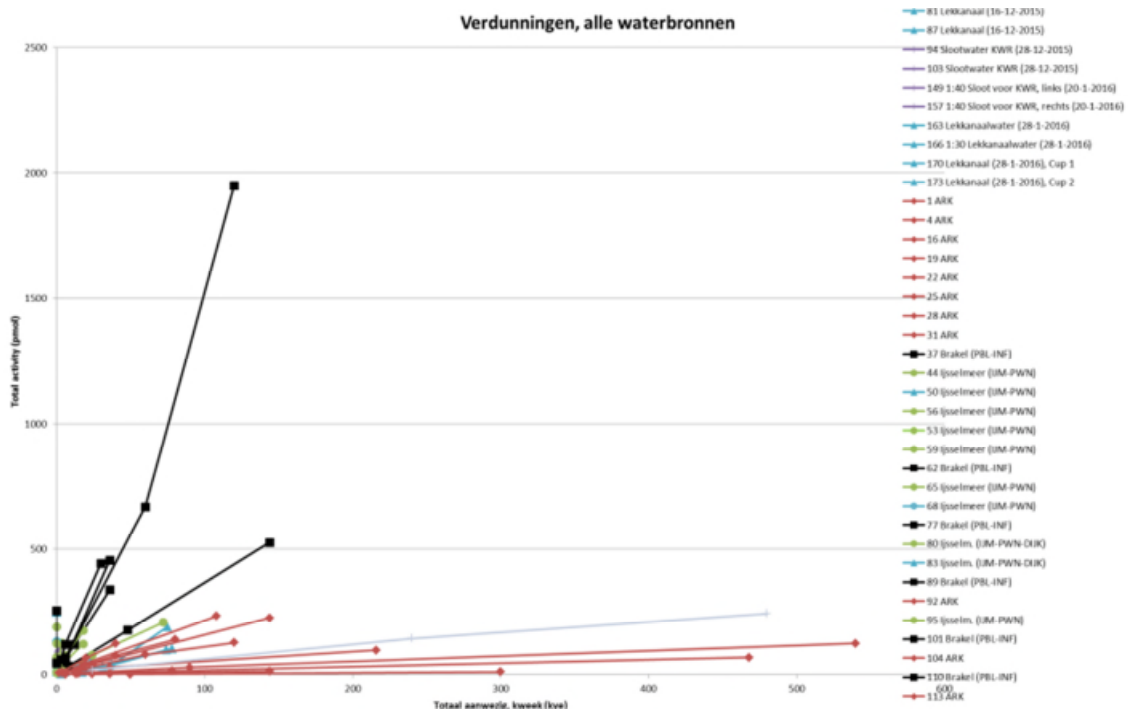
FIGUUR 5. ALLE METINGEN (1 10X) VAN (VERDUND) OPPERVLAKTEWATER IN DE BACTCONTROL TEN OPZICHTE VAN DE KWEKRESULTATEN.

Het meten van drie verdunningen per oppervlaktewatermonster laat wel een goede dosis-respons curve zien per watermonster, ongeacht de locatie (Figuur 6). Het verschil in aanwezigheid van *enterococcen* tussen de verschillende verdunningen of filtratievolumes per watermonster is sterk gecorreleerd met de gemeten enzymactiviteit. Echter, deze kweek-activiteit verhouding is niet gelijk tussen de verschillende watermonsters.



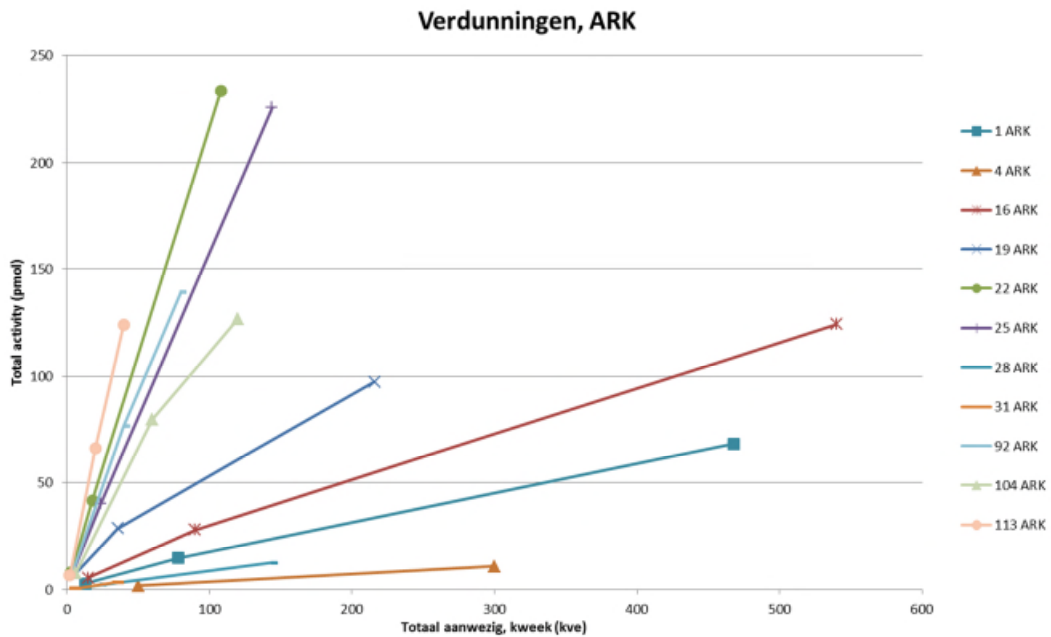
FIGUUR 6. DOSIS-RESPONS RELATIE VAN ALLE METINGEN, GEGEVEN IS HET TOTAAL AANWEZIGE AANTAL ENTEROCOCCEN MET DE ENZYMACTIVITEIT VOOR ALLE WATERMONSTERS

Indien bovenstaande resultaten worden geclusterd per monsternamelocatie, is de spreiding minder, maar nog steeds aanwezig (Figuur 7).



FIGUUR 7.DOSIS-RESPONS RELATIE VAN ALLE METINGEN, GECLUSTERD PER OPPERVLAKTEWATERLOCATIE.

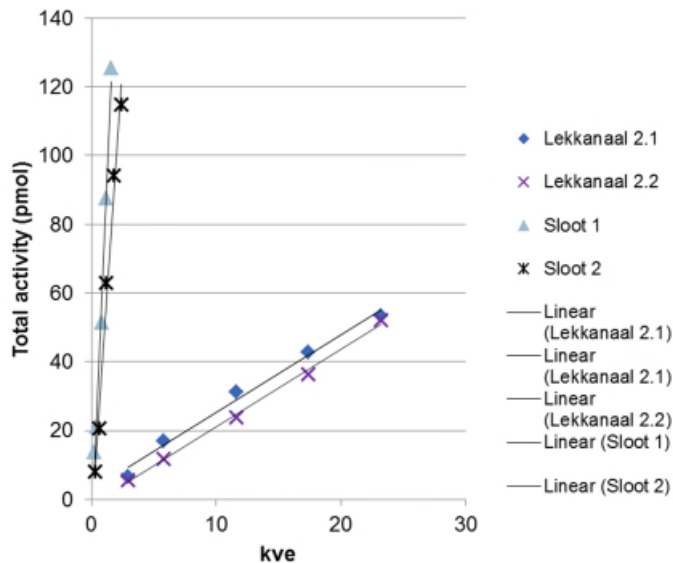
Als voorbeeld zijn voor het Amsterdam-Rijn Kanaal (ARK) de individuele meetreeksen weergegeven (Figuur 8). De spreiding is minder, maar nog steeds te groot. Mogelijk is er in deze spreiding wel een verband zichtbaar tussen het moment van monsternamen: de eerste metingen (1/4/16/19 ARK) en latere metingen (25/92/104/113 ARK) lijken te clusteren, maar uitzonderingen hierop zijn er wel.



FIGUUR 8.DOSIS-RESPONS RELATIE VAN ALLE WATERMONSTERS UIT HET AMSTERDAM-RIJN KANAAL.

2.5 Reproduceerbaarheid

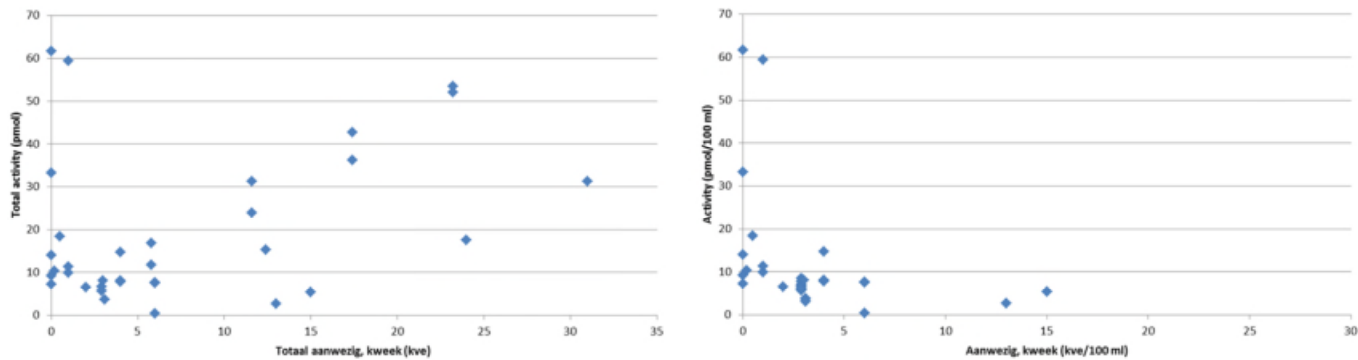
Om de reproduceerbaarheid van de metingen te bepalen is, in aanvulling op de dubbele metingen van de ijklijn, van twee oppervlaktewatermonsters hetzelfde water twee maal gemeten (Figuur 9). Dit bevestigt het beeld zoals verkregen met de ijklijn, dat de metingen van hetzelfde water goed overeenkomen. De kleine verschillen worden veroorzaakt doordat het water bij de tweede meting 12-24 uur ouder is vergeleken met de eerdere meting en er dus verval kan zijn opgetreden.



FIGUUR 9. TWEE METINGEN VAN TWEE OPPERVLAKTEWATERMONSTERS OM DE REPRODUCEERBAARHEID VAN DE METHODE TE BEPALEN.

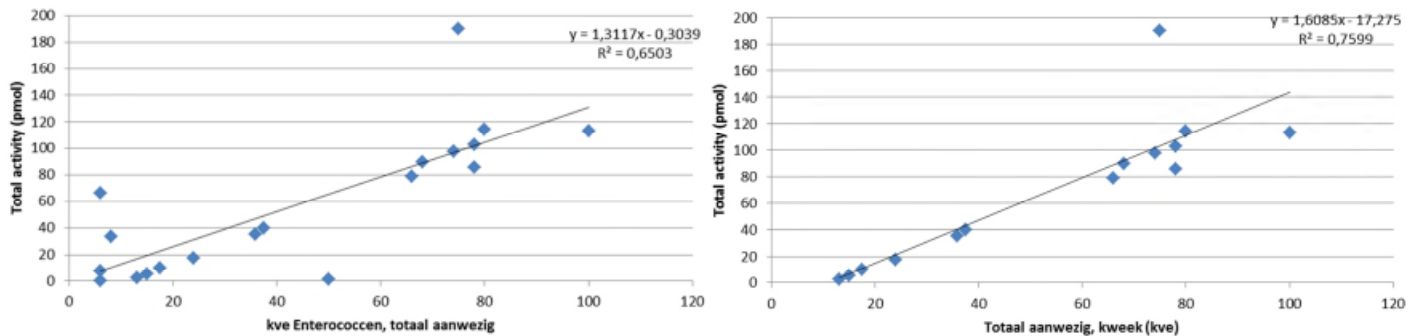
2.6 Detectiegrens

In Figuur 10 worden alleen de metingen getoond waarvan het aantal kve op kweek lager ligt dan 15 kve/100ml, om zo de detectiegrens te kunnen bepalen. Echter, door de grote mate van variatie bij deze lage concentraties, kan de detectiegrens nog niet worden bepaald. Een aantal watermonsters geeft een zeer hoge enzymactiviteit bij lage aantallen op kweek, tevens is er geen (lineaire) correlatie aanwezig tussen de enzymactiviteit en de kweekresultaten bij lagere concentraties.



FIGUUR 10. WATERMONSTERS MET LAGE CONCENTRATIE KWEKBARE ENTEROCOCCEN (< 15 KVE/100 ML). LINKS HET TOTAAL AANWEZIG AANTAL ENTEROCOCCEN TEN OP ZICHTEN VAN DE TOTALE ACTIVITEIT. RECHTS HET AANTAL ENTEROCOCCEN EN ENZYMACTIVITEIT PER 100 ML.

Bij hogere concentraties is er wel een lineaire correlatie tussen het totale aantal *enterococcen* op kweek en de totale gemeten enzymactiviteit (Figuur 11). Deze correlatie is zichtbaar voor watermonsters waarin in totaal > 5 kve aanwezig zijn. Echter de punten tussen de 5 en 10 kve vertonen nog vrij veel spreiding, waardoor vanaf 10 kve de beste correlatie zichtbaar is.



FIGUUR 11. LINEAIRE CORRELATIE TUSSEN TOTAAL AANTAL AANWEZIGE, KWEKBARE, ENTEROCOCCEN EN DE GEMETEN ENZYMACTIVITEIT IN DE BACTCONTROL. LINKS ZIJN DE WATERMONSTERS MEEGENOMEN MET EEN ENTEROCOCCENGEHALTE > 5 KVE, RECHTS LIGT DEZE GRENS OP > 10 KVE.

3 Conclusies

De BACTcontrol meet β -glucosidase enzymactiviteit. Het gedoseerde substraat, 4-MU- β -D-glucoside, wordt omgezet waarbij een fluorescente groep vrij komt. Dit fluorescente molecuul wordt gedetecteerd door de BACTcontrol.

De metingen van de BACTcontrol zijn reproduceerbaar, zowel op drinkwater met daarin het verdunde β -glucosidase enzym, als op oppervlaktewatermonsters.

Er is een goede dosis-respons relatie tussen het aantal aanwezige *enterococcen* en de enzymactiviteit binnen één watermonster. De verhouding tussen kweek en enzymactiviteit is ook gelijk binnen één watermonster. Deze verhouding verschilt echter sterk tussen de watermonsters, maar is kleiner bij watermonsters die op dezelfde locatie zijn genomen. De watermatrix speelt dus een belangrijke, maar nog onbekende, rol in de enzymmetingen.

Bij *enterococcen* gehalten boven 10 kve is er een sterke lineaire correlatie tussen de totale enzymactiviteit en het totale aantal *enterococcen* op kweek. Bij lagere concentraties is er geen verband tussen beiden. De detectiegrens ligt om die reden op een totale hoeveelheid van 10 kve *enterococcen* in het watermonster.

Enzymactiviteit van drinkwater van KWR en HWL is constant laag, maar er is een groot verschil tussen beide signalen. De analyses op drinkwater bij calamiteiten door Vitens laten pieken in de activiteit zien. De activiteit van het drinkwater hangt samen met locatie. Hierdoor is het belangrijk om het eigen (drink)water goed te leren kennen alvorens de BACTcontrol in te zetten om verontreinigingen op te sporen.

4 Discussie

Het meetprincipe van de BACTcontrol voor *enterococcen* is aangetoond, maar de resultaten zijn nog niet sterk genoeg om hier een H2O-artikel van te kunnen schrijven. Voorstel is om in een vervolg TKI-project een aantal openliggende onderzoeksvragen te beantwoorden en om extra (on-line) metingen van de BACTcontrol uit te voeren. On-line metingen zijn uiteindelijk de omstandigheden waarvoor de BACTcontrol is gemaakt. Met deze extra metingen kan aangetoond worden dat de BACTcontrol voor *enterococcen* hier geschikt voor is. De mogelijke toepassingen van de BACTcontrol worden zo duidelijk.

Om de BACTcontrol toe te passen in de praktijk is het belangrijk om het basissignaal van het water te leren kennen. Dit geldt voor drinkwater en oppervlaktewater. Voor oppervlaktewater zal in de beginperiode de BACTcontrol met de kweek (en indien gewenst andere methoden) moeten worden vergeleken, zodat de verhouding tussen kweek en enzymactiviteit bekend is. Voor toepassing op drinkwater moet eerst duidelijk zijn dat het basissignaal constant en laag is. Indien dit het geval is, is detectie van zwaardere verontreinigingen (5-10 kve) mogelijk.

Detectiegrens en lineaire relatie vanaf 10 kve is goed genoeg voor zwemwaterkwaliteit of andere oppervlaktewaters.

In overleg met de partners is besloten om de hierboven beschreven resultaten nog niet te publiceren in een vakblad als H2O, ondanks het innovatieve karakter van het on-line meten van *enterococcen*. Er is de behoefte om eerst extra onderzoek en on-line metingen uit te voeren zodat op basis hiervan een artikel met een stevigere onderbouwing geschreven kan worden. Dit additionele onderzoek zal, indien gehonoreerd, ondergebracht worden in een nieuw te vormen TKI-project.

5 Vervolgtraject

De intentie is om het onderzoek voort te zetten in een nieuw TKI-project. Hiervoor zal Nikki samen met Gertjan het projectvoorstel schrijven en vervolgens voorleggen aan de huidige partners en de TKI programmaraad bij KWR. Mogelijke nieuwe partners, zoals bekend bij Joep Appels, zijn: Waternet, waterschap De Dommel, Brabant Water. Andere opties zijn: Rijkswaterstaat, Waterschappen, Hoogheemraadschap Rijnlanden, Aqualab Zuid (via Brabant Water) en WLN (Vitens).

Besproken is om het vervolgproject als volgt vorm te geven.

5.1 Onderzoek van KWR

- Effect van watermatrix bepalen: verandering van het effect van de watermatrix op één locatie in de tijd.
- Drinkwater meten en meerdere soorten oppervlaktewater en aantallen (natuurlijke) *enterococcen* introduceren. Welk soort respons is er bij verschillende watertype en aantallen *enterococcen* te verwachten?
- Verlagen van de detectiegrens.
- Wordt de celwand van *enterococcen* wel goed kapotgemaakt door de buffer zodat het substraat het (vrijgekomen) enzym bereikt? Kort testen met sonicatie, lysozyme-behandeling, en mogelijke andere opties.
- Helpt het om na filtratie van het watermonster de reactiekamer door te spoelen met drinkwater of demiwater, waardoor het matrix effect verdwijnt. Onduidelijk of dit op het moment technisch mogelijk is.
- On-line meten op Lekkanaal, watermatrix-drift, wat voor signalen krijg je in één matrix?

5.2 Onderzoek van partners

On-line valideren van de BACTcontrol op drinkwater, zwemwater en oppervlaktewater. microLAN stelt hiervoor 2-3 apparaten ter beschikking.

Doel is om continu het water te meten en zo fluctuaties in het oppervlaktewater en veranderingen in de watermatrix te kunnen monitoren. Een deel van de on-line metingen wordt vergeleken met de conventionele kweekmethode.

Tevens wordt een BACTcontrol on-line op een drinkwaterleiding gezet waar vaker calamiteiten voorkomen (locatie Vitens). Hiermee zal het basissignaal van het drinkwater worden bepaald en tevens mogelijke calamiteiten gedetecteerd.

5.3 TKI subsidie 2017

In overleg met Paul van der Wielen (KWR), Gertjan Medema en Joep Appels is afgesproken om dit vervolgproject te combineren met een ander project waarin de BACTcontrol is betrokken. In dit project (verantwoordelijk onderzoeker: Paul van der Wielen) wordt verder onderzoek gedaan naar de Total Activity analyse van de BACTcontrol. De inschatting is dat de kans dat het projectvoorstel, met daarin beide projecten, gehonoreerd wordt hoger is vergeleken met wanneer beide projecten afzonderlijk van elkaar worden ingediend. Dit betekent trouwens niet dat toekomstige partners automatisch in beide projecten participeren, er kan gekozen worden om aan één van de twee projecten mee te doen.