



BTO 2018.043 | Mei 2018

BTO rapport

Groei en overleving van
bacteriën van de
coligroep in water en
filtermateriaal uit ps.
Bergen

BTO

Groei en overleving van bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal uit ps. Bergen

BTO 2018.043 | Mei 2018

Opdrachtnummer

401916

Projectmanager

Luc Hornstra

Opdrachtgever

BTO - Speerpuntonderzoek

Kwaliteitsborger

Paul van der Wielen

Auteurs

Nikki van Bel, Anthony Verschoor

Verzonden aan

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

Jaar van publicatie
2018

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

Keywords
Coliformen, snel zandfilter, MALDI-TOF, nagroei

Postbus 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



Watercycle
Research
Institute

BTO 2018.043 | Mei 2018 © KWR

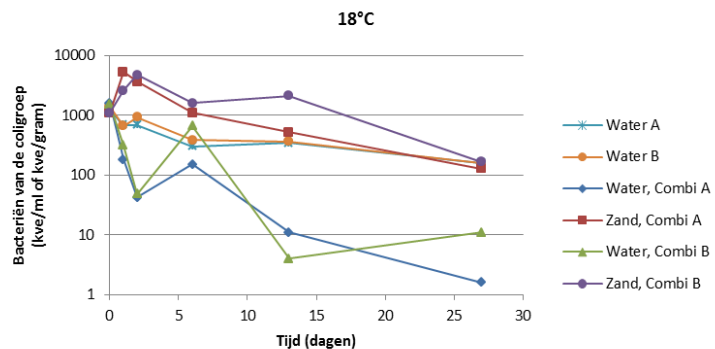
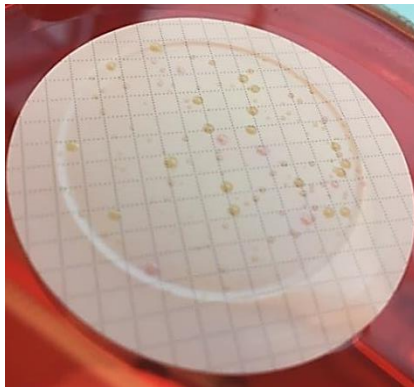
Alle rechten voorbehouden.
Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming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

BTO Managementsamenvatting

Bacteriën van de coligroep kunnen groeien en overleven in filtermateriaal van ps. Bergen

Auteurs dr. ir. Nikki van Bel, dr. ir. Anthony Verschoor, dr. Paul van der Wielen

Bij PWN worden sinds 2011 regelmatig bacteriën van de coligroep aangetroffen in grootvolumemonsters na de snelle zandfilters van pompstations Bergen en Mensink. Om te kunnen inschatten of er risico's zijn voor (fecale) besmetting is er de vraag of bacteriën van de coligroep kunnen nagroeien in de filters en waarom bacteriën van de coligroep met name in en na de filters worden aangetroffen in de zomer en nazomer. Onderzoek laat zien dat er een correlatie is tussen hogere temperaturen, of factoren die hiermee covariëren, en het aantreffen van bacteriën van de coligroep in het effluent van de zandfilters van pompstations Bergen en Mensink. Dit kan een directe correlatie zijn, maar mogelijk covarieert een andere (nog onbekende) factor met de temperatuur, zoals de hoeveelheid of het soort voedingsstoffen. Groeiproeven laten zien dat bacteriën van de coligroep beter groeien bij 18°C dan 9°C in het filtermateriaal van ps. Bergen. Deze bacteriën sterven daarna langzaam af, de afsterving is sneller bij 18°C dan bij 9°C. Dit kan verklaren waarom bacteriën van de coligroep vóórkomen in het effluent van de snelle zandfilters van ps. Bergen, met name in de zomer. Typering van de bacteriestammen in de groeiproeven laat geen duidelijke trend zien in de groei of afsterving van specifieke genera van de bacteriën van coligroep in de tijd of onder verschillende condities.



Links: LSA-agarplaat met bacteriekolonies gevormd door bacteriën van de coligroep. Verschillende koloniemorfologieën zijn zichtbaar. Rechts: groei en overleving van bacteriën van de coligroep in filtermateriaal van ps. Bergen.

Belang: toename bacteriën van de coligroep in effluent snelle zandfilters ps. Bergen en Mensink tegengaan

Sinds 2011 meet PWN op de pompstations Bergen en Mensink in grootvolumemonsters van het effluent van de snelle zandfilters in de periode van mei tot november bacteriën van de coligroep. Tot 2014 waren de aantallen in de zandfilters en het effluent terug te leiden naar de aantallen die in het onttrokken duininfiltraat aanwezig waren. Na het

treffen van een aantal maatregelen worden sinds 2015 geen bacteriën van de coligroep meer aangetroffen in het onttrokken duininfiltraat, maar treft men tussen mei en november nog wel diverse bacteriestammen van de coligroep aan in het effluent van de zandfilters. Het is mogelijk dat door de aanwezigheid van de bacteriën van de coligroep in het onttrokken duininfiltraat eventuele groei- en/of overleving van de bacteriën in de snelle zandfilters niet is opgemerkt.

Het doel van dit onderzoek is om te achterhalen of bacteriën van de coligroep in staat zijn te overleven en zich te vermeerderen in het zand van het zandfilter op ps Bergen.

Aanpak: groeiproeven met water en filtermateriaal van ps. Bergen en MALDI-TOF typering stammen

Historische gegevens van de locaties Bergen en Wim Mensink zijn geanalyseerd om mogelijke correlaties tussen de watertemperatuur en de aantallen bacteriën van de coligroep in het effluent van de zandfilters te onderzoeken.

In de zomer van 2017 heeft HWL vijf bacteriestammen van de coligroep geïsoleerd uit het effluent van de snelle zandfilters van ps. Bergen. In oktober 2017 zijn monsters genomen van het filtermateriaal en het influent van de zandfilters van de voorzuivering bij ps Bergen. Water en filtermateriaal zijn met de bacteriestammen gemengd en geïncubeerd bij 9°C en 18°C, de minimale en maximale temperatuur waarmee het onttrokken duinwater als influent in de snelle zandfilters komt. Gedurende 27 dagen is het aantal bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal bepaald en heeft HWL de bacteriën getypeerd met MALDI-TOF.

Resultaten: bacteriën van de coligroep groeien in filtermateriaal, maar niet in water van ps. Bergen

Een correlatie is gevonden tussen hogere watertemperatuur en het aantreffen van bacteriën van de coligroep in het effluent van de zandfilters bij Bergen en Mensink. Dit kan een directe correlatie zijn, maar mogelijk covarieert een andere (nog onbekende) factor met temperatuur, zoals de hoeveelheid of soort voedingsstoffen in het water.

Bacteriën van de coligroep kunnen beter groeien in het filtermateriaal van ps. Bergen bij 18°C dan bij 9°C. De afsterving verloopt langzaam, maar bij 18°C sneller dan bij 9°C, en na 27 dagen zijn er nog hoge aantallen bacteriën van de coligroep aanwezig in het filtermateriaal.

In het water sterven deze bacteriën in eerste instantie af, gevolgd door een korte groeifase. Deze groei is vermoedelijk niet op nutriënten die in het water aanwezig waren bij de start, maar op dode biomassa dat ontstaat nadat het water onder laboratoriumcondities wordt geïncubeerd.

De twee gedoseerde en met MALDI-TOF getypeerde bacteriestammen *Buttiauxella* en *Citrobacter* zijn de meest voorkomende bacteriestammen in de groeiproeven. De drie andere gedoseerde en met MALDI-TOF getypeerde stammen komen in mindere mate voor en hun vóórkomen varieert sterk met de verschillende condities en in de tijd. Dit meetresultaat wordt veroorzaakt door de lage MALDI-TOF score van deze bacteriestammen, waardoor de typering minder betrouwbaar is.

Implementatie: reinig het filtermateriaal van ps. Bergen om bacteriën van de coligroep te verwijderen.

Groei en overleving van bacteriën van de coligroep in het filtermateriaal van de zandfilters van ps. Bergen kan een oorzaak zijn van de toenemende aantallen in het effluent. Indien de bacteriën aanwezig blijven en de aantallen blijven stijgen, wordt aanbevolen om te onderzoeken of aanpassingen in de bedrijfsvoering, bijvoorbeeld het terugspoelregime, helpen om de bacterie kwijt te raken. Indien dit niet werkt is het extern reinigen of het vervangen van het filtermateriaal mogelijk de enige optie om de bacterie kwijt te raken. Voorkomen moet worden dat de filters opnieuw besmet raken met deze bacteriën. Voor dit laatste punt is meer onderzoek nodig. Voor een beter beeld van de samenstelling van de bacteriepopulatie (waaronder bacteriën van de coligroep) wordt aanbevolen om van de bewaarde monsters een microbiële profilering uit te laten voeren met behulp van Next Generation Sequencing (NGS).

Naast de watertemperatuur kunnen verschillen in de watersamenstelling tussen de winter en zomer effect hebben op de groei van bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal. Het is daarom aan te raden hiervoor een vergelijkbare aanvullende groeiproef uit te voeren met water dat in de winter verkregen is.

Rapport

Dit speerpuntonderzoek is beschreven in het rapport Groei en overleving van bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal uit ps. Bergen (BTO 2018.043).

Voorwoord

Dit onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met PWN en Het Waterlaboratorium (HWL). HWL heeft bacteriestammen uit het effluent van de snelle zandfilters van ps. Bergen geïsoleerd, getypeerd en aangeleverd aan KWR. Een groot deel van de kolonies van de groeiproeven is met MALDI-TOF getypeerd door HWL. Verder heeft Bernadette Lohman van PWN water (influent van de snelle zandfilters) en filtermateriaal uit de snelle zandfilters bemonsterd en aangeleverd aan KWR. Wij danken HWL en PWN hiervoor.

Inhoud

Voorwoord	2
Inhoud	3
1 Inleiding	4
1.1 Aanleiding	4
1.2 Doel	4
2 Analyse historische gegevens temperatuur en bacteriën van de coligroep ps. Bergen en Mensink	5
3 Methoden groeiproeven	11
3.1 Filtermateriaal en water van ps. Bergen	11
3.2 Isolatie en typering van bacteriestammen voor de groeiproeve	11
3.3 Groeiproeven met bacteriën van de coligroep	12
3.4 Bepaling bacteriën van de coligroep	13
3.5 Verwerking MALDI-TOF resultaten	14
4 Groei van bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal van ps. Bergen	16
5 Karakterisatie kolonies bacteriën van de coligroep met MALDI-TOF	19
5.1 Typering van stammen bacteriën van de coligroep voor gebruik in groeiproef	19
5.2 MALDI-TOF typering van bacteriestammen in de groeiproef	20
5.3 Invloed van watertemperatuur op overleving en groei van bacteriën van de coligroep	25
6 Discussie	26
6.1 Invloed van watertemperatuur op groei en overleving van bacteriën van de coligroep	26
6.2 Dynamiek van aantallen bacteriën van de coligroep in groeiproeven	26
6.3 Groei en overleving van bacteriën van de coligroep in de groeiproeven	27
6.4 Typering van bacteriën van de coligroep met MALDI-TOF	28
7 Conclusies en aanbevelingen	29
7.1 Conclusies	29
7.2 Aanbevelingen	29
Bijlage I Resultaten MALDI-TOF typering	31

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

Sinds 2011 meet PWN op de pompstations Bergen en Mensink in het effluent van de zandfilters in de voorzuivering gedurende de periode mei-november bacteriën van de coligroep in grootvolumemonsters. Tot 2014 waren deze aantallen in de zandfilters terug te leiden naar de aantallen bacteriën van de coligroep die in het onttrokken duininfilttraat aanwezig waren. Na het implementeren van een aantal maatregelen worden sinds 2015 geen bacteriën van de coligroep meer aangetroffen in het onttrokken duininfilttraat, maar treft men in het effluent van de zandfilters in de voorzuivering gedurende deze periode nog wel bacteriën van de coligroep aan. De bacteriën van de coligroep worden vanaf mei-juni aangetroffen in het effluent en de aantallen stijgen dan tot ongeveer 100 kolonievormende eenheden (kve)/100 liter in augustus-september, waarna de aantallen dalen totdat in november-december de aantallen onder de detectiegrens van 1 kve/100 liter komen. De bacteriën die worden gevonden in het effluent van de zandfilters lijken tot diverse soorten van de coligroep te behoren. Vanaf 2012 gebruikt HWL de MALDI-TOF sporadisch voor typering van bacteriën van de coligroep, maar de bevestiging werd destijds nog met de kweekmethode uitgevoerd. Vanaf 2016 is HWL overgestapt van bevestiging met de standaardkweekmethode en oxidase-bepaling naar de MALDI-TOF methode. Kolonies op de LSA-kweekplaat die karakteristiek zijn voor bacteriën van de coligroep) worden getypeerd met de MALDI-TOF, waarbij onderscheid wordt gemaakt tussen wel of niet behorend tot de *Enterobacteriaceae*.

PWN heeft, in samenwerking met HWL, verschillende onderzoeken uitgevoerd om de oorzaak te achterhalen, maar dit heeft nog niet geleid tot een oplossing. Een belangrijke vraag is of de aangetroffen bacteriën van de coligroep een indicator zijn van kortsluitstromen rond de winputten en daarmee een indicatie zijn van mogelijk aanwezige (fecale) pathogenen, of dat de bacteriën in de zandfilters kunnen overleven en nagroeien. Momenteel wordt vermoed dat de bacteriën van de coligroep in de filters kunnen overleven en nagroeien en vervolgens uitspoelen naar het effluent. Aanvullend hierop is er de vraag waarom en wanneer de bacteriën van de coligroep uitspoelen uit de filters en in grootvolume monsters worden aangetroffen. In dit speerpuntonderzoek wordt een onderdeel van deze vraagstelling onderzocht: kunnen bacteriën van de coligroep overleven en nagroeien in water en filtermateriaal van ps. Bergen.

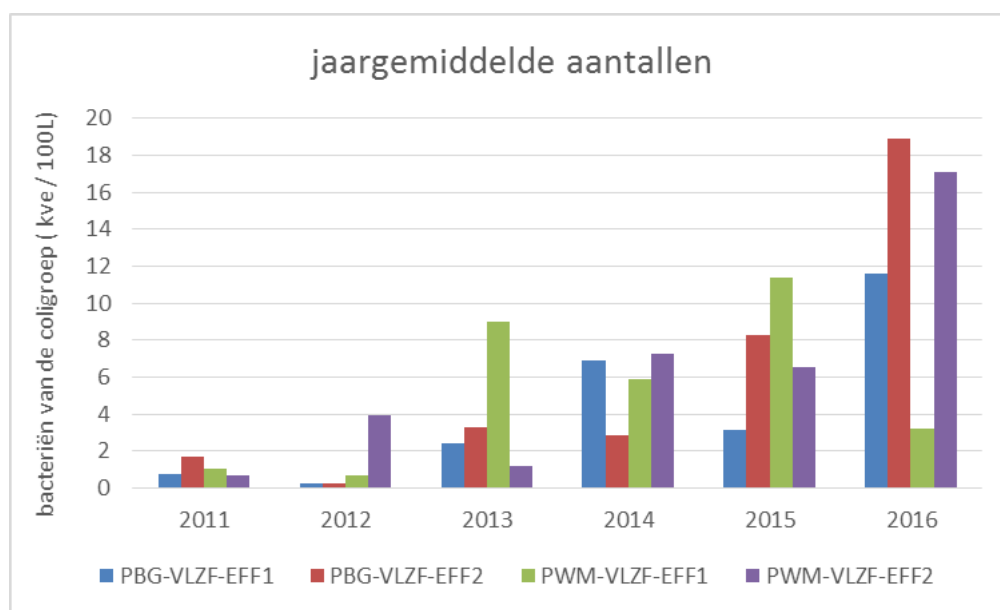
1.2 Doel

Het doel van dit onderzoek is om de hierboven geformuleerde hypothese te onderzoeken: kunnen bacteriën van de coligroep overleven en/of zich vermeerderen in het zand van het zandfilter op pompstation Bergen. Daartoe zijn historische gegevens geanalyseerd en zijn groeiproeven met bacteriën van de coligroep en zandmateriaal van de filters uitgevoerd.

2 Analyse historische gegevens temperatuur en bacteriën van de coligroep ps. Bergen en Mensink

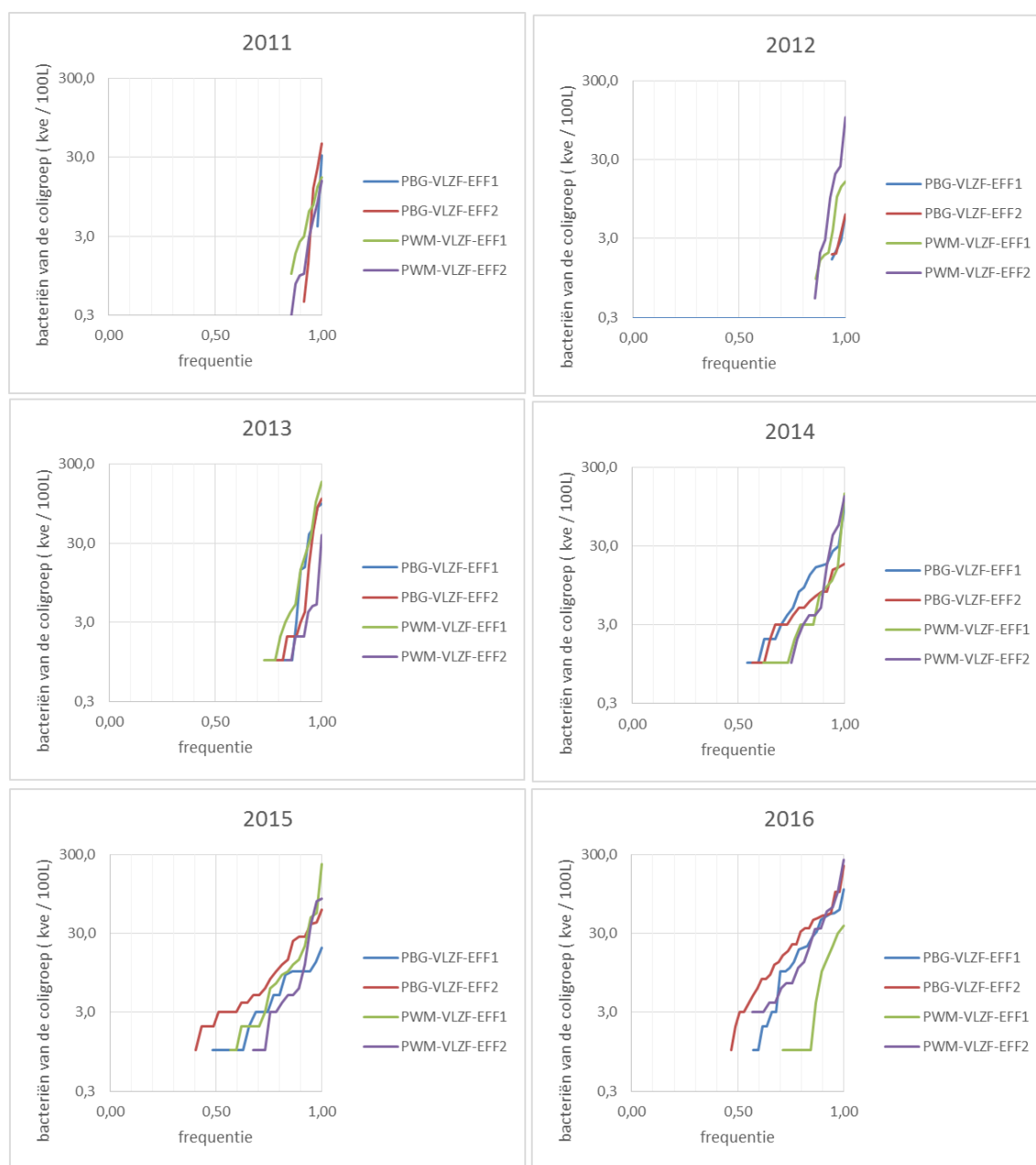
Op de pompstations Bergen en Mensink van PWN worden sinds 2011 steeds vaker bacteriën van de coligroep gedetecteerd in grootvolume-monsters van de effluenten uit de zandfilters (Figuur 1). In de periode mei-november wordt wekelijks een grootvolume na de zandfilters gemeten en in de periode november-mei is dit één keer per twee weken.

In 2011-2012 worden incidenteel bacteriën van de coligroep aangetroffen (2-8 weekmonsters per jaar, 4-17% van alle waarnemingen). Vanaf 2015 worden in 12-27 weekmonsters per jaar (32-62% van alle waarnemingen) deze bacteriën aangetroffen. Ook de aantallen bacteriën van de coligroep in deze monsters nemen toe: dit is duidelijk te zien aan de jaargemiddelden van de gemeten aantallen bacteriën van de coligroep (Figuur 1). De gemiddelde toename in bacteriën van de coligroep varieert tussen 1,3x per jaar (Mensink) tot 3x per jaar (Bergen), met maxima tot 260 kve per 100 liter.



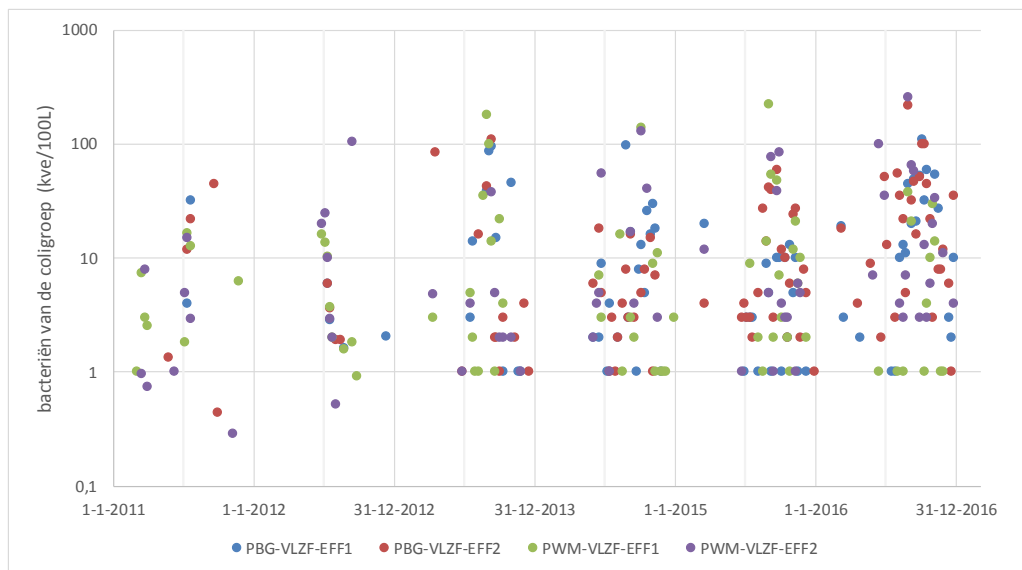
FIGUUR 1. JAARGEMIDDELTE AANTALLEN BACTERIËN VAN DE COLIGROEP IN GROOTVOLUME-MONSTERS VAN DE ZANDFILTERS OP POMPSTATIONS BERGEN (PBG) EN MENSINK (PWM).

Op basis van de gevonden aantallen per week kan een frequentieverdeling worden gemaakt. Hierin staat in oplopende volgorde weergegeven welke hoeveelheden gevonden zijn over welk deel van het jaar. De figuur laat zien dat zowel het aantal waarnemingen van bacteriën uit de coligroep toenam, als de dichtheden in de monsters (Figuur 2). Zo werd in 2011 en 2012 in 10% van de metingen bacteriën van de coligroep gevonden, terwijl dit in 2015 en 2016 is gestegen naar ongeveer 50% voor pompstation Bergen. Ook neemt de frequentie van aantallen boven bepaalde dichtheden duidelijk toe.



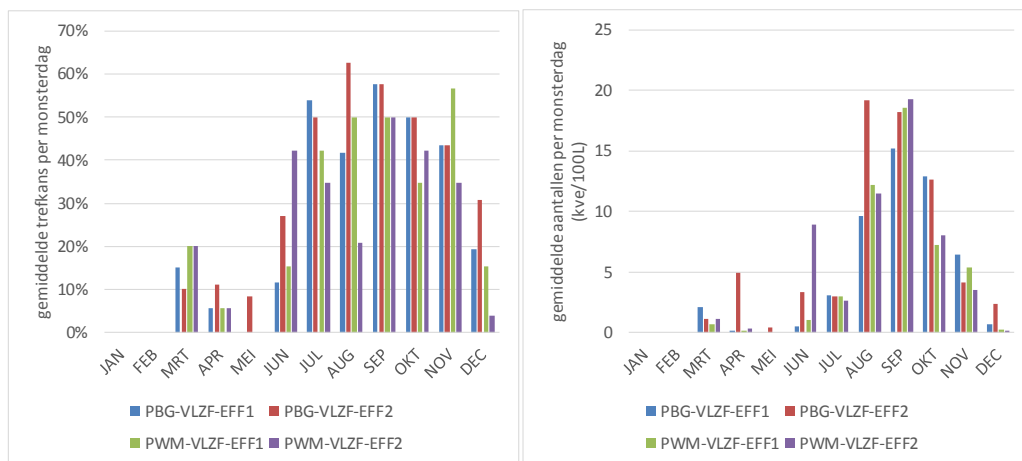
FIGUUR 2. CUMULATIEVE FREQUENTIEVERDELING VAN DE AANTALLEN VAN BACTERIËN VAN DE COLIGROEP AANGETROFFEN IN 100-LITERMONSTERS OP POMPSTATIONS BERGEN (PBG) EN MENSINK (PWM) IN DE VERZAMELD EFFLUENTEN VAN FILTERGEBOUW 1 (EFF1) EN 2 (EFF2) OVER HET JAAR GEDURENDE 2011 T/M 2016.

Naast een toename over de jaren is per jaar een duidelijk seizoenspatroon te zien (Figuur 3). Hogere aantallen bacteriën van de coligroep komen met name voor in de tweede helft van ieder jaar. In deze figuur is eveneens (weer) te zien dat zowel de trefkans als de aantallen bacteriën van de coligroep toenemen over de jaren.



FIGUUR 3. AANTALLEN BACTERIËN VAN DE COLIGROEP IN DE TIJD.

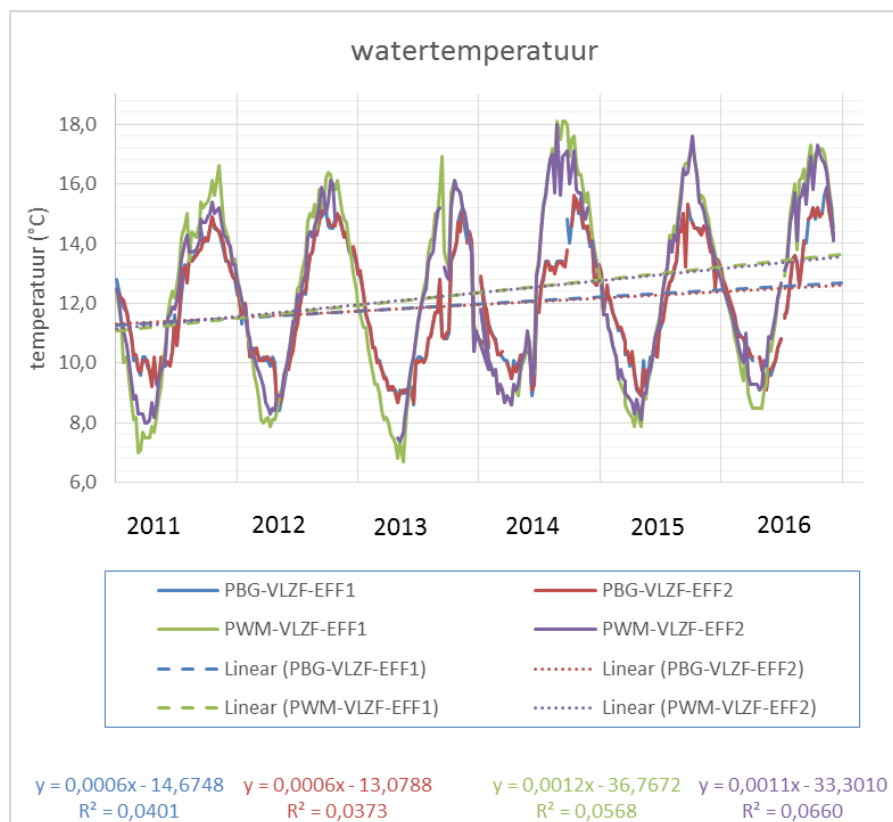
Bij analyse van deze gegevens per maand, wordt een duidelijk seizoenspatroon zichtbaar: met name in de zomer en het najaar (juni-november) is er een grote kans op aantreffen van bacteriën van de coligroep in grootvolume monsters. In de periode 2011-2016 zijn in deze maanden in de helft van alle monsters bacteriën van de coligroep aangetroffen (Figuur 4, links). De hoogste aantallen worden aangetroffen in de maand september, waarin gemiddeld 15 of meer kolonievormende eenheden worden gevonden per 100 liter (Figuur 4, rechts).



FIGUUR 4. MAANDGEMIDDELEN OVER DE PERIODE 2011-2016 VAN DE KANS OP HET AANTREFFEN VAN BACTERIËN VAN DE COLIGROEP IN EEN GROOTVOLUME MONSTER (LINKS) EN DE AANTALLEN PER MONSTERDAG (RECHTS).

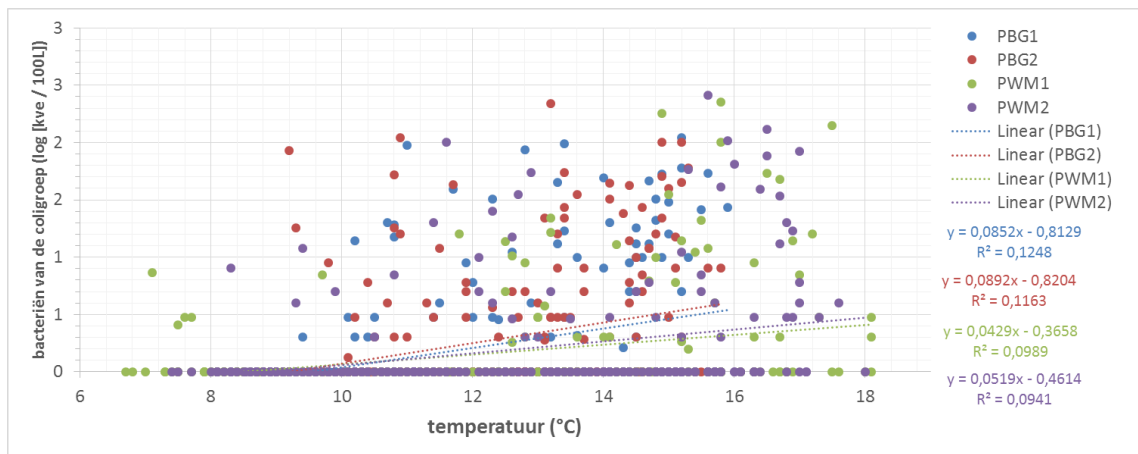
Het seizoenspatroon is in deze periode (2011-2016) ook in de watertemperatuur te zien: de watertemperatuur bereikt de hoogste waarden de tweede helft van het jaar, met een piek rond september-oktober (Figuur 5). Verder is in deze figuur te zien dat de watertemperatuur, net als de aantallen bacteriën van de coligroep, ook toeneemt in de loop der jaren. Hierbij zijn duidelijke verschillen te zien tussen de pompstations: de watertemperatuur bij ps Bergen neemt toe met 0,2°C per jaar terwijl deze bij Mensink toeneemt met 0,4 °C per jaar (Figuur 5). Verder zijn bij Mensink de temperatuurextremen (minima en maxima) groter dan

bij Bergen (Figuur 5). Dit suggereert dat het water van ps Bergen minder onder invloed staat van bovengrondse temperatuurswisselingen dan het water van ps Mensink. Ook de verschillen in watertemperatuur bij Mensink zijn groter dan bij Bergen.



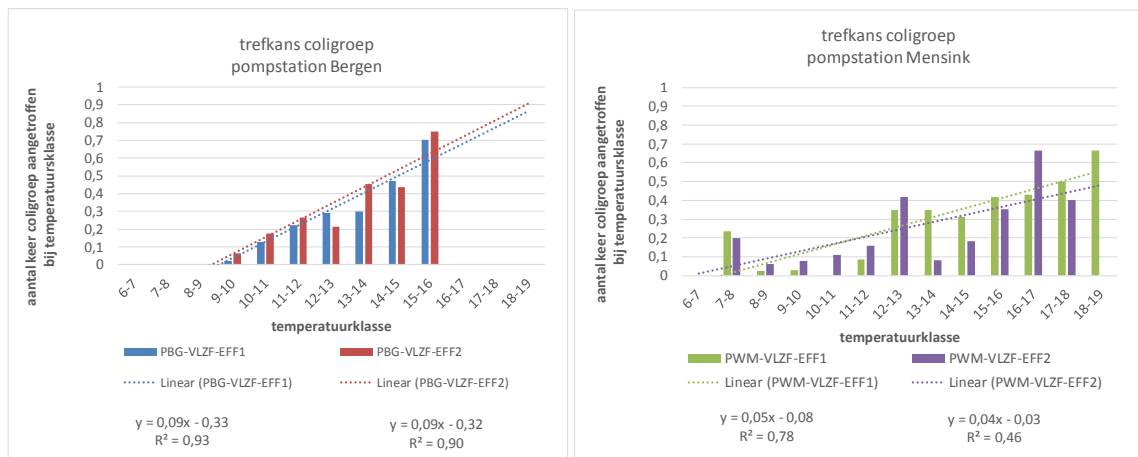
FIGUUR 5. VERLOOP VAN DE WATERTEMPERATUUR IN DE TIJD OP POMPSTATIONS BERGEN (PBG) EN MENSINK (PWM).

Hoewel zowel temperatuur als het voorkomen en de aantallen van bacteriën van de coligroep toenemen in dezelfde periode (2011-2016), is er slechts een zwakke positieve correlatie tussen watertemperatuur en aantallen bacteriën van de coligroep (Figuur 6). Dit is een indicatie dat naast de watertemperatuur ook andere factoren het aantal bacteriën van de coligroep beïnvloedt.



FIGUUR 6. VERBAND TUSSEN TEMPERatuur EN HET NATUURLIJK LOGARTIME (BASIS 10) VAN DE AANTALLEN BACTERIËN VAN DE COLIGROEP IN GROOTVOLUME-MONSTERS OP POMPSTATIONS BERGEN (PBG) EN MENSINK (PWM). VANWEGE DE LOGARITMISCHE TRANSFORMATIE ZIJN NIET-POSITIEVE RESULTATEN (WAARDE 0) NIET MEEGENOMEN IN DE ANALYSE.

Figuur 6 laat zien dat bacteriën van de coligroep niet in lagere aantallen voorkomen bij lage temperaturen (10 – 18°C): pas bij hele lage temperaturen (< 9°C) zijn lagere aantallen waargenomen, terwijl hogere aantallen bacteriën van de coligroep worden aangetroffen over het hele temperatuurbereik 10-18 °C. Wat Figuur 6 niet laat zien is het verband tussen het aantal positieve monsters voor bacteriën van de coligroep en de temperatuurklassen. In Figuur 7 staat dit per pompstation weergegeven.



FIGUUR 7. HET VERBAND TUSSEN HET AANTAL POSITIEVE MONSTERS VOOR BACTERIËN VAN DE COLIGROEP EN DE VERSCHILLENDE TEMPERATUURKLASSEN VOOR POMPSTATION BERGEN (LINKS) EN POMPSTATION MENSINK (RECHTS).

Wat aan de gegevens van Figuur 7 opvalt, is dat vooral voor pompstation Bergen een sterke lineaire correlatie ($R^2 = 0,90 - 0,93$) bestaat met temperatuur: vanaf 8°C neemt het aantal positieve monsters toe met ruim 9 procent per graad Celsius temperatuurstijging. Bij pompstation Mensink is dit verband ook aanwezig, maar minder sterk ($R^2 = 0,46 - 0,78$). Dit minder sterke verband lijkt vooral veroorzaakt te worden door een aantal waarnemingen van bacteriën uit de coligroep bij temperatuurklasse 7-8 °C. Door het voorkomen van zowel lagere als hogere temperaturen (zie ook Fig. 5) is de relatie tussen de aangetroffen bacteriën van de coligroep en de temperatuur minder steil (4-5 procent toename per graad

temperatuurstijding). Wanneer de lagere temperaturen (6-7 en 7-8°C) buiten beschouwing worden gelaten volgt een sterkere en steilere positieve correlatie (PWM-VLZ-EFF1: $y = 0,0637x - 0,0945$, $R^2 = 0,90$; PWM-VLZ-EFF2: $y = 0,0492x - 0,0199$, $R^2 = 0,55$). Praktisch gezien betekent dit dat vanaf 8 °C het aantal positieve monsters met 5-6 procent toeneemt per graad Celsius temperatuurstijging van het water.

Deze resultaten laten zien dat er een duidelijke correlatie is tussen watertemperatuur en het aantreffen van bacteriën van de coligroep in het effluent van de zandfilters bij Bergen en Mensink. Deze relatie zegt echter nog weinig over de onderliggende oorzaak: het kan zijn dat de toename in positieve monsters bij temperatuurstijging een directe respons is op de temperatuurtoename, maar het is ook mogelijk dat een andere groeifactor covarieert met temperatuur (zoals bepaalde voedingsstoffen in het water). De watertemperatuur speelt dan mogelijk een minder belangrijke rol. Om meer duidelijkheid te krijgen over de onderliggende oorzaak, zijn aanvullende experimenten gedaan naar het effect van de watersamenstelling in de tijd op het voorkomen van bacteriën uit de coligroep. Deze experimenten en de resultaten daarvan zijn beschreven in hoofdstuk 4.

3 Methoden groeiproeven

3.1 Filtermateriaal en water van ps. Bergen

Bij PWN is water (influent van de snelle zandfilters) en filtermateriaal uit de snelle zandfilters van de voorzuivering bij ps Bergen (verhouding ongeveer 2/3 zand en 1/3 bims) bemonsterd op 2 oktober 2017. Het materiaal is na bemonstering bewaard bij 4°C tot de start van de groeiproef (één dag later).

Tegelijkertijd met de monsternamen is door HWL een grootvolumemonster van water genomen en geanalyseerd op het aantal aanwezige bacteriën van de coligroep.

3.2 Isolatie en typering van bacteriestammen voor de groeiproef

De MALDI-TOF wordt in de dagelijkse praktijk gebruikt om kolonies op de LSA-platen snel te typeren om na te gaan of het om een bacterie van de coligroep gaat of niet. Hierbij wordt aangehouden dat als de typering een MALDI-TOF score heeft boven de 1,7 en het getypeerde genus tot de *Enterobacteriaceae* behoort, de kolonie als een bacterie van de coligroep is bevestigd. Om het genus van de kolonie betrouwbaar te kunnen typeren wordt een minimale MALDI-TOF score van 2,0 aangehouden. Onder deze waarde is de genusnaam niet betrouwbaar vast te stellen. Voor een betrouwbare typering op soortnaamniveau zal een nog hogere score dan 2 nodig zijn. Daarnaast is een aantal genera met de MALDI-TOF niet van elkaar te onderscheiden omdat de eiwitsamenstelling te veel op elkaar lijkt. Omdat in de groeiproeven een vrij hoge entdichtheid wordt gebruikt (zie 3.3) wordt er vanuit gegaan dat andere van nature aanwezige stammen/soorten niet of in beperkte mate zullen worden bevestigd met de MALDI-TOF.

In de zomer van 2017 heeft HWL vijf bacteriestammen van de coligroep geïsoleerd uit het effluent van de snelle zandfilters van ps. Bergen. Na typering met de MALDI-TOF zijn deze stammen op agarplaten verstuurd naar KWR. De volgende bacteriestammen, dus op soortnaam gebracht met de MALDI-TOF zijn gebruikt voor de groeiproeven:

- *Buttiauxella agrestis*
- *Raoultella terrigena*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Kosakonia radicincitans*
- *Citrobacter freundii*

Hierbij dient opgemerkt te worden dat de stammen *Buttiauxella agrestis* en *Citrobacter freundii* een MALDI-TOF score > 2 hadden, wat een betrouwbaar testresultaat is. De andere drie stammen hadden echter een MALDI-TOF score lager dan 2, waardoor de betrouwbaarheid van de typering op soortsniveau voor deze drie stammen laag is.

Elke stam is in een eigen entfles opgegroeid zoals beschreven in KLMB-016, glucose en kaliumnitraat zijn gedoseerd als C- en N-bron. Vanuit de entflessen zijn de bacteriestammen vervolgens toegevoegd aan de groeiproeven.

3.3 Groeiproeven met bacteriën van de coligroep

De groeiproeven zijn uitgevoerd in water en filtermateriaal van de zandfilters van de voorzuivering bij ps. Bergen. Alle condities zijn in tweevoud uitgevoerd volgens het schema in Tabel 1.

TABEL 1. CONDITIES VOOR DE COLIFORMGROEIPROEVEN.

	Water influent zandfilters	Filtermateriaal	Temperatuur
1	500 ml	-	9°C
2	500 ml	-	18°C
3	500 ml	500 gram	9°C
4	500 ml	500 gram	18°C

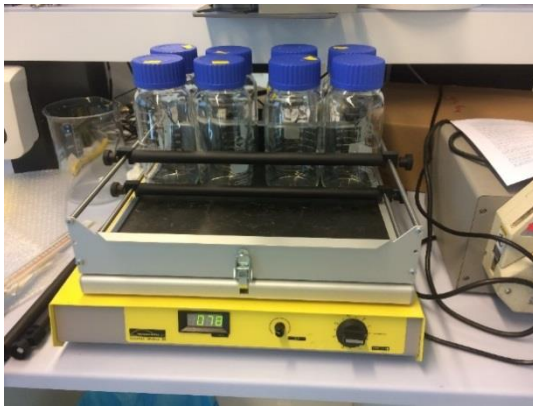
Voor de groeiproeven zijn de vijf bacteriestammen in gelijke verhoudingen gedoseerd aan het water tot een eindconcentratie van 1×10^3 kve/ml. Het filtermateriaal van ps. Bergen is verdeeld in kleine porties van 80 gram en aangeënt met 5 ml coliformsuspensie tot een eindconcentratie van 1×10^3 kve/gram materiaal. Dit mengsel is gehomogeniseerd door het gedurende 30 minuten in een pot te schudden op een schudplateau. Hierna zijn de porties samengevoegd, gemengd en verdeeld over de 1-liter flessen. Per fles is 500 gram filtermateriaal en 500 ml water gedoseerd (Figuur 8).

De flessen zijn gedurende 27 dagen geïncubeerd bij 9°C en 18°C en continu geschud bij 85 rpm op een schudplateau (Figuur 9).

Op dag 0, 1, 2, 6, 13 en 27 is het water en filtermateriaal bemonsterd. Voor bemonstering van het filtermateriaal is een theeschepje in de vorm van een cilinder, waarmee gemakkelijk het zand kan worden bemonsterd. Na elk monster is het theeschepje gesteriliseerd in een gasvlam. Na monsternamen is het filtermateriaal (10 gram) gemengd met 60 ml geautoclaveerd leidingwater en gedurende 2 minuten geschud om de bacteriën vrij te laten komen in het water. Lage Energie Sonificatie is niet toegepast om beschadiging van de bacteriën, waardoor deze niet-kweekbaar worden, te voorkomen.



FIGUUR 8. 1-LITER FLESSEN GEVULD MET WATER EN FILTERMATERIAAL. EÉN VAN DE MATERIALEN, VERMOEDELIJK BIMS, ZAKT LANGZAAM UIT EN BLIJFT LANG IN HET WATER DRIJVEN.



FIGUUR 9. 1-LITER FLESSEN VOOR DE GROEI-PROEVEN OP EEN SCHUD-PLATEAU. OP DE FOTO IS EEN TEST TE ZIEN, WAARDOOR DE FLESSEN NOG LEEG ZIJN EN NOG NIET IN EEN STOOF GEPLAATST ZIJN.

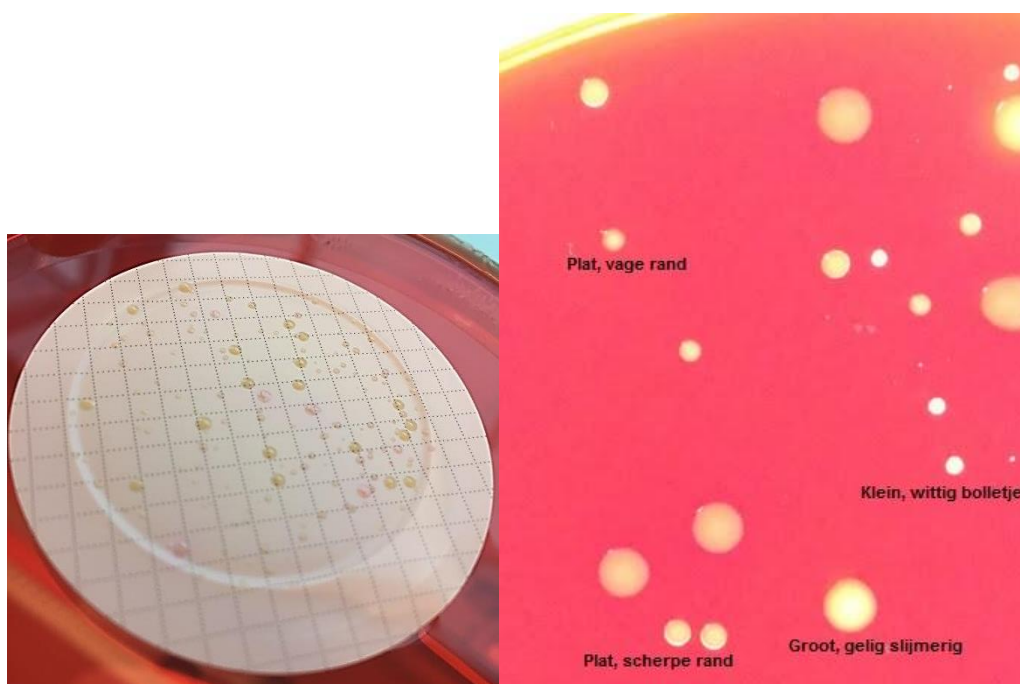
3.4 Bepaling bacteriën van de coligroep

Van het bovenstaande water in de 1-literflessen en het behandelde filtermateriaal is het aantal bacteriën van de coligroep bepaald met de kweekmethode volgens LMB-042, conform NEN-EN-ISO 9308-1. Hiervoor is het watermonster gespateld op LSA-platen, bij lage aantallen is het water gefiltreerd en is het filter op LSA-platen gelegd. Alle platen zijn geïncubeerd bij 36°C. In de norm staat vermeld dat alleen lactose-positieve kolonies, dat te zien is aan de gele kleur van een kolonie, moeten worden rein gestreken om deze vervolgens te bevestigen met een oxidase bepaling. Bacteriën van de coligroep zijn oxidase-negatief in de bepaling. Kolonies die lactose-negatief zijn, of lactose- en oxidase-positief, worden volgens de NEN/ISO methode niet tot bacteriën van de coligroep gerekend.

De vijf bacteriestammen die aan de groeiproef zijn gedoseerd, vormden echter niet allemaal kolonies die lactose-positief zijn op LSA-platen (de niet-gele kolonies in Figuur 10). Deze kolonies waren echter wel allen oxidase-negatief in de bevestiging. Er waren bij de start van het experiment grofweg vier koloniemorfologieën te onderscheiden (Figuur 10):

- geel, dik, slijmerig
- crèmekleurig, plat, scherpe rand
- crèmekleurig, plat, vage rand
- klein, wit bolletje

Voor het bepalen van het aantal bacteriën van de coligroep in de groeiproeven zijn alle oxidase-negatieve kolonies, ongeacht of deze lactose-positief of negatief zijn, geteld.



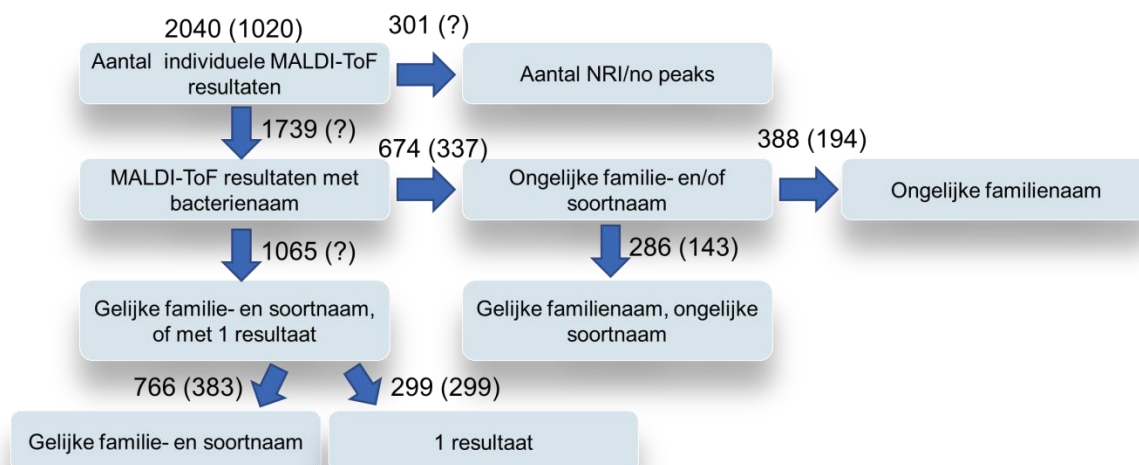
FIGUUR 10. TYPISCH BEELD VAN DE MORFOLOGIE VAN DE KOLONIES DIE AANGETROFFEN WORDEN OP LSA-PLATEN DIRECT NA ENTING VAN DE GROEIPROEVEN MET DE STAMMEN VAN DE BACTERIEN VAN DE COLIGROEP. IN DE RECHTERFIGUUR IS AANGEGEVEN HOE DE MORFOLOGIE VAN DE KOLONIES IS BEOORDEELD.

Per monster zijn 15 kolonies, ook de atypische niet-gele kolonies, reingestroken op LLA-platen. Deze kolonies zijn bevestigd met de oxidase-bepaling, en de oxidase-negatieve kolonies zijn door KWR aangebracht op de MALDI-TOF plaat en ingebed in de matrix voordat de platen zijn verstuurd naar HWL voor typering met de MALDI-TOF. De MALDI-TOF analyse is per kolonie in tweevoud uitgevoerd.

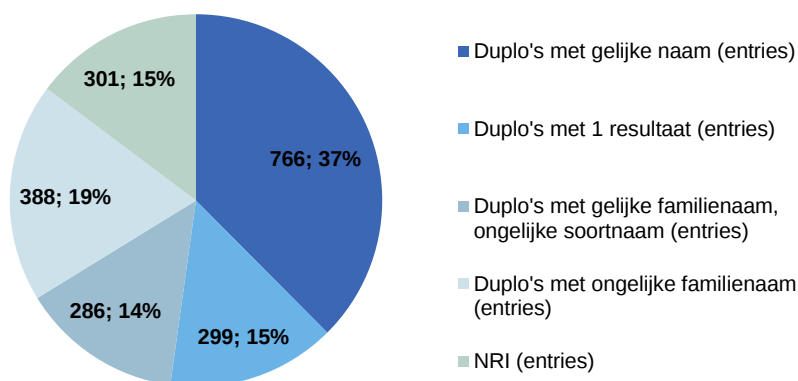
3.5 Verwerking MALDI-TOF resultaten

Van de in totaal 1020 kolonies zijn 2040 MALDI-TOF resultaten behaald. Voor de verwerking van de MALDI-TOF resultaten zijn de volgende stappen uitgevoerd (Figuur 11 en Figuur 12):

1. Verwijderen van monsters zonder resultaat ('no peaks' of 'no result identification'; 301 resultaten).
2. Kolonies waarvan de familie- en soortnaam overeenkomen tussen de duplo MALDI-TOF resultaten, of waarvan één resultaat beschikbaar is (de duplo geeft dan een NRI of 'no peak') zijn gebruikt voor verder analyse (1077 resultaten).
3. Kolonies waarvan de familienaam gelijk is, maar de soortnaam ongelijk, zijn gebruikt voor verdere analyses (286 resultaten).
4. Kolonies waarvan de familie- en soortnaam verschillen, zijn niet gebruikt voor verdere analyse (376 resultaten).
5. Voor verdere analyse is van alle resultaten alleen de familienaam gebruikt.
6. De MALDI-TOF score van de resultaten is buiten beschouwing gelaten. In het algemeen is de MALDI-TOF score laag (1,7 – 1,8) als de familie- en of soortnaam verschilt. Als deze wel overeenkomen is de MALDI-TOF score over het algemeen hoger.



FIGUUR 11. FLOW-SCHEMA VAN DE VERWERKING VAN DE MALDI-TOF RESULTATEN. GEGEVEN IS HET AANTAL UNIEKE RESULTATEN DAT TOT ELKE CATEGORIE BEHOORT EN TUSSEN HAAKJES (...) HET AANTAL CONDITIES WAARVAN DEZE RESULTATEN AFKOMSTIG ZIJN.



FIGUUR 12. SCHEMATISCH OVERZICHT VAN DE RESULTATEN OVER VERSCHILLENDE CATEGORIEËN. DE RESULTATEN MET 'NRI' OF 'ONGELIJKE FAMILIENAAM' ZIJN GEËXLUDEERD VAN DE DATASET EN VERDER NIET GEBRUIKT IN DE ANALYSE. GEGEVEN IS HET AANTAL INDIVIDUELE 'ENTRIES' OF MALDI-TOF RESULTATEN.

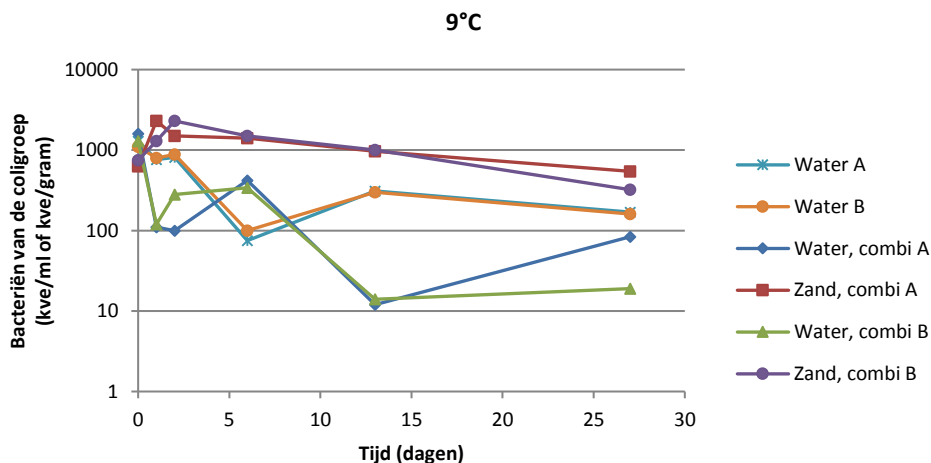
4 Groei van bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal van ps. Bergen

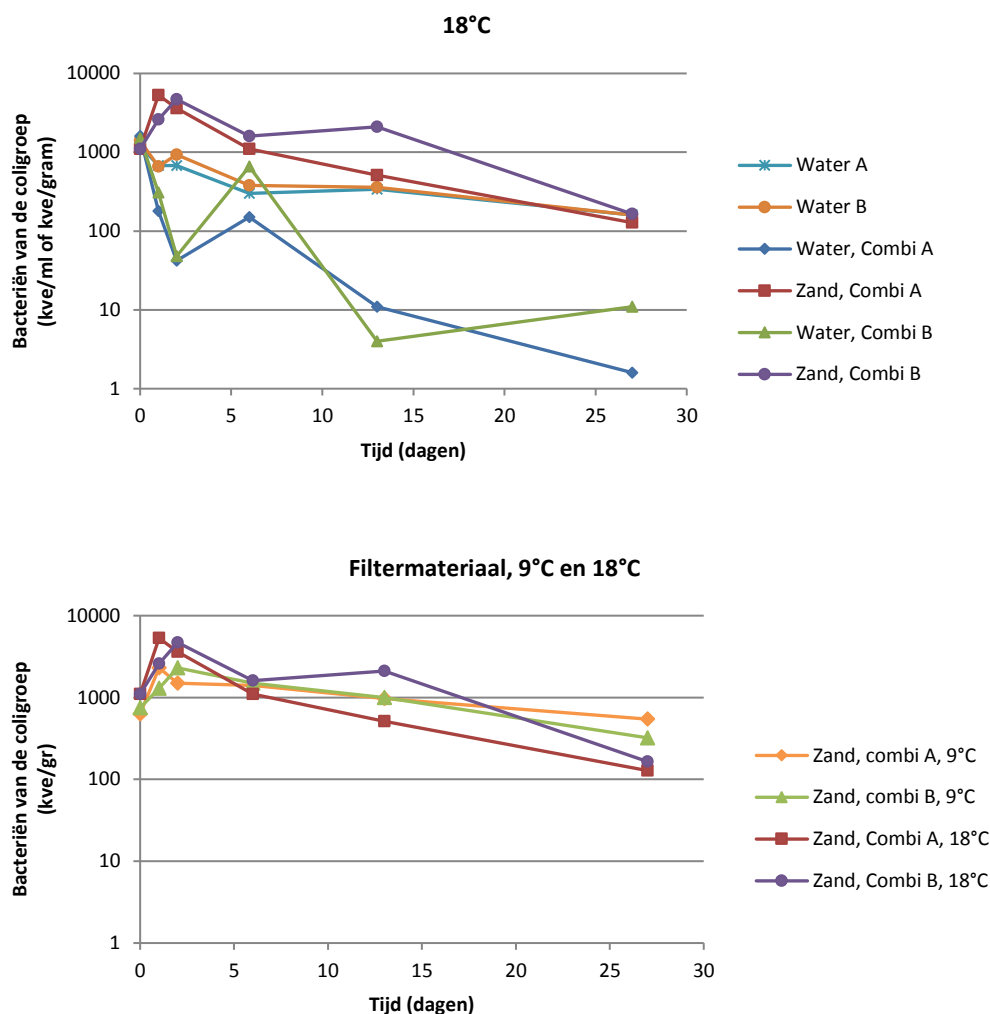
De groeiproeven zijn uitgevoerd bij twee temperaturen (9°C en 18°C) in alleen water (Water A en B, Figuur 13) en in het mengsel van water en filtermateriaal (combi A en B, Figuur 13). In de combi-flessen zijn zowel het water als het filtermateriaal bemonsterd en is het aantal bacteriën van de coligroep bepaald in respectievelijk kve/ml en kve/gram.

Als alleen water aanwezig is in de groeiproef sterven de bacteriën van de coligroep in eerste instantie af bij beide temperaturen (Figuur 13, Tabel 2 - Tabel 5). Bij 9°C vindt er tussen dag 6 en 13 beperkte groei plaats (0,4 – 0,6 log toename; Tabel 3). Na deze toename daalt het aantal bacteriën van de coligroep weer. Bij 18°C gaat de afsterving langzamer en is ook geen tussentijdse toename zichtbaar. Aan het einde van de groeiproef, na 27 dagen, zijn bij beide temperaturen nog steeds vrij hoge aantallen bacteriën van de coligroep aanwezig in het water (160-170 kve/ml; Tabel 2 en Tabel 4).

In de flessen waarin water en filtermateriaal aanwezig zijn, daalt het aantal bacteriën van de coligroep in het water bij 9°C en 18°C relatief snel na incubatie (0,7 – 1,0 log afname; Tabel 3 en Tabel 5). Tussen dag 2 en dag 6 nemen de aantallen echter weer toe met 0,6 tot 1,1 log, waarna de aantallen met 1,4 tot 2,0 log dalen. Na 27 dagen zijn in de flessen met water en filtermateriaal nog bacteriën van de coligroep aanwezig (2 – 84 kve/ml; Tabel 2 en Tabel 4) en is de afsterving ten opzichte van dag 0 1 tot 2 log.

In de flessen waaraan water en filtermateriaal zijn toegevoegd wordt in het filtermateriaal bij 9°C en 18°C beperkte groei waargenomen tussen dag 0 en dag 1 of 2; het aantal bacteriën van de coligroep stijgt met 0,5 tot 0,7 log in die periode (Tabel 3 en Tabel 5). Daarna daalt het aantal bacteriën van de coligroep langzaam, zodat na 27 dagen nog steeds relatief hoge aantallen bacteriën van de coligroep aanwezig zijn (128 – 544 kve/gr). De bacteriën sterven sneller af bij 18°C dan bij 9°C, maar ook bij 18°C zijn de aantallen in het zand na 27 dagen nog hoog (128 – 165 kve/gr; Tabel 2, Tabel 4).





FIGUUR 13. GROEI VAN BACTERIËN VAN DE COLIGROEP IN WATER EN ZAND (FILTERMATERIAAL) BIJ 9°C (BOVEN) EN 18°C (MIDDEN) EN DE GROEI IN ZAND BIJ BEIDE TEMPERATUREN (ONDER)

TABEL 2. GROEI-PROEF BIJ 9°C. AANTAL BACTERIËN VAN DE COLIGROEP IN WATER EN ZAND (FILTERMATERIAAL).

Tijd (dagen)	Water A	Water B	Water, Combi A	Zand, Combi A	Water, Combi B	Zand, Combi B
	kve/ml	kve/ml	kve/ml	kve/gr	kve/ml	kve/gr
0	1300	1100	1600	630	1300	750
1	760	800	110	2300	120	1300
2	810	880	100	1500	280	2300
6	75	100	420	1400	340	1500
13	310	300	12	968	14	1000
27	170	160	84	544	19	322

TABEL 3. GROEI-PROEF BIJ 9°C, LOG VERANDERING TEN OP ZICHTE VAN DAG 0.

Tijd (dagen)	Water A kve/ml	Water B kve/ml	Water, Combi A kve/ml	Zand, Combi A kve/gr	Water, Combi B kve/ml	Zand, Combi B kve/gr
0						
1	-0,2	-0,1	-1,2	0,6	-1,0	0,2
2	-0,2	-0,1	-1,2	0,4	-0,7	0,5
6	-1,2	-1,0	-0,6	0,3	-0,6	0,3
13	-0,6	-0,6	-2,1	0,2	-2,0	0,1
27	-0,9	-0,8	-1,3	-0,1	-1,8	-0,4

TABEL 4. GROEI-PROEF BIJ 18°C. AANTAL BACTERIËN VAN DE COLIGROEP IN WATER EN ZAND (FILTERMATERIAAL).

Tijd (dagen)	Water A kve/ml	Water B kve/ml	Water, Combi A kve/ml	Zand, Combi A kve/gr	Water, Combi B kve/ml	Zand, Combi B kve/gr
0	1200	1400	1600	1100	1500	1100
1	680	660	180	5300	310	2600
2	680	930	42	3600	48	4700
6	300	380	150	1100	660	1600
13	340	360	11	514	4	2100
27	160	160	2	128	11	165

TABEL 5. GROEI-PROEF BIJ 18°C, LOG VERANDERING TEN OP ZICHTE VAN DAG 0.

Tijd (dagen)	Water A kve/ml	Water B kve/ml	Water, Combi A kve/ml	Zand, Combi A kve/gr	Water, Combi B kve/ml	Zand, Combi B kve/gr
0						
1	-0,2	-0,3	-0,9	0,7	-0,7	0,4
2	-0,2	-0,2	-1,6	0,5	-1,5	0,6
6	-0,6	-0,6	-1,0	0,0	-0,4	0,2
13	-0,5	-0,6	-2,2	-0,3	-2,6	0,3
27	-0,9	-0,9	-3,0	-0,9	-2,1	-0,8

5 Karakterisatie kolonies bacteriën van de coligroep met MALDI-TOF

5.1 Typering van stammen bacteriën van de coligroep voor gebruik in groeiproef

Aan het water en zand zijn vijf stammen van de bacteriën van de coligroep gedoseerd die afkomstig zijn uit het effluent van de snelle zandfilters van ps. Bergen. Zoals beschreven in paragraaf 3.2 zijn deze bacteriën getypeerd met de MALDI-TOF voordat deze naar KWR zijn gestuurd. Hieruit bleek dat van twee stammen de MALDI-TOF score groter is dan 2,0 (*Buttiauxella agrestis* en *Citrobacter freundii*) en van drie stammen lager dan 2,0 (*Raoultella terrigena*, *Klebsiella oxytoca*, *Kosakonia radicincitans*).

Na afloop van de groeiproeven zijn de entflessen van iedere afzonderlijke stam bemonsterd en uitgeplaat op LSA, waarna de kolonies opnieuw in tweevoud zijn getypeerd met MALDI-TOF (Tabel 6). De resultaten van deze nieuwe analyse komen niet geheel overeen met de resultaten van de MALDI-TOF die zijn uitgevoerd op de reingestreeken stammen die door HWL zijn aangeleverd. Drie van de eerder getypeerde stammen zijn teruggevonden, waarbij twee stammen een MALDI-TOF score boven de 2,0 hadden (*Buttiauxella agrestis* en *Citrobacter freundii*) en één stam een erg lage score (*Kosakonia radicincitans*; MALDI-TOF score 1,71 - 1,79) zijn terug gevonden in de entflessen. De stammen *Raoultella terrigena* en *Klebsiella oxytoca* zijn echter niet aangetroffen. In plaats daarvan zijn de stammen *Enterobacter hormaechei* en *Cronobacter sakazakii* aangetroffen, maar van deze stammen is de MALDI-TOF score ook erg laag (respectievelijk 1,72 - 1,78 en 1,75), waardoor de resultaten van de typering minder betrouwbaar zijn.

TABEL 6. MALDI-TOF TYPERING VAN DE ENTFLESSEN WAARIN DE STAMMEN VAN DE BACTERIEN VAN DE COLIGROEP ZIJN OPGEKWEKT VOOR DE GROEIPROEVEN.

Entfles	MALDI-TOF typering	MALDI-TOF Scores
1	<i>Buttiauxella agrestis</i>	2,02 - 2,04
2	<i>Kosakonia radicincitans</i>	1,71 - 1,79
3	<i>Cronobacter sakazakii</i>	1,75
4	<i>Enterobacter hormaechei</i>	1,72 - 1,78
5	<i>Citrobacter freundii</i>	2,03 - 2,37

Tijdens de groeiproef zijn de vier koloniemorfologiën, ongeacht de kleur en vorm, die het meest zijn aangetroffen na uitplating van de groeiproefmonsters op de LSA-platen getypeerd met de MALDI-TOF (Tabel 7). De resultaten laten zien dat *Citrobacter* en *Buttiauxella* stammen aanwezig zijn in de groeiproefexperimenten. Van de typering van de andere kolonies is de MALDI-TOF score te laag om een betrouwbare uitspraak te kunnen doen over welke bacteriegenus of -soort het gaat. Dit blijkt ook uit de grote diversiteit van soortnamen die uit de typering komt. Wel worden kolonies getypeerd met een lage score als *Kosakonia radicincitans* en *Enterobacter hormaechei*, deze zijn ook met een lage MALDI-TOF score aangetroffen in de entflessen.

TABEL 7. MALDI-TOF TYPERING VAN DE MEEST VOORKOMENDE KOLONIEMORFOLOGIËN TIJDENS HET BEPALEN VAN HET AANTAL BACTERIËN VAN DE COLIGROEP OP LSA-PLATEN.

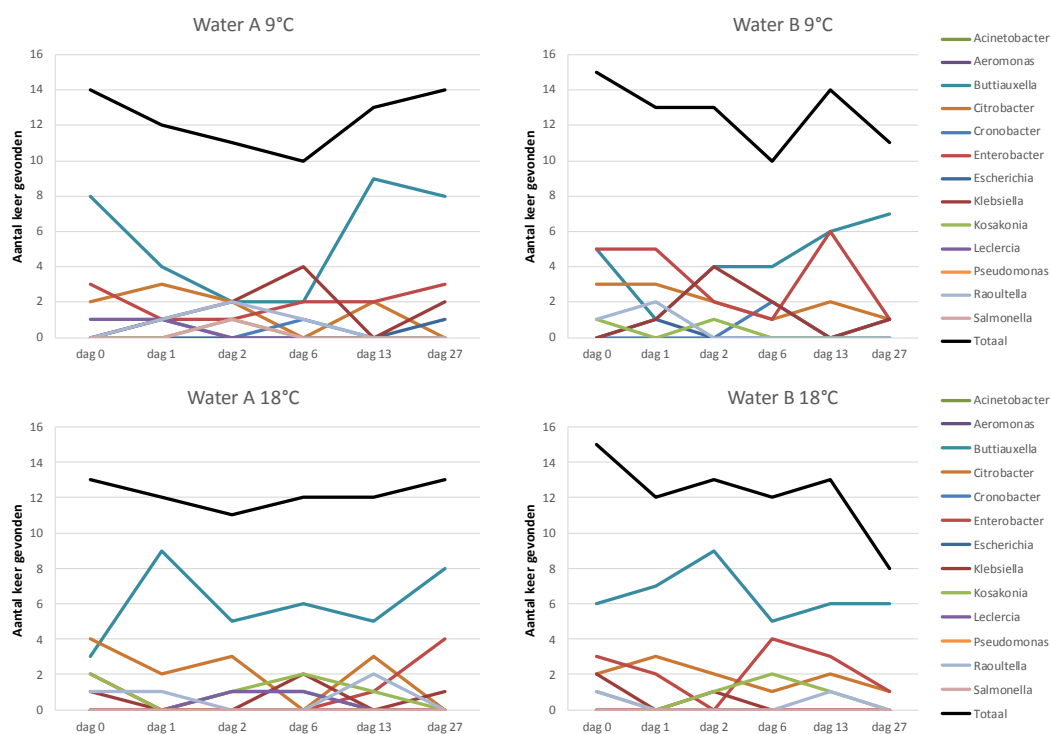
Morfologie	Typering	MALDI-score
Geel, dik, slijmerig	<i>Citrobacter freundii</i>	2,18 – 2,35
Niet geel, plat, scherpe rand	<i>Buttiauxella izardii</i>	1,99
	<i>Buttiauxella agrestis</i>	1,98
Niet geel, plat, vage rand	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1,76
	<i>Citrobacter gillenii</i>	1,71
	<i>Citrobacter freundii</i>	1,76
	<i>Kosakonia radicincitans</i>	1,71
	<i>Kosakonia radicincitans</i>	1,86
Klein, wit bolletje	<i>Enterobacter hormaechei</i>	1,77
	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1,73

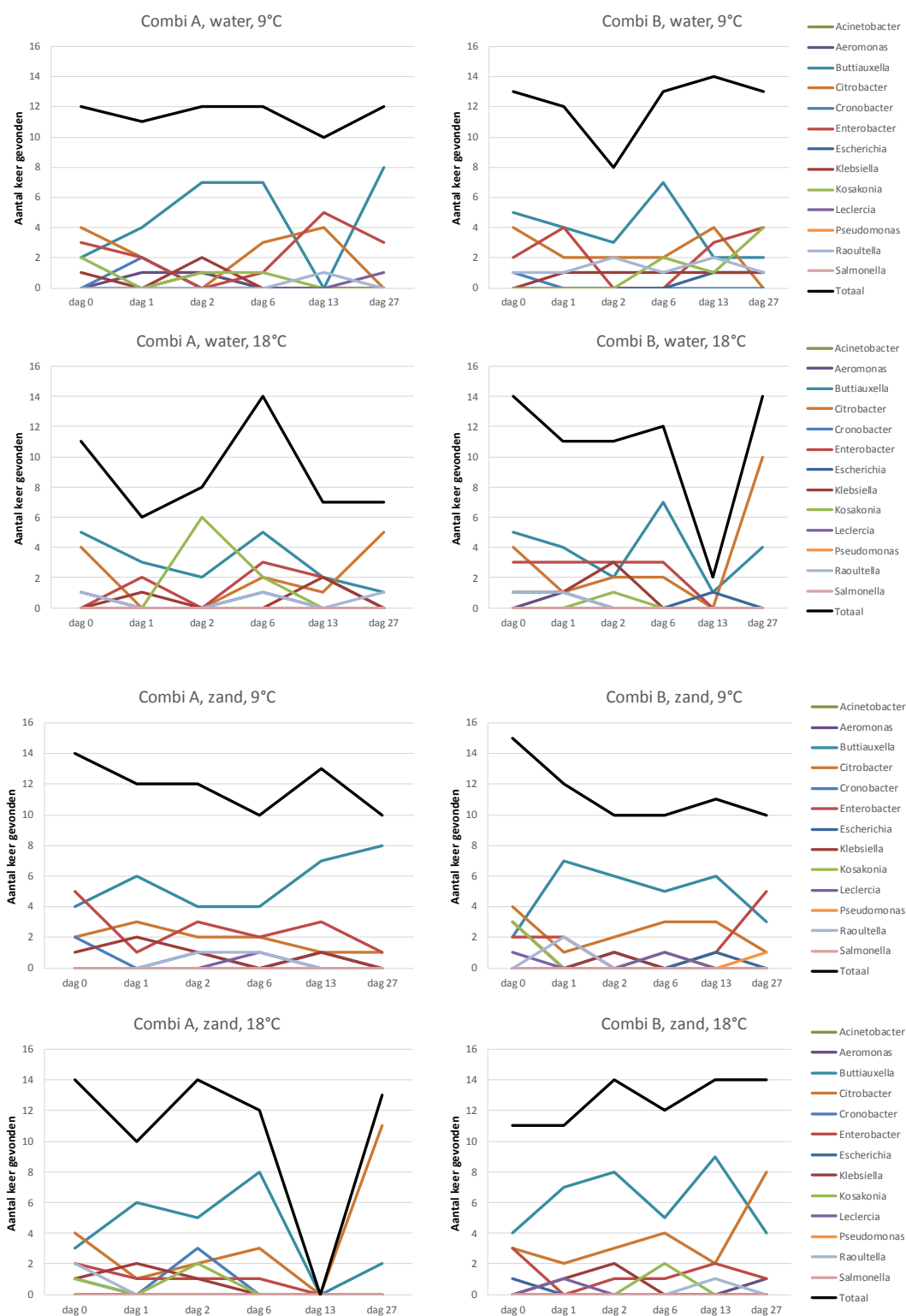
5.2 MALDI-TOF typering van bacteriestammen in de groeiproef

Na het opschonen van de MALDI-TOF dataset, zoals beschreven in paragraaf 3.5, is van 834 kolonies een MALDI-TOF resultaat beschikbaar (Bijlage I). Zoals hier boven beschreven behoren de meeste kolonies tot het genus *Buttiauxella* (350 van 824 resultaten) gevolgd door *Citrobacter* (171x) en *Enterobacter* (134x). Opvallend is dat ook drie bacteriestammen zijn aangetroffen die niet tot de familie *Enterobacteriaceae* behoren: *Aeromonas* (5x), *Acinetobacter* (1x) en *Pseudomonas* (1x). *Acinetobacter* is een oxidase-negatieve bacterie, maar *Pseudomonas* en *Aeromonas* vormen oxidase-positieve kolonies op LSA-platen. *Aeromonas* is een aantal keer getypeerd met de MALDI-TOF omdat deze gedurende de groeiproef in toenemende aantallen aanwezig was in het water en zand.

In Bijlage I is weergegeven welke bacteriën op welke dag in de groeiproeven zijn aangetroffen. Omdat per conditie en per dag slechts 15 kolonies zijn bevestigd met MALDI-TOF, geven de getallen een semi-kwantitatief beeld van de aanwezige bacteriestammen in de groeiproeven en van de onderlinge verhouding. Bij het kiezen van de kolonies voor bevestiging is rekening gehouden met de verhouding tussen de verschillende koloniemorfologiën die op de agarplaat voorkomen. Er is zo veel mogelijk geprobeerd om de verhouding in koloniemorfologiën op de agarplaat aan te houden bij de selectie van kolonies voor MALDI-TOF bevestiging. De MALDI-TOF resultaten kunnen alleen als kwantitatief resultaat worden gebruikt als alle kolonies zouden zijn bevestigd, wat hier niet het geval is. Verder dient opgemerkt te worden dat maar een beperkt deel van de 15 bevestigde kolonies per fles bruikbaar was voor nadere typering (1351 van de 2040 kolonies). De MALDI-TOF resultaten moeten daarom ook voornamelijk als indicatief worden beschouwd.

Door de hoge dosering bacteriën van de coligroep bij de start van de groeioproef, was de verwachting dat typering van de kolonies op dag 0 overeen komt met de stammen die zijn gedoseerd (zie paragraaf 3.2). Met name *Buttiauxella* en *Citrobacter* worden op dag 0 frequent teruggevonden. De drie andere bacteriestammen (*Raoultella*, *Klebsiella* en *Kosakonia*) zijn echter niet of in lage aantallen aanwezig (I, Figuur 14, Figuur 15). Wel wordt *Enterobacter* frequent teruggevonden op dag 0, deze stam werd met een lage MALDI-TOF score ook teruggevonden in één van de entflessen. De verschillen tussen gedoseerde en teruggevonden stammen worden veroorzaakt doordat een aantal bacteriestammen die zijn opgegroeid in de entfles een lage MALDI-TOF score hebben, waardoor de typering dus niet betrouwbaar is.



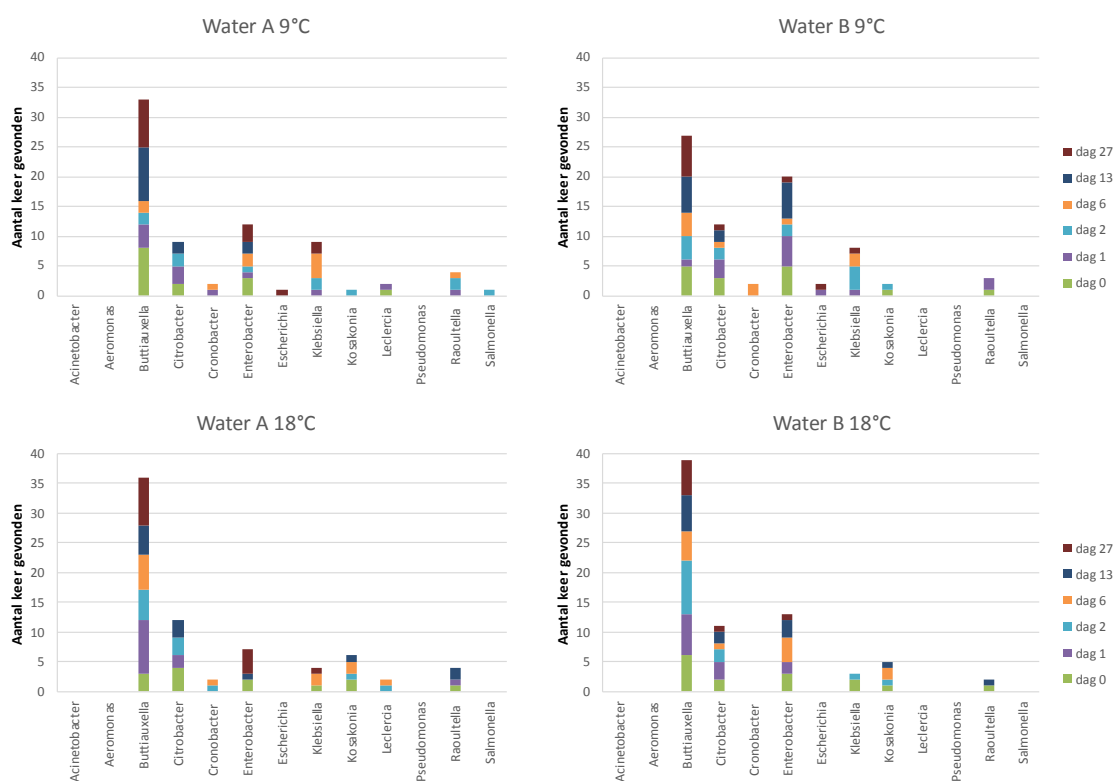


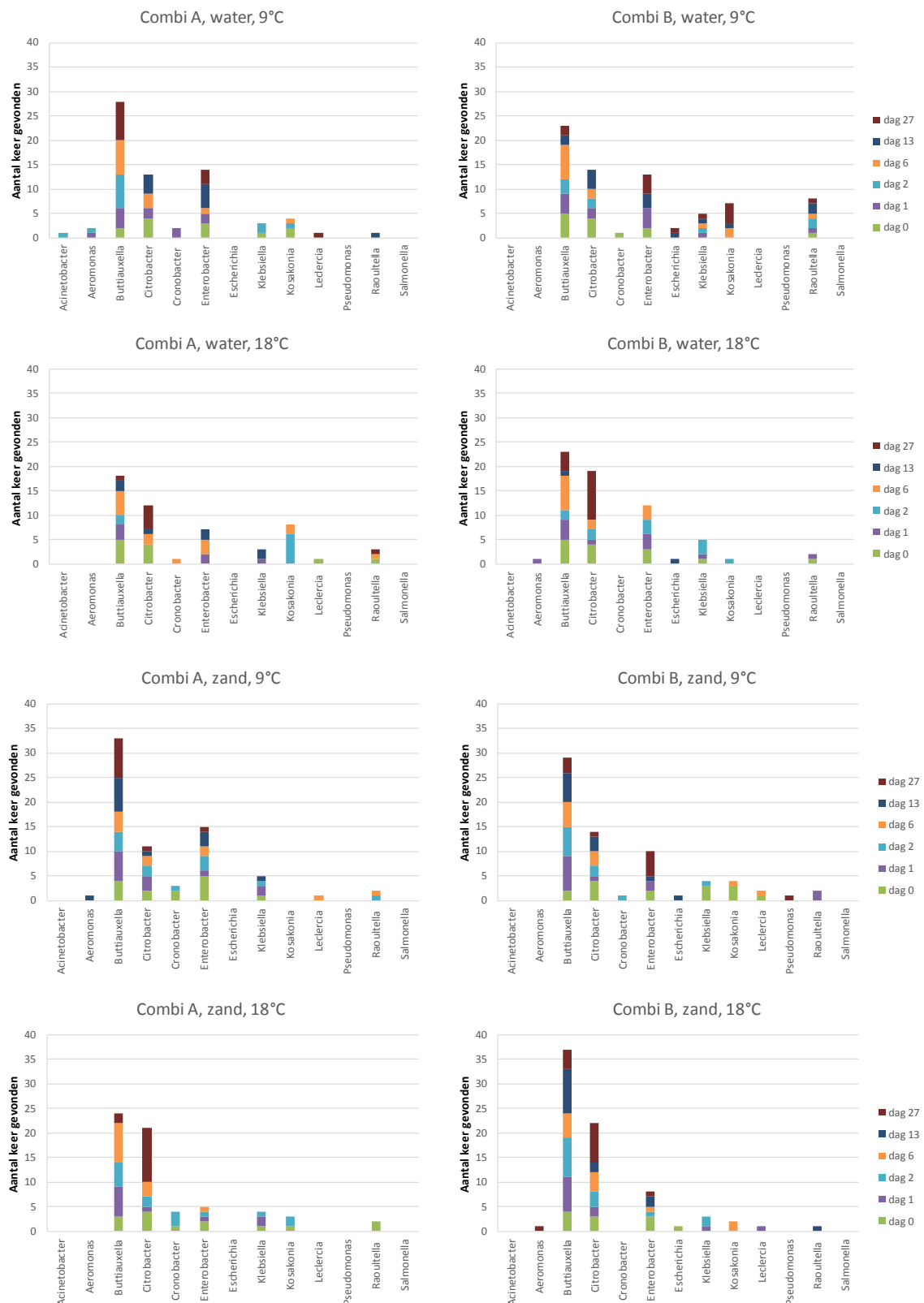
FIGUUR 14. AANTAL KEER DAT DE VERSCHILLENDE BACTERIESTAMMEN PER DAG ZIJN AANGETROFFEN IN DE GROEI-PROEVEN. DE ZWARTE LIJN GEEFT HET TOTAAL AANTAL KOLONIES WEER WAARVAN EEN MALDI-TOF RESULTAAT BESCHIKBAAR WAS.

Opvallend is verder dat in alle groeiproeven met water en filtermateriaal vanaf dag 1 enkele oxidase positieve kolonies aanwezig zijn, terwijl bacteriën van de coligroep oxidase negatief

zijn. MALDI-TOF van typeert deze kolonies als *Aeromonas* bacteriën, waarvan bekend is dat ze oxidase-positief zijn. Vanaf dag 13 is ongeveer de helft van de kolonies van het filtermateriaal oxidase positief. In het water komen deze oxidase-positieve bacteriën minder voor. HWL vindt in de voorzuivering bij ps. Bergen en Mensink, met name in de wintermaanden, vaker *Aeromonas* als atypische kolonies op LSA-kweekplaten. Dit bevestigt het beeld dat *Aeromonas* ook in de praktijk kan groeien op het filtermateriaal van de snelfilters.

In Figuur 15 is goed in de tijd de dynamiek te zien van de gekweekte bacteriesoorten op LSA-platen en getypeerd met MALDI-TOF. De samenstelling van de bacteriepopulatie die op LSA kan groeien verandert in meer of mindere mate gedurende de 27 dagen van de groeiproef. *Buttiauxella* en *Citrobacter* blijven bijna altijd in de groeiproeven aanwezig in hoge, dit geldt in mindere mate voor *Enterobacter*. Daarnaast lijkt *Buttiauxella* licht toe te nemen in de tijd. Doordat de resultaten met MALDI-TOF slechts indicatief zijn, is dit echter niet met zekerheid te zeggen. Voor de andere bacteriën van de bacteriegroep is geen duidelijke trend in de tijd waargenomen. De aanwezigheid van de andere bacteriegenera varieert wel tussen de verschillende condities, en in de tijd, maar een bepaald patroon is daarbij niet waargenomen (Bijlage I, Figuur 14). Zo komen op dag 27, aan het einde van de groeiproef, bij sommige condities slechts twee of drie bacteriegenera voor, terwijl bij de andere condities tot zes verschillende genera van bacteriën van de coligroep aanwezig kunnen zijn (Bijlage I). Er is dus geen aanwijzing dat een bepaalde bacterie van de coligroep beter kan nagroeien dan andere bacteriesoorten.





FIGUUR 15. AANTAL KEER DAT DE VERSCHILLENDE BACTERIEGENERA PER DAG ZIJN AANGETROFFEN IN DE GROEI-PROEVEN. DE RESULTATEN ZIJN WEERGEGEVEN PER GENUS VAN BACTERIEN DIE BEHOREN TOT DE COLIGROEP (MET UITZONDERING VAN ACINETOBACTER, AEROMONAS EN PSEUDOMONAS).

5.3 Invloed van watertemperatuur op overleving en groei van bacteriën van de coligroep

De historische gegevens laten een positief verband zien tussen het aantreffen van bacteriën van de coligroep en de temperatuur, watermonsters zijn vaker positief in de tweede helft van het jaar en ook de aantallen bacteriën van de coligroep die worden aangetroffen zijn in die periode hoger. Daarnaast laten de groeiproeven zien dat de hoogste groei wordt waargenomen in het filterzand (gemengd met water) dat bij 18°C is geïncubeerd. De afsterving van bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal is echter ook sneller bij 18°C dan bij 9°C, met name in de combinatieflessen waarin ook filtermateriaal aanwezig is.

De resultaten laten zien dat in de praktijksituatie bacteriën van de coligroep zich in het filterzand kunnen vermeerderen als de watertemperatuur. Waarschijnlijk worden hierdoor de bacteriën van de coligroep vaker waargenomen in de zomer. Als in de herfst en winter de watertemperatuur weer daalt, zal de afname van de bacteriën van de coligroep echter traag zijn, waardoor ook in het najaar en begin van de winter bacteriën van de coligroep worden waargenomen.

TABEL 8. RESULTATEN VAN DE GROEIPROEVEN VERGELEKEN MET DE INCUBATIETEMPERATUUR. GEGEVEN IS DE N_{max} IN DE GROEIPROEF, DE TOENAME IN LOG TUSSEN DAG 0 EN DAG 1 OF 2 (STERKSTE GROEI OF AFNAME), DE AFSTERVING IN LOG TUSSEN DE DAG WAAROP DE N_{max} IS GEMETEN EN DAG 27 EN TUSSEN DAG 0 EN DAG 27.

	N _{max} (kve/ml)		Groei dag 0-1 / 2 (log)		Afsterving N _{max} -dag 27 (log)		Afsterving dag 0-27 (log)	
	9 °C	18 °C	9 °C	18 °C	9 °C	18 °C	9 °C	18 °C
Water A	1,3x10 ³	1,2x10 ³	-0,2	-0,2	-0,9	-0,9	-0,9	-0,9
Water B	1,1x10 ³	1,4x10 ³	-0,1	-0,2	-0,8	-0,9	-0,8	-0,9
Water, combi A	1,6x10 ³	1,6x10 ³	-1,2	-1,6	-1,3	-3,0	-1,3	-3,0
Water, combi B	1,3x10 ³	1,5x10 ³	-0,7	-1,5	-1,8	-2,1	-1,8	-2,1
Zand, combi A	2,3x10 ³	5,3x10 ³	0,4	0,5	-0,1	-1,6	-0,1	-0,9
Zand, combi B	2,3x10 ³	4,7x10 ³	0,5	0,6	-0,4	-1,5	-0,4	-0,8

6 Discussie

6.1 Invloed van watertemperatuur op groei en overleving van bacteriën van de coligroep

Uit zowel de analyse van de historische gegevens van PWN en HWL als de groeiproeven blijkt dat de watertemperatuur, of een factor die hiermee covarieert, van invloed is op de aantallen en het aantreffen van bacteriën van de coligroep in het effluent van de filters of op de groei van deze bacteriën in de groeiproeven. De temperatuur lijkt dus een belangrijke rol te spelen bij de groei, overleving en afsterving van bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal. Op basis van de resultaten kan echter niet worden geconcludeerd of de temperatuur inderdaad de (enige) factor is die een toename in groei kan veroorzaken. In de praktijksituatie bij Bergen en Mensink kan bijvoorbeeld ook een factor die met de watertemperatuur varieert de groei van bacteriën van de coligroep beïnvloeden. Een mogelijkheid is bijvoorbeeld verandering in de aanwezige nutriënten in het water tussen de seizoenen.

6.2 Dynamiek van aantallen bacteriën van de coligroep in groeiproeven

In de flessen met water en filtermateriaal is de afname en toename van het aantal bacteriën van de coligroep in het water sterker dan in de flessen waarin alleen water aanwezig is. Deze versterkte afname kan verschillende oorzaken hebben. Zo kunnen bacteriën uit het water hechten aan het filtermateriaal en uit het water verdwijnen. Er zou dan echter een stijging zichtbaar moeten zijn in het aantal bacteriën in het filtermateriaal. Deze toename wordt echter niet gelijktijdig waargenomen met de afname van bacteriën van de coligroep in het water. Een andere optie is dat de versterkte afname wordt veroorzaakt door competitie om nutriënten en/of predatie. Voor de groeiproef is niet-gepasteuriseerd water en filtermateriaal gebruikt waarin de natuurlijke microbiële populatie aanwezig is. In het filtermateriaal zijn daardoor ook andere bacteriesoorten en ongewervelde dieren, zoals amoeben, aanwezig. Wanneer andere bacteriesoorten effectiever zijn in opname van de nutriënten, dan kunnen de bacteriën van de coligroep mogelijk te weinig voedingsstoffen benutten om hun cel intact te houden, waardoor ze af zullen sterven. Daarnaast voeden ongewervelde dieren zich mogelijk met bacteriën van de coligroep waardoor de aantallen ook afnemen.

De vermoedelijke oorzaak voor de tussentijdse toename van het aantal bacteriën van de coligroep in het water van de groeiproeven is zogenaamde 'cryptic growth'. Dit houdt in dat in de eerste dagen van de groeiproef een deel van de aanwezige biomassa afsterft, waardoor het nutriëntgehalte in het water stijgt en de nog levende bacteriën, waaronder de gedoseerde bacteriën van de coligroep, hier tijdelijk op kunnen groeien. Als dit voedsel op is, na 6 of 13 dagen, sterven de bacteriën van de coligroep alsnog af. Het is onwaarschijnlijk dat de tussentijdse groei van de bacteriën van de coligroep wordt veroorzaakt door groei van deze bacteriën die op voedingsstoffen die in het water en/of filtermateriaal aanwezig zijn. Indien de bacteriën hiertoe in staat zouden zijn, had er meteen na de start van de groeiproef, vanaf dag 0 of 1, groei plaats moeten vinden, wat niet is waargenomen. De vertraging kan echter ook mogelijk veroorzaakt worden doordat de bacteriën van de coligroep een lagfase nodig hebben na inoculatie, om bijvoorbeeld de juiste enzymen aan te maken, voordat ze zich onder de laboratoriumcondities van de groeiproeven kunnen vermeerderen.

Het is niet waarschijnlijk dat deze cryptic growth of de lagfase in de praktijksituatie optreedt, waar het filterbed continu wordt doorstroomd. Door de continue waterstroom wordt continu

voedsel aangeleverd en zal weinig dode biomassa aanwezig zijn, ook omdat dode biomassa deels wordt uitgespoeld. Nog aanwezige, levende bacteriën kunnen dit daarom niet gebruiken als voedselbron voor de eigen groei. De aanwezige bacteriën in het zandfilter van de voorfiltratie zijn daarnaast al aangepast aan de condities van het zandfilter, waardoor ze geen lagfase meer laten zien.

6.3 Groei en overleving van bacteriën van de coligroep in de groeiproeven

In de eerste twee tot zes dagen groeit het aantal bacteriën van de coligroep in het filtermateriaal, maar niet in het water. Na deze groeifase dalen de bacterieaantallen langzaam en sterven ze dus af. De groei van bacteriën van de coligroep in het filter is echter beperkt en het aantal bacteriën van de coligroep komt niet hoger dan 4700 kve/gram filtermateriaal. Na deze groei zal een groot deel van de voedingsstoffen die bij de start van de groeigroef aanwezig waren, zijn opgebruikt. In de groeiproef zijn hoge aantallen bacteriën gedoseerd om zo, naast groei, ook afsterving van de bacteriën te kunnen monitoren. Een nadeel hiervan is dat de logrange (dichtheidsbereik) waarover de bacteriën van de coligroep toenemen tijdens de groei beperkt is. Zeer waarschijnlijk zal bij een lagere startdoserings een hogere logtoename van het aantal bacteriën van de coligroep door groei worden waargenomen, maar zal het maximumaantal dat hierbij bereikt wordt vergelijkbaar zijn. Dit komt doordat de bacteriën voor de toename in het lage bereik (van b.v. 10 naar 1.000 kve/gr) een verwaarloosbare hoeveelheid nutriënten nodig heeft in vergelijking met de toename in het hoge bereik (van b.v. 1.000 naar 10.000 kve/gr).

De bacteriën van de coligroep sterven langzaam af in het filtermateriaal, terwijl de afsterving in het water sneller gaat. Echter, na 27 dagen is de totale afsterving in het filtermateriaal beperkt, waarbij de afsterving bij 18°C sneller is dan bij 9°C, en zijn de aantallen maximaal 1 log (grootteorde) lager dan de startconcentratie. Er overleven dus relatief veel bacteriën van de coligroep in het filtermateriaal tijdens de groeiproef. Voor de praktijksituatie betekent dit dat als een bacterie van de coligroep zich heeft gevestigd in het filtermateriaal, deze kan gaan groeien en vervolgens maar moeilijk te verwijderen is doordat de afsterving langzaam verloopt. Door aanpassingen in de bedrijfsvoering door te voeren, zoals bijvoorbeeld het terugspoelregime van de filters, wordt mogelijk een groter deel van de bacteriën van de coligroep verwijderd. De effectiviteit van het optimaliseren van het terugspoelregime en ander aanpassingen moet verder worden onderzocht. Zo lijkt het dat in de praktijk de coliformen niet evenredig over de verschillende zandfilters uitspoelen maar dat van sommige zandfilters meer bacteriën van de coligroep uitspoelen dan van andere filters. Wat hiervoor de reden is, is echter onduidelijk. Meer kennis van de oorzaken voor het uitspoelen van de bacteriën kan daarbij helpen. Indien het optimaliseren van de bedrijfsvoering niet werkt, kan het extern reinigen of het vervangen van het filtermateriaal mogelijk de enige optie zijn om de bacterie kwijt te raken. Er moet dan uiteraard wel worden voorkomen dat het filtermateriaal opnieuw besmet kan raken met (hoge aantallen) bacteriën van de coligroep. Een mogelijkheid is om van enkele zandfilters het filtermateriaal te vervangen en deze intensief te monitoren voor het vóórkomen en uitspoelen van bacteriën van de coligroep. Op deze manier kan getest worden of het vervangen van het filtermateriaal effectief is en hoe lang de filters schoon gehouden kunnen worden. Voordat deze maatregel wordt toegepast wordt echter aanbevolen om eerst meer onderzoek te doen naar de oorzaak van de groei van bacteriën van de coligroep en of aanpassingen in de bedrijfsvoering mogelijk zijn en effect hebben.

6.4 Typering van bacteriën van de coligroep met MALDI-TOF

6.4.1 Groeiproeven

Van de bacteriestammen die voor de groeiproeven zijn gebruikt, hebben twee stammen een MALDI-TOF score boven de 2,0 (*Buttiauxella*, *Citrobacter*). De andere drie stammen hebben bij de start een MALDI-TOF score rond de 1,7 – 1,8. Dit heeft gevolgen voor de betrouwbaarheid van de typering van de kolonies uit de groeiproeven. Van een redelijk groot deel van de bevestigingen verschillen de twee typering van één kolonie van elkaar of is er van één van de twee typering geen resultaat beschikbaar. Daarnaast lijkt het merendeel van de resultaten een MALDI-TOF score onder de 2,0 te hebben. Dit verklaart waarschijnlijk waarom de gedoseerde coliformstammen, zeker die met een lage MALDI-TOF score, niet allemaal en in de verwachte aantallen worden teruggevonden op dag 0. Door de lage MALDI-TOF score kunnen deze stammen soms als een andere bacteriestam getypeerd zijn. Op basis van deze resultaten kan daarom niet worden gezegd of één van de bacteriestammen beter groeit in water en filtermateriaal dan andere bacteriestammen.

Om meer zekerheid te hebben over welke bacteriestammen zijn gebruikt om de groeiproef te starten, kunnen DNA-technieken worden gebruikt en wordt aanbevolen om van deze bacteriestammen het 16S rRNA gen of andere huishoudgenen te sequencen. Op basis van dergelijke technieken kan dan betrouwbaarder worden achterhaald welke stammen zijn aangeleverd door HWL, welke stammen vanuit de entflessen aan de groeiproeven zijn gedoseerd en hoe dit zich verhoudt tot de typering met de MALDI-TOF. Daarnaast kan microbiële profilering op basis van het 16S rRNA-gen met Next Generation Sequencing in betrekkelijk korte tijd worden uitgevoerd. Hiermee kan een betrouwbare analyse gedaan worden van de relatieve abundantie van alle bacteriesoorten in een monster. Bovendien geven deze analyses een beeld van de andere (niet coligroep) bacteriën in het monster, wat aanvullende informatie oplevert over bijvoorbeeld de groeiomstandigheden in filtermateriaal en water, en over soorten die al dan niet tegelijkertijd voorkomen.

6.4.2 MALDI-TOF typering vergeleken met traditionele bevestiging

Voor het gebruik in de praktijk, om kolonies op LSA-platen te bevestigen en te typeren als bacteriën van de coligroep, lijkt de MALDI-TOF methode gevoeliger te zijn dan de traditionele bevestiging met de oxidase-bepaling. Als voor de bevestiging wordt overgegaan van de traditionele bevestiging naar typering met de MALDI-TOF is het daarom zeer waarschijnlijk dat meer bacteriën van de coligroep worden gevonden dan voor deze overgang. Hierdoor zou het kunnen lijken alsof bacteriën van de coligroep vaker en in hogere aantallen aanwezig zijn, terwijl in werkelijkheid aan de situatie niets veranderd is. De geanalyseerde historische gegevens waren tot en met 2016, toen nog met kweek werd bevestigd. De hier gevonden toename over de jaren is dus geen gevolg van een verandering in bevestigingsmethode. Pas vanaf 2017 wordt bevestiging met MALDI-TOF toegepast; daarom is het zeker de moeite waard om de gegevens uit 2017 te vergelijken met de eerdere historische gegevens, om na te gaan in hoeverre een andere bevestigingsmethode effect heeft op de resultaten.

De resultaten van de MALDI-TOF laten zien dat deze methode onvoldoende in staat is om kolonies van bacteriën van de coligroep betrouwbaar tot soortsniveau te typeren. In de nabije toekomst wordt een uitgebreid ringonderzoek uitgevoerd voor MALDI-TOF bevestiging door de Nederlandse drinkwaterlaboratoria (gecoördineerd door KWR). Hierbij worden goed geïdentificeerde stammen (referentiestammen of stammen geïdentificeerd met sequencing van het 16S rRNA gen) van bacteriën uit gerenommeerde cultuurcollecties (waaronder bacteriën van de coligroep) en stammen uit drinkwater bevestigd met de MALDI-TOF methode en vergeleken met de traditionele bevestigingsmethodes.

7 Conclusies en aanbevelingen

7.1 Conclusies

7.1.1 Groei van bacteriën van de coligroep in zandfilters

Er is een duidelijke positieve correlatie tussen een hogere temperatuur, of factoren die hiermee covariëren, en het aantreffen van bacteriën uit de coligroep in de zandfilters van de voorzuivering bij pompstations Bergen en Mensink. In de tweede helft van het jaar worden het vaakst bacteriën van de coligroep aangetroffen en zijn de aantallen het hoogst. Dit verband kan veroorzaakt worden door een directe respons op de temperatuur, maar het is ook mogelijk dat een andere groeifactor covarieert met temperatuur, zoals bepaalde voedingsstoffen.

Bacteriën van de coligroep kunnen groeien in flessen met daarin influent van de snelle zandfilters en filtermateriaal van ps. Bergen. De groeiproeven hebben aangetoond dat een hogere temperatuur leidt tot een hogere groeiopbrengst. Afsterving verloopt langzaam en na 27 dagen zijn er nog grote aantallen bacteriën van de coligroep aanwezig in het water en filtermateriaal.

Op basis van het verband tussen temperatuur en aantreffen van bacteriën van de coligroep in het effluent van de zandfilters en de waargenomen groei van verschillende stammen van bacteriën van de coligroep in het filtermateriaal (gemengd met water) wordt geconcludeerd dat de condities in de zandfilters van de voorzuivering bij ps Bergen (en waarschijnlijk ook ps Mensink) dusdanig zijn dat vermeerdering van bacteriën van de coligroep op het filtermateriaal in de zomer kan optreden.

7.1.2 Typering van bacteriën van de coligroep met MALDI-TOF

De twee gedoseerde bacteriestammen *Buttiauxella* en *Citrobacter* zijn de meest voorkomende bacteriestammen in de groeiproeven. De andere drie gedoseerde stammen (*Raoutella*, *Klebsiella* en *Kosakonia*) komen in mindere mate voor en het vóórkomen varieert sterk tussen de verschillende condities en in de tijd. Het onregelmatig aantreffen van deze drie stammen wordt veroorzaakt door de lage MALDI-TOF score van deze bacteriestammen waardoor de typering tot genusniveau minder betrouwbaar is. Op basis van deze resultaten kan met de MALDI-TOF van slechts enkele kolonies van bacteriën van de coligroep een betrouwbare typering tot genus- of soortsniveau te worden uitgevoerd.

7.2 Aanbevelingen

Om meer zicht te krijgen op de correlatie tussen hogere temperatuur en het aantreffen van bacteriën van de coligroep in pompstations Bergen en Mensink, en de achterliggende oorzaak, is het aan te bevelen om aanvullende experimenten te doen naar het effect van de watersamenstelling in de tijd op het voorkomen van bacteriën uit de coligroep. Naast de watertemperatuur kunnen verschillen in de watersamenstelling tussen de winter en zomer effect hebben op de groei van bacteriën van de coligroep in water en filtermateriaal. Het is daarom aan te raden hiervoor een vergelijkbare aanvullende groeiproef uit te voeren met water en filtermateriaal dat in de winter verkregen is.

Indien de bacteriën van de coligroep aanwezig blijven in de filters en de aantallen blijven stijgen, wordt aanbevolen om te onderzoeken of aanpassingen in de bedrijfsvoering,

bijvoorbeeld het terugspoelregime, helpen om de bacterie kwijt te raken. Meer kennis over de oorzaken van het uitspoelen van de bacteriën kan daarbij helpen.

Onbekend is in hoeverre de bacteriën van de coligroep gehecht zijn aan het filtermateriaal en hoe makkelijk ze met behulp van een terugspoeling los laten. Dit zou verder onderzocht moeten worden en deze informatie kan helpen om de bedrijfsvoering verder te optimaliseren. Indien optimalisatie van het terugspoelregime niet werkt is het extern reinigen of het vervangen van het filtermateriaal mogelijk de enige optie om de bacteriën kwijt te raken. Er moet vervolgens voorkomen worden dat het filtermateriaal opnieuw besmet kan raken met (hoge aantallen) bacteriën van de coligroep. Omdat dit een grote ingreep is, wordt aanbevolen eerst van enkele filterbedden het materiaal te vervangen en het effluent intensief te monitoren. Op deze manier kan worden nagegaan of de ingreep werkt en of en hoe lang het filtermateriaal schoon van bacteriën van de coligroep kan worden gehouden.

Om na te gaan in hoeverre een andere bevestigingsmethode effect heeft op de resultaten zouden gegevens uit 2017 vergeleken kunnen worden met de eerdere historische gegevens.

Tenslotte is het zinvol om de samenstelling van de bacteriepopulatie in de groeiproeven te bepalen en in te kaart brengen of, en zo ja welke, andere bacteriestammen groeien in water en filtermateriaal. Hiervoor dient op het materiaal dat van de groeiproeven is bewaard een microbiële profilering te worden uitgevoerd met NGS (Next Generation Sequencing).

Bijlage I Resultaten MALDI-TOF typering

Typering van kolonies die in de groeiproeven zijn gevonden. Gegeven is van hoeveel kolonies per meetdag een betrouwbaar MALDI-TOF resultaat is behaald en tot welk genus de kolonies behoren. De eerste kolom bij totaal geeft het totaal aantal gevonden kolonies van de desbetreffende bacteriegenus over alle groeiproefcondities weer, terwijl de tweede kolom het totaal aantal kolonies weergeeft van de desbetreffende bacteriegenus van het getoonde groei-experiment.

Water A 9°C			Aantal keer gevonden						
			Totaal	dag 0	dag 1	dag 2	dag 6	dag 13	dag 27
Acinetobacter	1	0	0	0	0	0	0	0	
Aeromonas	5	0	0	0	0	0	0	0	
Buttiauxella	350	33	8	4	2	2	9	8	
Citrobacter	171	9	2	3	2	0	2	0	
Cronobacter	18	2	0	1	0	1	0	0	
Enterobacter	134	12	3	1	1	2	2	3	
Escherichia	8	1	0	0	0	0	0	1	
Klebsiella	54	9	0	1	2	4	0	2	
Kosakonia	40	1	0	0	1	0	0	0	
Ledercia	8	2	1	1	0	0	0	0	
Pseudomonas	1	0	0	0	0	0	0	0	
Raoultella	33	4	0	1	2	1	0	0	
Salmonella	1	1	0	0	1	0	0	0	
Totaal	824	74	14	12	11	10	13	14	

Water A 18°C			Aantal keer gevonden						
	Totaal		dag 0	dag 1	dag 2	dag 6	dag 13	dag 27	
Acinetobacter	1	0	0	0	0	0	0	0	
Aeromonas	5	0	0	0	0	0	0	0	
Buttiauxella	350	36	3	9	5	6	5	8	
Citrobacter	171	12	4	2	3	0	3	0	
Cronobacter	18	2	0	0	1	1	0	0	
Enterobacter	134	7	2	0	0	0	1	4	
Escherichia	8	0	0	0	0	0	0	0	
Klebsiella	54	4	1	0	0	2	0	1	
Kosakonia	40	6	2	0	1	2	1	0	
Ledercia	8	2	0	0	1	1	0	0	
Pseudomonas	1	0	0	0	0	0	0	0	
Raoultella	33	4	1	1	0	0	2	0	
Salmonella	1	0	0	0	0	0	0	0	
Totaal	824	73	13	12	11	12	12	13	

Water B 9°C	Aantal keer gevonden						
	Totaal	dag 0	dag 1	dag 2	dag 6	dag 13	dag 27
Acinetobacter	1 0	0	0	0	0	0	0
Aeromonas	5 0	0	0	0	0	0	0
Buttiauxella	350 27	5	1	4	4	6	7
Citrobacter	171 12	3	3	2	1	2	1
Cronobacter	18 2	0	0	0	2	0	0
Enterobacter	134 20	5	5	2	1	6	1
Escherichia	8 2	0	1	0	0	0	1
Klebsiella	54 8	0	1	4	2	0	1
Kosakonia	40 2	1	0	1	0	0	0
Leclercia	8 0	0	0	0	0	0	0
Pseudomonas	1 0	0	0	0	0	0	0
Raoultella	33 3	1	2	0	0	0	0
Salmonella	1 0	0	0	0	0	0	0
Totaal	824 76	15	13	13	10	14	11

Water B 18°C	Aantal keer gevonden						
	Totaal	dag 0	dag 1	dag 2	dag 6	dag 13	dag 27
Acinetobacter	1 0	0	0	0	0	0	0
Aeromonas	5 0	0	0	0	0	0	0
Buttiauxella	350 39	6	7	9	5	6	6
Citrobacter	171 11	2	3	2	1	2	1
Cronobacter	18 0	0	0	0	0	0	0
Enterobacter	134 12	2	2	0	4	3	1
Escherichia	8 0	0	0	0	0	0	0
Klebsiella	54 2	1	0	1	0	0	0
Kosakonia	40 4	1	0	1	2	0	0
Leclercia	8 0	0	0	0	0	0	0
Pseudomonas	1 0	0	0	0	0	0	0
Raoultella	33 1	1	0	0	0	0	0
Salmonella	1 0	0	0	0	0	0	0
Totaal	824 69	13	12	13	12	11	8

Combi A water 9°C	Aantal keer gevonden						
	Totaal	dag 0	dag 1	dag 2	dag 6	dag 13	dag 27
Acinetobacter	1 1	0	0	1	0	0	0
Aeromonas	5 2	0	1	1	0	0	0
Buttiauxella	350 28	2	4	7	7	0	8
Citrobacter	171 13	4	2	0	3	4	0
Cronobacter	18 2	0	2	0	0	0	0
Enterobacter	134 14	3	2	0	1	5	3
Escherichia	8 0	0	0	0	0	0	0
Klebsiella	54 3	1	0	2	0	0	0
Kosakonia	40 4	2	0	1	1	0	0
Leclercia	8 1	0	0	0	0	0	1
Pseudomonas	1 0	0	0	0	0	0	0
Raoultella	33 1	0	0	0	0	1	0
Salmonella	1 0	0	0	0	0	0	0
Totaal	824 69	12	11	12	12	10	12

Combi A water 18°C	Aantal keer gevonden						
	Totaal	dag 0	dag 1	dag 2	dag 6	dag 13	dag 27
Acinetobacter	1 0	0	0	0	0	0	0
Aeromonas	5 0	0	0	0	0	0	0
Buttiauxella	350 18	5	3	2	5	2	1
Citrobacter	171 12	4	0	0	2	1	5
Cronobacter	18 1	0	0	0	1	0	0
Enterobacter	134 7	0	2	0	3	2	0
Escherichia	8 0	0	0	0	0	0	0
Klebsiella	54 3	0	1	0	0	2	0
Kosakonia	40 8	0	0	6	2	0	0
Leclercia	8 1	1	0	0	0	0	0
Pseudomonas	1 0	0	0	0	0	0	0
Raoultella	33 3	1	0	0	1	0	1
Salmonella	1 0	0	0	0	0	0	0
Totaal	824 53	11	6	8	14	7	7

Combi A zand 9°C		Aantal keer gevonden						
		Totaal	dag 0	dag 1	dag 2	dag 6	dag 13	dag 27
Acinetobacter	1 0	0	0	0	0	0	0	
Aeromonas	5 1	0	0	0	0	1	0	
Buttiauxella	350 33	4	6	4	4	7	8	
Citrobacter	171 11	2	3	2	2	1	1	
Cronobacter	18 3	2	0	1	0	0	0	
Enterobacter	134 15	5	1	3	2	3	1	
Escherichia	8 0	0	0	0	0	0	0	
Klebsiella	54 5	1	2	1	0	1	0	
Kosakonia	40 0	0	0	0	0	0	0	
Leclercia	8 1	0	0	0	1	0	0	
Pseudomonas	1 0	0	0	0	0	0	0	
Raoultella	33 2	0	0	1	1	0	0	
Salmonella	1 0	0	0	0	0	0	0	
Totaal	824 71	14	12	12	10	13	10	

Combi A zand 18°C		Aantal keer gevonden						
	Totaal	dag 0	dag 1	dag 2	dag 6	dag 13	dag 27	
Acinetobacter	1 0	0	0	0	0	0	0	
Aeromonas	5 0	0	0	0	0	0	0	
Buttiauxella	350 24	3	6	5	8	0	2	
Citrobacter	171 21	4	1	2	3	0	11	
Cronobacter	18 4	1	0	3	0	0	0	
Enterobacter	134 5	2	1	1	1	0	0	
Escherichia	8 0	0	0	0	0	0	0	
Klebsiella	54 4	1	2	1	0	0	0	
Kosakonia	40 3	1	0	2	0	0	0	
Leclercia	8 0	0	0	0	0	0	0	
Pseudomonas	1 0	0	0	0	0	0	0	
Raoultella	33 2	2	0	0	0	0	0	
Salmonella	1 0	0	0	0	0	0	0	
Totaal	824 63	14	10	14	12	0	13	

Combi B water 9°C	Aantal keer gevonden						
	Totaal	dag 0	dag 1	dag 2	dag 6	dag 13	dag 27
Acinetobacter	1 0	0	0	0	0	0	0
Aeromonas	5 0	0	0	0	0	0	0
Buttiauxella	350 23	5	4	3	7	2	2
Citrobacter	171 14	4	2	2	2	4	0
Cronobacter	18 1	1	0	0	0	0	0
Enterobacter	134 13	2	4	0	0	3	4
Escherichia	8 2	0	0	0	0	1	1
Klebsiella	54 5	0	1	1	1	1	1
Kosakonia	40 7	0	0	0	2	1	4
Leclercia	8 0	0	0	0	0	0	0
Pseudomonas	1 0	0	0	0	0	0	0
Raoultella	33 8	1	1	2	1	2	1
Salmonella	1 0	0	0	0	0	0	0
Totaal	824 73	13	12	8	13	14	13

Combi B water 18°C	Aantal keer gevonden						
	Totaal	dag 0	dag 1	dag 2	dag 6	dag 13	dag 27
Acinetobacter	1 0	0	0	0	0	0	0
Aeromonas	5 1	0	1	0	0	0	0
Buttiauxella	350 23	5	4	2	7	1	4
Citrobacter	171 19	4	1	2	2	0	10
Cronobacter	18 0	0	0	0	0	0	0
Enterobacter	134 11	2	3	3	3	0	0
Escherichia	8 1	0	0	0	0	1	0
Klebsiella	54 4	0	1	3	0	0	0
Kosakonia	40 1	0	0	1	0	0	0
Leclercia	8 0	0	0	0	0	0	0
Pseudomonas	1 0	0	0	0	0	0	0
Raoultella	33 2	1	1	0	0	0	0
Salmonella	1 0	0	0	0	0	0	0
Totaal	824 62	12	11	11	12	2	14

Combi B zand 9°C	Aantal keer gevonden						
	Totaal	dag 0	dag 1	dag 2	dag 6	dag 13	dag 27
Acinetobacter	1 0	0	0	0	0	0	0
Aeromonas	5 0	0	0	0	0	0	0
Buttiauxella	350 29	2	7	6	5	6	3
Citrobacter	171 14	4	1	2	3	3	1
Cronobacter	18 1	0	0	1	0	0	0
Enterobacter	134 10	2	2	0	0	1	5
Escherichia	8 1	0	0	0	0	1	0
Klebsiella	54 4	3	0	1	0	0	0
Kosakonia	40 2	2	0	0	0	0	0
Leclercia	8 0	0	0	0	0	0	0
Pseudomonas	1 1	0	0	0	0	0	1
Raoultella	33 2	0	2	0	0	0	0
Salmonella	1 0	0	0	0	0	0	0
Totaal	824 64	13	12	10	8	11	10

Combi B zand 18°C		Aantal keer gevonden						
	Totaal	dag 0	dag 1	dag 2	dag 6	dag 13	dag 27	
Acinetobacter	1 0	0	0	0	0	0	0	
Aeromonas	5 1	0	0	0	0	0	1	
Buttiauxella	350 37	4	7	8	5	9	4	
Citrobacter	171 22	3	2	3	4	2	8	
Cronobacter	18 0	0	0	0	0	0	0	
Enterobacter	134 8	3	0	1	1	2	1	
Escherichia	8 1	1	0	0	0	0	0	
Klebsiella	54 3	0	1	2	0	0	0	
Kosakonia	40 2	0	0	0	2	0	0	
Leclercia	8 1	0	1	0	0	0	0	
Pseudomonas	1 0	0	0	0	0	0	0	
Raoultella	33 1	0	0	0	0	1	0	
Salmonella	1 0	0	0	0	0	0	0	
Totaal	824 76	11	11	14	12	14	14	