

**Campus De Nayer**

**Departement Industriële  
Ingenieurswetenschappen**

THOMAS  
**MORE**

Master in de industriële wetenschappen: Biochemie

# Detectie van voedselpathogenen in proceswater in de primaire sector

Masterproef voorgedragen tot  
het behalen van de beroepstitel  
van industrieel ingenieur.

Door: **Lien Bosmans**

Promotor: **Dr. ir. Hans Rediers**

Promotor bedrijf: **Ing. Eef Vankerckhoven**

**Academiejaar 2012-2013**













**Campus De Nayer**

**Departement Industriële  
Ingenieurswetenschappen**

THOMAS  
**MORE**

Master in de industriële wetenschappen: Biochemie

# Detectie van voedselpathogenen in proceswater in de primaire sector

Masterproef voorgedragen tot  
het behalen van de beroepstitel  
van industrieel ingenieur.

**Academiejaar 2012-2013**

Door: **Lien Bosmans**

Promotor: **Dr. ir. Hans Rediers**

Promotor bedrijf: **Ing. Eef Vankerckhoven**









## **DANKWOORD**

Hier wil ik graag alle mensen bedanken die me op een of andere manier geholpen hebben bij het uitvoeren van mijn stage en het schrijven van mijn masterthesis. Allereerst gaat mijn dank uit naar mijn promotor, Hans Rediers die me de gelegenheid gaf mijn stage te volbrengen in Scientia terrae. Dankzij hem kreeg ik de gelegenheid me verder te verdiepen in de moleculaire gentechnologie. Met een telefoontje of een mailtje kon ik altijd met mijn vragen bij jou terecht. Dankjewel ook voor het gedetailleerd nalezen van mijn eindwerk en de tips en suggesties bij het schrijven. Dankjewel ook aan mijn begeleidster Eef Vankerckhoven voor alle uitleg bij het praktische werk in het labo! Bedankt voor de leuke samenwerking. Dankzij jou leerde ik de wereld van de microbiologie beter kennen. Succes als mama van de kleine Stanne! Christophe en Stef, zonder jullie was het hybridiseren me nooit gelukt! Christel en Marijke, met onduidelijkheden over het microbiologische werk kwam ik heel graag met mijn vragen naar jullie, merci! Ook Pieter wil ik bedanken voor de hulp bij het clusteren van de resultaten. Verder wil ik graag alle andere labmedewerkers bedanken voor de leuke samenwerking, het beantwoorden van vragen en oplossen van praktische problemen in het labo. Nog een extra bedanking voor Ken! Na 5 jaar samen gestudeerd te hebben was het echt leuk om deze stage in hetzelfde labo als jou te doen! Dankje voor het luisterd oor en de fijne babbels! Wie had gedacht dat we collega's zouden worden! Een speciale dank gaat uit naar mijn ouders voor de kansen en mogelijkheden die ze me hebben gegeven. Toen ik beslist had om via een schakeljaar aan de studie van industrieel ingenieur te starten zijn ze steeds in mij blijven geloven! Als ik 's avonds thuis kwam kon ik steeds mijn verhaal bij jullie doen! Dankjewel hiervoor! Mijn allerlaatste woordje van dank richt ik tot mijn zussen Tine, Sara en vriend Ruben. Jullie zorgden voor zotte momenten, leuke babbels, de nodige ontspanning waardoor ik elke dag weer het best van mezelf heb kunnen geven.

Dankjewel allemaal!  
Lien  
Juni 2013

© 2013, Lien Bosmans

De auteur geeft de toelating deze tekst op papier en digitaal voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor eigen gebruik. Elk ander gebruik valt onder de strikte beperkingen van het auteursrecht. In het bijzonder wordt gewezen op de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van tekstdelen.



## SAMENVATTING

In deze masterproef werd de microbiologische kwaliteit van groenten en fruit en van het proceswater (grond-, hemel-, put- en leidingwater) gebruikt in de groente- en fruitteelt onderzocht. Enkele microbiologische parameters werden met behulp van klassieke uitplatingsmethoden bepaald. Zowel water- als productstalen werden geanalyseerd op aanwezigheid van *Salmonella* spp., *Escherichia coli* en *Listeria monocytogenes*. Daarnaast werd ook het mesofiel aeroob kiemgetal en het aantal coliformen bepaald. Door het arbeidsintensief karakter is het echter niet haalbaar om een groot aantal relevante voedselpathogenen of indicator-organismen te detecteren. Daarom werd in een eerste deel van deze masterproef een DNA-array detectietechniek ontwikkeld. Met behulp van deze DNA-array kan in principe een onbeperkt aantal micro-organismen gedetecteerd worden. In deze masterproef werd de DNA-array op punt gesteld voor de volgende bacteriën: *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Flavobacterium* spp., *Legionella* spp. en *Aeromonas* spp. Per doelwitorganisme werden de specificiteit en de deetectielimiet nagegaan.

In het tweede deel van deze masterproef werd de DNA-array ingezet om de microbiologische kwaliteit van een groot aantal groente-, fruit- en waterstalen te analyseren. Naast de DNA-gebaseerde detectiemethode werden de stalen ook geanalyseerd met behulp van de klassieke uitplatingsmethoden. De prevalentie van *L. monocytogenes* was hoog in sorteewater van appels en peren en in waswater van prei en asperges. *E. coli* werd in zo'n 60% van de stalen teruggevonden. Hoge concentraties werden teruggevonden in regenwater en open putwater voor wat betreft aanvangswater. In het proceswater waren de concentraties het hoogst in het sorteewater van appels en peren en in het waswater van prei en asperges. Hetzelfde geldt ook voor het aantal coliformen en het totaal kiemgetal.

Algemeen beschouwd tonen de resultaten van deze masterproef aan dat de microbiologische kwaliteit van het water gebruikt in de groente- en fruitteelt weinig of geen risico inhoudt voor de voedselveiligheid.

**Trefwoorden:** DNA-array, validatie en deetectielimiet, voedselpathogenen, microbiële analyses

## ABSTRACT

In horticulture, water is used for several processes, e.g. crop irrigation, rinsing, and transport. During cultivation, harvest or post-harvest processes, bacterial pathogens present in process water, can be transmitted to the produce, and possibly pose a risk for consumers. To assess this risk, it is important to detect and identify pathogens in the process water. In this master thesis, the microbiological quality of fruits, vegetables and process water in horticulture is investigated. Five microbiological indicators were assessed using traditional microbiological plating techniques, i.e. *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, the level of mesophilic aerobic bacteria and coliforms. However, traditional plating methods are time-consuming, laborious, and its potential for multiplexing is limited. Therefore, the main objective of this master thesis was to develop a DNA array hybridization assay for reliable detection and identification of pathogens that are frequently found in water or are associated with fresh produce. The panel of target micro-organisms consisted of *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., and *Legionella* spp. Specificity and sensitivity of the assay was evaluated for each target pathogen, using pure cultures of reference strains.

In a second part of this master thesis, the DNA array was effectively used to assess the microbiological quality of water and produce samples. The analysis of over 100 actual process water samples taken in horticultural companies provide useful information regarding the microbiological quality of water used in horticulture. The prevalence of *L. monocytogenes* was high in sortingwater of apples and pears and washingwater of leek and asparagus. *E. coli* was found in about 60% of all the samples. High concentrations were found in rainwater and wellwater. In processwater, the concentrations were highest in the sortingwater of apples and pears and in washingwater of leek and asparagus. The same conclusions were found for coliforms and total mesophilic aerobic bacterial count.

The results of this thesis show that the microbiological quality of the water, used in the fruit and vegetable cultivation, have a little or no risk to foodsafety.

**Keywords:** DNA array, validation and detection limit, food pathogens, microbial analyzes

# INHOUDSTAFEL

<b>DANKWOORD</b> .....	<b>I</b>	
<b>SAMENVATTING</b> .....	<b>III</b>	
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>	
<b>INHOUDSTAFEL</b> .....	<b>V</b>	
<b>LIJST VAN AFKORTINGEN</b> .....	<b>VII</b>	
<b>1</b>	<b>LITERATUURSTUDIE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Inleiding</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Belangrijkste pathogenen op groenten en fruit</b> .....	<b>2</b>
1.2.1	Escherichia coli.....	3
1.2.2	Salmonella.....	3
1.2.3	Shigella.....	3
1.2.4	Campylobacter .....	4
1.2.5	Listeria monocytogenes .....	4
1.2.6	Norovirus .....	5
1.2.7	Rotavirus.....	5
1.2.8	Giardia lamblia.....	5
<b>1.3</b>	<b>Chemische contaminanten op groenten en fruit</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4</b>	<b>Incidenties van voedselinfecties</b> .....	<b>6</b>
1.4.1	België .....	6
1.4.2	Europa .....	9
1.4.3	Verenigde staten .....	14
1.4.4	Overzicht België- Europa- VS .....	15
<b>1.5</b>	<b>Contaminatiebronnen</b> .....	<b>16</b>
1.5.1	Water als contaminatiebron .....	16
1.5.2	Bemesting van groenten en fruit als contaminatiebron .....	20
1.5.3	Menselijke handelingen als contaminatiebron .....	21
<b>1.6</b>	<b>Overdracht van contaminanten in water op groenten en fruit</b> .....	<b>21</b>
<b>1.7</b>	<b>Regelgeving en normen</b> .....	<b>23</b>
1.7.1	Wetgeving en richtlijnen omtrent watergebruik in de primaire sector .....	23
1.7.2	Wetgeving en richtlijnen omtrent microbiologische kwaliteit van groenten en fruit .....	24
<b>1.8</b>	<b>Situering en doelstelling van de masterproef</b> .....	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAAL EN METHODEN</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Opgroei en bewaring van bacteriële stammen</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2</b>	<b>Microbiologische analyses</b> .....	<b>28</b>
2.2.1	Staalname .....	28
2.2.2	Kwantificatie van het aantal coliforme bacteriën .....	28
2.2.3	Kwantificatie van het mesofiel aëroob kiemgetal.....	30
2.2.4	Kwantificatie van <i>Escherichia coli</i> .....	30
2.2.5	Detectie van <i>Salmonella</i> .....	31
2.2.6	Detectie van <i>Listeria monocytogenes</i> .....	31
<b>2.3</b>	<b>DNA-extractie, PCR en agarose gelelektroforese van bacteriële stammen, water- en productstalen</b> .....	<b>33</b>
2.3.1	DNA-extractie voor waterstalen en bacteriële stammen .....	33
2.3.2	DNA-extractie voor productstalen .....	33
2.3.3	Polymerase chain reaction (PCR) .....	34
2.3.4	Agarosegelelektroforese .....	35

<b>2.4</b>	<b>Ontwikkeling en gebruik van de DNA-array.....</b>	<b>35</b>
2.4.1	Ontwikkeling van detectoroligonucleotiden .....	35
2.4.2	Immobilisatie van de oligonucleotiden op een membraan .....	36
2.4.3	Hybridisatie van de DNA-array .....	37
<b>3</b>	<b>RESULTATEN EN DISCUSSIE.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Inleiding.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Ontwikkeling en prevalidatie van de DNA-array .....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Ontwikkeling van detectoroligonucleotiden .....	40
3.2.2	Bepaling van de specificiteit van detectoroligonucleotiden .....	42
3.2.3	Bepaling van de detectielimiet van de detectoroligonucleotiden .....	47
3.2.4	Productie van de DNA-array.....	50
<b>3.3</b>	<b>In kaart brengen van de microbiologische kwaliteit van het water in de groenten- en fruitsector .....</b>	<b>51</b>
3.3.1	Microbiologische analyses aan de hand van klassieke uitplatingsmethoden .....	51
3.3.2	Microbiologische analyse met behulp van de DNA-array .....	52
<b>3.4</b>	<b>Opvolging van de microbiologische waterkwaliteit in een selectie van groenten- en fruitbedrijven .....</b>	<b>53</b>
3.4.1	Microbiologische analyses van water- en productstalen .....	53
3.4.2	Vergelijking tussen microbiologische analyses en DNA-array.....	58
3.4.3	Overzicht gemengde bedrijven met dieren- en groententeelt .....	59
3.4.4	Bacteriën per watertype .....	59
3.4.5	Bacteriën in groente- en fruitsector .....	61
<b>4</b>	<b>ALGEMEEN BESLUIT .....</b>	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>REFERENTIES .....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>BIJLAGE .....</b>	<b>79</b>
<b>A</b>	<b>Resultaten water- en productstalen DNA-array .....</b>	<b>79</b>



## LIJST VAN AFKORTINGEN

ADH	Aanbevolen dagelijkse hoeveelheid
ALOA	Agar Listeria According to Ottaviani and Agosti
AP	Alkaline fosfatase
BGBB	Briljant Green Bile Broth
BPW	Gebufferd peptonwater
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CVTI	Collectieve voedseltoxi-infectie
DIG	digoxigenine
EAEC	Enterogregatieve <i>E. coli</i>
EFSA	European Food Safety Authority
EHEC	Enterohemorragische <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasieve <i>E. coli</i>
EPA	Environmental Protection Agency
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxigene <i>E. coli</i>
FAO	Food and agriculture organisation
FAVV	Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen
HUS	Hemolytisch uremisch syndroom
KVE	Kolonievormende eenheden
LSA	Lauryl Sulfaat Agar
MKTTN	Muller-Kaufmann Tetrathionate-Novobiocine bouillon
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase chain reaction
PFZ	Pepton fysiologische zoutoplossing
REC2A	Rapid'E.coli 2 Agar
Rsal	Rapid Salmonella
PFZ	Pepton fysiologische zoutoplossing
RVS	Rappaport Vassiliadis Soya
SDS	Natrium Dodecyl Sulfaat
SSC	Saline natriumcitraat
SOP	Standard operating procedure
TOC	Totale organic carbon
TSYE	Tryptone soy yeast extract agar
VRBL	Voilet Red Bile Lactose
WBBL	Warenbesluit Bereiding en behandeling van levensmiddelen
WC-FAVV	Wetenschappelijk comité federaal agentschap voor de veiligheid van de voedselketen
WHO	World health organisation
XLD	Xylose Lysine Desoxycholate



# 1 LITERATUURSTUDIE

## 1.1 Inleiding

Groenten en fruit leveren ons de nodige dosis van onze dagdagelijkse voedingsstoffen. Talrijke studies hebben aangetoond dat groenten en fruit op lange termijn de strijd aangaan met verschillende chronische ziekten zoals zwaarlijvigheid, hart- en vaatziekten en bepaalde vormen van kanker. Naast voedingsstoffen zoals mineralen, vitamines en vezels kunnen groenten en fruit ook microbiologische en chemische contaminanten bevatten (Beuchat, 2002). De meeste micro-organismen op groenten en fruit zijn niet schadelijk en kunnen zelfs gunstig zijn. Er zijn echter ook micro-organismen die kunnen leiden tot een voedselvergiftiging of een voedselinfectie bij mensen door het eten van groenten en fruit (FAO/WHO, 2008). Een voedselinfectie ontstaat wanneer er via drinkwater of voedsel ziekteverwekkende bacteriën worden opgenomen bij twee of meer patiënten. Dit veroorzaakt meestal, maar niet uitsluitend, een gastro-enteritisbeeld. In de hele wereld zijn er dagelijks mensen die voedselinfecties of voedselvergiftigingen oplopen door het consumeren van besmet voedsel. De laatste jaren zijn er steeds meer voedselvergiftigingen gerapporteerd die gerelateerd zijn aan de consumptie van verse groenten en fruit (Anderson *et al.*, 2011). Veel groenten- en fruitsoorten worden rauw geconsumeerd zonder een hitte inactivatie. Op deze manier worden aanwezige pathogenen niet verwijderd en hebben zij een grote kans hebben om een voedselinfectie te veroorzaken (Steele *et al.*, 2004). De contaminatie kan plaats vinden over de hele keten: van 'farm to fork'. De micro-organismen kunnen afkomstig zijn van niet bewerkte dierlijke meststoffen, de bodem, het oppervlaktewater, proceswater of menselijke handelingen (Peeters *et al.*, 2005). Een van de mogelijke besmettingsbronnen is het proceswater dat gebruikt wordt in de primaire sector van de plantaardige productie, meer bepaald voor de irrigatie, de verschillende wasstappen en het transporteren van de groenten en het fruit. Er is geen duidelijke regelgeving omtrent dit watergebruik bij groenten- en fruitteelt in België. De visies van het 'Food and Agriculture organisation' (FAO) en 'World health organisation' (WHO) die richtlijnen voor correct watergebruik en procesparameters vastleggen moeten herbekeken worden voor de Belgische situatie (FAO/WHO, 2008; WHO, 2006). Het FOD-project WaterQ zal nagaan wat de invloed is van de chemische en microbiologische kwaliteit van water dat gebruikt wordt in de primaire plantaardige sector op het risico voor voedselinfecties. In deze literatuurstudie worden de voornaamste pathogenen die voorkomen op groenten en fruit besproken. Nadien wordt een overzicht gegeven van het aantal voedselinfecties ten gevolge van groenten en fruit in België en in Europa. Vervolgens worden de verschillende contaminatiebronnen in de primaire sector en de overdracht van pathogenen op het product besproken. Tenslotte wordt een overzicht gegeven van de wetgeving en richtlijnen rond de microbiologische kwaliteit van water dat gebruikt wordt in de primaire sector.

## 1.2 Belangrijkste pathogenen op groenten en fruit

Het eerste artikel rond verse producten als een bron van menselijke voedselinfectie werd gepubliceerd door Creel (1912). Nadien zijn er een heel aantal voedsel-infecties geweest met als oorzaak verse producten zoals sla, spinazie, appels en kiemgroenten (Crepet *et al.*, 2007; Monaghan 2006; Sivapalasingam *et al.*, 2004). Verse groenten en fruit zijn in Europa verantwoordelijk voor ongeveer 10% van het totaal aantal voedseluitbraken (EFSA, 2012). De contaminatie van fruit en groenten kan zich op drie momenten voordoen, voor; tijdens en na de oogst. Via verwondingen en natuurlijke openingen op de schil kunnen er tijdens het wassen en inpakken van het fruit pathogenen zich in de vrucht vestigen (Adak *et al.*, 2002). Een andere manier van contaminatie is tijdens de opslag waarbij, door het contact tussen de verschillende stukken groenten of fruit, bacteriën overgedragen kunnen worden. Het aantal en de soort micro-organismen die terug te vinden zijn op verse groenten en fruit hangt af van de teeltwijze, de weersomstandigheden en de geografische regio (Beuchat, 2002). Dit kan ook afhangen van bepaalde interacties tussen plant en pathogeen (Lynch *et al.*, 2009). Bij groenten worden het vaakst Gram-negatieve bacteriën terug gevonden. Bij fruit komen schimmels en gisten meer voor. Het FAO heeft volgend overzicht (tabel 1) gemaakt van de belangrijkste humane pathogenen die voorkomen op groenten en fruit (FAO/WHO 2008).

Tabel 1: Overzicht humane pathogenen die kunnen voorkomen op groenten en fruit (FAO/WHO, 2008)

Product	Pathogeen
Tomaten	<i>Salmonella enterica</i>
Scheutgewassen	<i>Salmonella enterica</i> , enterohaemorrhagic <i>E. coli</i>
Bladgewassen	enterohaemorrhagic <i>E. coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Vibrio cholera</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , Hepatitis A, Norovirus, Rotovirus, Calicivirus
Ajuin en sjalot	enterohaemorrhagic <i>E. coli</i> , Hepatitis A, Norovirus
Wortelgewassen	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
Kruiden	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shigella sonnei</i>
Bessen	<i>Cryptosporidium parvuum</i> , <i>Cyclospora cayatenensis</i>
Meloenen	<i>Salmonella enterica</i>

In volgende paragrafen worden de voornaamste pathogenen die voorkomen op groenten en fruit besproken.

### 1.2.1 Escherichia coli

Deze bacterie behoort tot de groep van de *Enterobacteriaceae*. *E. coli* is een Gram-negatieve staafvormige bacterie die behoort tot de commensale darmflora. Het zijn facultatief anaërobe bacteriën. De ziekteverwekkende *E. coli* bacterie kan ingedeeld worden in vijf groepen: enterohemorragische *E. coli* (EHEC), enteroaggregatieve *E. coli* (EAEC), enteroinvasieve *E. coli* (EIEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxigene *E. coli* (ETEC) (Heaton *et al.*, 2007). Het belangrijkste EHEC serotype is O157:H7. Deze produceert een toxine dat het darmepitheel beschadigt (Tortora *et al.*, 2007). De symptomen die gepaard gaan met een EHEC-infectie zijn o.a. diarree en buikkrampen. Het hemolytisch uremisch syndroom (HUS) is een mogelijk gevolg van de EHEC-infectie. Dit wordt gekarakteriseerd door nierfalen (Berin *et al.*, 2002). De EPEC en ETEC worden ook weleens reizigersdiarree genoemd. Hierbij kan een waterige diarree tot uitdroging leiden. Vooral kinderen jonger dan 2 jaar worden hierdoor getroffen. Bij EIEC zijn de symptomen wisselend van waterige diarree met vaak bloed en slijm. Dit komt vooral voor in ontwikkelingslanden. Typisch voor de EAEC is dat door ontsteking van de darm bij kinderen groeivertraging kan optreden. Deze vorm is ook een belangrijke verwekker van reizigersdiarree (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998).

De bacterie wordt vooral teruggevonden op rauw rundsvlees en rauwe melk maar bij groenten wordt het teruggevonden op bladgewassen zoals sla, spinazie, andijvie en komkommer (Heaton *et al.*, 2007).

### 1.2.2 Salmonella

*Salmonella* behoort tot de Gram-negatieve en staafvormige bacteriën. Net zoals *E. coli* behoort deze bacterie tot de groep van de *Enterobacteriaceae*. Het genus wordt verdeeld in 2 species: *Salmonella enterica* en *Salmonella bongori*. *S. enterica* is de meest ziekteverwekkend pathogeen van beide die kan ingedeeld worden in verschillende subspecies. De meest voorkomende subspecies is *S. enterica subsp. Enterica* (Hammack, 2012). De besmetting door deze bacterie gebeurt faeco-oraal. De symptomen zijn misselijkheid, rillingen, koorts, buikkrampen, diarree, koorts en in sommige gevallen buiktyfus of bacteriëmie die tot totale uitputting kunnen leiden. Een *Salmonella*-infectie gaat vaak gepaard met darmontsteking. Belangrijk is dat besmette personen na herstel nog gezonde kiemdragers kunnen zijn en dus een potentiële besmettingsbron voor anderen zijn (EFSA *et al.*, 2007).

*Salmonella* komt voor op rauw vlees, gevogelte, eieren, melk en melkproducten, vis, garnalen, gisten, kokos, sauzen en dressings, gedroogde gelatine, pindakaas, cacao en chocolade. In fruit en groenten zal *Salmonella* het meest voorkomen op sla, spruiten, meloen en tomaten (Heaton *et al.*, 2007).

### 1.2.3 Shigella

*Shigella* behoort tot de Gram-negatieve bacteriën. Het zijn niet beweeglijke, niet sporenvormende staafvormige bacteriën. Het genoom van *shigella*-soorten is bijna identiek aan deze van *E. coli*. Er kan een overdracht van DNA zijn tussen *Shigella* en *E. coli* omdat ze gevoelig zijn voor dezelfde bacteriofagen (Tortora *et al.*, 2009). De soorten die een gezondheidsrisico inhouden voor de mens zijn

*Shigella sonnei*, *S. boydii*, *S. flexneri*, en *S. dysenteriae*. Bij alle *Shigella*-soorten komen na autolyse toxinen vrij die tot bacillaire dysenterie kunnen leiden (Lampel, 2012). De eerste symptomen van bacillaire dysenterie zijn koorts, buikkrampen en waterdunne diarree. Na enkele dagen kan de diarree zich ontwikkelen tot dysenterie. Kenmerkend voor dysenterie zijn bloed en slijm bij de dunne, waterige ontlasting (Hiller *et al.*, 2008). De letaliteit ligt voor *Shigella* in geïndustrialiseerde landen rond de 0,1%. Shigellose is meestal het gevolg van consumptie van voedsel of water gecontamineerd door menselijke faeces (CDC, 2005).

*Shigella* komt voor op salades, melk en melkproducten en gevogelte. Besmetting van deze producten wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de fecale-orale route. Fecaal besmet water en onhygiënisch handelen door mensen die contact hebben met het voedsel zijn de meest voorkomende oorzaken van besmetting. Bij groenten en fruit werd *Shigella* al terug gevonden op tomaten, allerlei bladgewassen en kruiden zoals peterselie en basilicum (Kotloff *et al.*, 1999; Ries *et al.*, 1994).

#### **1.2.4 Campylobacter**

*Campylobacter* is een Gram-negatieve bacterie. Het is een zeer beweeglijke en niet-sporevormende bacterie. Dit genus bevat 17 verschillende species. Enkel *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* en *Campylobacter fetus* spelen een belangrijke rol in de humane pathologie. De bacterie komt voornamelijk voor bij pluimvee, vogels, katten, varkens, runderen en knaagdieren en in mindere mate bij de mens (Verhaegen *et al.*, 2010). *C. jejuni* is de meest voorkomende oorzaak bij aandoeningen aan het maag-darmstelsel. Een voedseluitbraak van deze bacterie is eerder sporadisch maar indien het toch voorkomt is gecontamineerd gevogelte vaak de oorzaak (Moriarty, 2012). Besmetting van de mens treedt op via gecontamineerd voedsel, water en door contact met dieren en uitwerpselen van besmette mensen en uit zich in acute, waterige en soms bloederige diarree met buikkrampen en koorts. Vooral kinderen van 1 tot 4 jaar hebben een verhoogde kans op ziekte omdat hun immuunsysteem nog niet volledig ontwikkeld is en er nog geen antistoffen tegen *Campylobacter* aanwezig zijn (Verhaegen *et al.*, 2010).

*Campylobacter* komt vooral voor op kip en gevogelte, schaal- en schelpdieren of rauwe melk. Ook op groenten die rauw worden geconsumeerd, zoals sla wordt *Campylobacter* teruggevonden. Aangezien de bacterie moeilijk kan overleven buiten een warmbloedige gastheer zijn fruit of groenten meestal besmet door kruisbesmetting met gevogelte (Brandl *et al.*, 2004).

#### **1.2.5 Listeria monocytogenes**

*Listeria monocytogenes* behoort tot de Gram-positieve bacteriën. Ze zijn staafvormig, facultatief aëroob en zijn beweeglijk dankzij hun flagella. Ze kunnen ingedeeld worden in 7 species (*Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria murrayi* en *Listeria welshimeri*). *L. ivanovii* en *L. monocytogenes* worden als pathogeen beschouwd (Chen, 2012). De bacterie kan groeien bij 4°C maar heeft bij deze temperatuur een verminderde productie van listeriolyse. Listeriolyse is een toxine dat vrijkomt en listeriose veroorzaakt. De meest voorkomende symptomen zijn koorts, spierpijn en braken. Diarree is een minder vaak voorkomend symptoom.

Als de infectie zich uitbreidt naar het zenuwstelsel kan er meningitis ontstaan (Chen, 2012).

Besmetting gebeurt door consumptie van producten, zoals ongepasteuriseerde melk of kazen en voorverpakte gerookte vis. Ook bij rauwe groenten wordt de bacterie terug gevonden (Chen, 2012). Dit komt doordat *Listeria monocytogenes* de meest hitteresistente pathogeen is, die pas afgedood wordt bij een temperatuur van 70°C gedurende 2 minuten (Food-Info, 2009).

### **1.2.6 Norovirus**

Norovirussen zijn een groep enkelstrengige RNA virussen, die acute gastro-enteritis veroorzaken in mensen. Het zijn kleine (27 tot 40 nm) darmvirussen (Huffman *et al.*, 2003). Voedselinfecties met het Norovirus zullen zich vaak voordoen op plaatsen waar veel mensen samen leven. Het virus is makkelijk overdraagbaar en veroorzaakt vaak ziekten aan het maag-darmstelsel. Het virus kan overleven in een groot temperatuursgebied (van temperaturen onder 0°C tot 67°C) (Belmusto, 2007). De symptomen van een Norovirusbesmetting zijn braken en diarree, die meestal beginnen tussen 15 en 48 uur nadat iemand besmet is met het virus. Het braken is vaak heftig en kan heel plotseling optreden. Dit wordt projectielbraken genoemd.

Het Norovirus was reeds betrokken bij voedselgebonden uitbraken geassocieerd met sla in het VK en in de VS, selderij in de VS (Beuchat, 2002), ingevroren frambozen in Finland (Ponka *et al.*, 1999) en in Denemarken (Falkenhorst *et al.*, 2005) en meloen in de VS (Beuchat, 2002).

### **1.2.7 Rotavirus**

Rotavirus is een dubbelstrengig RNA virus dat behoort tot de Reovirussen (CDC 2011). De incubatieperiode van rotavirus is ongeveer 2 dagen en de symptomen zijn koorts, braken, waterige diarree en buikpijn. Na replicatie in het maag-darmkanaal worden rotavirussen in hoge aantallen uitgescheiden in de feces (Koopmans *et al.*, 2004).

Het is nog niet bekend waar het Rotavirus vandaan komt (Parashar, 2003). Het werd al gedetecteerd op sla, radijzen en wortelen waarschijnlijk door feco-orale besmettingen (Seymour *et al.*, 2001).

### **1.2.8 Giardia lamblia**

*Giardia lamblia* is een eencellige parasiet. De levenscyclus van *Giardia* is vrij eenvoudig en omvat twee ontwikkelingsstadia: het cyste stadium (de overlevingsvorm buiten de gastheer) en het vegetatieve stadium, het stadium binnen de gastheer. De parasiet is te vinden in beken en meren, maar ook in de gemeentelijke watervoorzieningen of bij onhygiënische toiletten. *Giardia* infectie kan worden overgedragen via voedsel en door menselijke contact (Danciger, 1975).

Een infectie met *Giardia lamblia* wordt opgelopen als de cysten via de mond, slokdarm en maag in de dunne darm terechtkomen. In de dunne darm barst de cyste open en komt de parasiet vrij. Deze gaat zich vervolgens vermenigvuldigen

en zich vasthechten aan de darmwand (Adam, 2001). De darmwand raakt hierdoor beschadigd. Dit kan diarree en darmklachten als gevolg hebben. In de darm vormt de parasiet zich weer om tot een cyste. De cysten worden daarna met de ontlasting uitgescheiden. Sommige mensen met *Giardia* infectie ontwikkelen nooit symptomen, maar dragen de parasiet wel bij zich, en kunnen het verspreiden via hun ontlasting. Voor degenen die wel ziek worden, verschijnen de symptomen meestal een tot twee weken na de blootstelling. De symptomen zijn waterige, soms stinkende diarree, vermoeidheid, buikkrampen en een opgeblazen gevoel (Adam, 2001; Danciger, 1975). *Giardia lamblia* is reeds terug gevonden op rauwe groenten zoals sla maar ook op bosbessen. Dit is waarschijnlijk te wijten aan een feco-orale besmetting (Van Kreijl *et al.*, 2004).

### 1.3 Chemische contaminanten op groenten en fruit

Naast mogelijke pathogenen wordt de Belgische consument ook blootgesteld aan residuen van bestrijdingsmiddelen door het consumeren van groenten en fruit (Claeys *et al.*, 2008). Chemische componenten die op groenten en fruit terug gevonden worden, zijn pesticiden, zware metalen en nitraten. Ook dioxines kunnen op groenten en fruit voorkomen. Onderzoek uitgevoerd door het Wetenschappelijk Instituut voor Volksgezondheid gaf weer dat voor de meeste onderzochte residuen van bestrijdingsmiddelen, de aanwezigheid honderd keer lager dan de ADH (aanvaardbare dagelijkse hoeveelheid). Enkele stoffen (tabel 2) kwamen wel in een grotere hoeveelheid voor op groenten (Claeys *et al.*, 2008). Naast pesticiden worden ook zware metalen terug gevonden op groenten en fruit. Omdat zware metalen niet afbreekbaar zijn is het mogelijk dat deze accumuleren in menselijke organen. De zware metalen kunnen op de vrucht terecht komen omdat ze vanuit de bodem worden opgenomen.

Tabel 2: %ADH pesticiden (Claeys *et al.*, 2008).

Product	% van de ADH
imazalil	23%
chloorprofam	15%
dithiocarbamanten	14%
dimethoat	10%

### 1.4 Incidenties van voedselinfecties

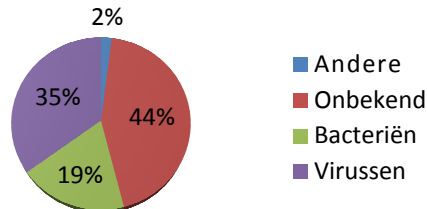
#### 1.4.1 België

##### 1.4.1.1 Algemene situering

In 2007 werden in België volgens het EU-rapport 75 gevallen van een voedselinfectie geregistreerd in België. Dit is slechts 1,3% van alle voedselinfecties in Europa. Er werden in 2007 ook 17 hospitalisaties uitgevoerd en er vielen geen doden door een mogelijke voedselinfectie (EU-rapport, 2009). Gedurende 2008 en 2009 werden door het Federaal Agentschap voor de

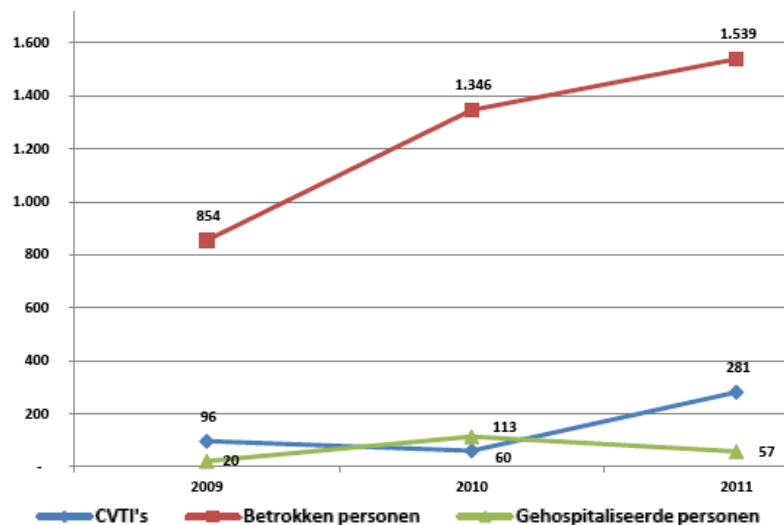


Veiligheid van de Voedselketen (FAVV) 209 voedselgebonden uitbraken vastgesteld in België. Hierbij waren er 1753 ziektegevallen. Voedselgebonden virussen waren hierbij de meest frequent gedetecteerde oorzaak (figuur 1) (De Schrijver, 2005). Algemeen kan men stellen dat in 2009 in België 19% van de voedselinfecties te wijten zijn aan bacteriën en 35% aan virussen (FAVV, 2009).



Figuur 1: Voedselgebonden ziektegevallen per oorzaak in België, 2009 (FAVV, 2009)

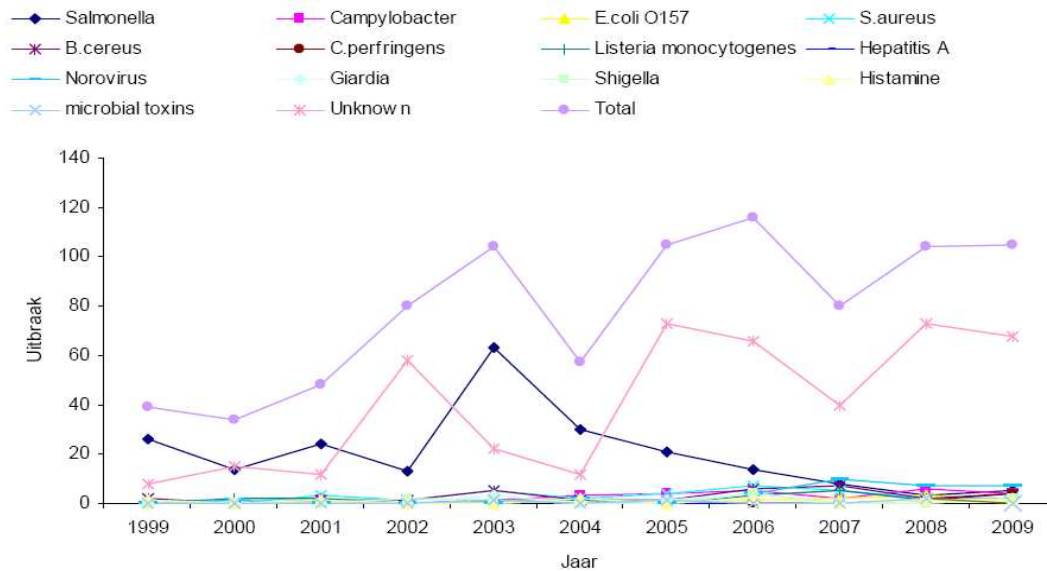
Onderstaande figuur (figuur 2) schetst het verloop van het aantal meldingen van collectieve voedselinfecties in België in de periode van 2009 tot 2011. Er wordt gesproken van collectieve voedseltoxi-infecties (CVTI) wanneer er onder dezelfde omstandigheden 2 of meer personen gelijkaardige symptomen vertonen, en waarbij er een (waarschijnlijk) oorzakelijk verband bestaat met eenzelfde voedselbron. De stijging van het aantal collectieve voedselinfecties in 2011 is een vermoedelijk gevolg van de verbeterde rapportering (Favv, 2011).



Figuur 2: Aantal collectieve voedselinfecties in België (FAVV, jaarverslag 2011)

Algemeen gezien neemt het aantal geregistreerde voedselgebonden outbreaks de laatste jaren toe. De verwekkende pathogeen blijft vaak onbekend. De bacterie die de meeste voedselinfecties in België veroorzaakt is *Salmonella*. Hierbij was *Salmonella enteritidis* de meest voorkomende soort gevolgd door *Salmonella thyphimurium* (EU-rapport, 2009). De consumptie van rauwe eieren blijft de belangrijkste oorzaak hiervan. In 2007 werd *Salmonella* het meest frequent gedetecteerd bij outbreaks (figuur 3). In Vlaanderen werden in 2009

volgende verwekkers terug gevonden bij outbreaks; *Norovirus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, hepatitis A virus, *Listeria monocytogenes*, en *Shigella*. Norovirus wordt in de periode van 2007 tot 2009 vaak teruggevonden bij de outbreaks (figuur 3). Dit kan mogelijk verklaard worden door het feit dat norovirus standaard wordt opgespoord in voedingswaren en stoelgangstalen bij een uitbraak (De Schrijver, 2009). Naast *Salmonella ssp.* is ook *Campylobacter* een veel voorkomende pathogeen.



Figuur 3: Aantal gerapporteerd outbreaks van gastro-intestinale infecties per jaar volgens verwekkend pathogeen in België van 1999 tot 2009 (statusrapport infectieziekten, 2009).

In 2010 werd een onderzoek uitgevoerd rond de veiligheid van de voedselketen in België op basis het 'Pressure-State-Response' model (Baert, 2011). Hierbij werden 30 voedselveiligheid indicatoren onderzocht met betrekking tot de naleving van criteria voor de geselecteerde chemische en microbiologische gevaren; de uitvoering van preventieve en controlemaatregelen van "farm to fork"; de gerapporteerde voedseluitbraken door zoönoseverwekkers (*Salmonella spp.* en *Listeria monocytogenes*) (Baert, 2011). Door vergelijking van de jaren 2007, 2008 en 2009 werd geconcludeerd dat de toestand van het globale voedselveiligheid in België goed is en dat er elk jaar een verbeterde voedselveiligheid is (Baert, 2011).

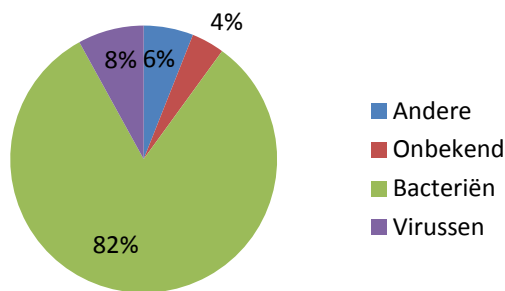
#### 1.4.1.2 Voedselinfecties ten gevolge van groenten en fruit

Groenten en fruit zijn mogelijke oorzaken van voedselinfecties in België. Tomaten zijn hierbij de meeste geconsumeerde groenten in België. Samen met bladgewassen, kruiden en scheutgroenten zijn tomaten groenten met een hoog microbiel risico (FAO&WHO, 2008). Bij het fruit zijn appels de meest geconsumeerde vrucht, gevolgd door sinaasappelen en bananen. Het FAVV voert jaarlijkse controles uit op deze producten om mogelijke besmettingen op te sporen.

### 1.4.2 Europa

#### 1.4.2.1 Algemene situering

In Europa werden door de 'European Food Safety Authority' (EFSA) 5.252 voedselgebonden uitbraken gerapporteerd in 2010 met 43.473 ziektegevallen, 4.695 hospitalisaties en 25 doden tot gevolg (EFSA 2012). Hiervan werden 890 voedselgebonden uitbraken (14.001 ziektegevallen en 20 doden) geverifieerd (figuur 4). Bacteriën en virussen waren verantwoordelijk voor 82% en 8% van de gerapporteerde, voedselgebonden uitbraken. Hierbij was *Salmonella* de meest voorkomende oorzaak (35%)(EFSA, 2012).



Figuur 4: Voedselgebonden ziektegevallen per oorzaak in EU, 2008 (EFSA, 2010)

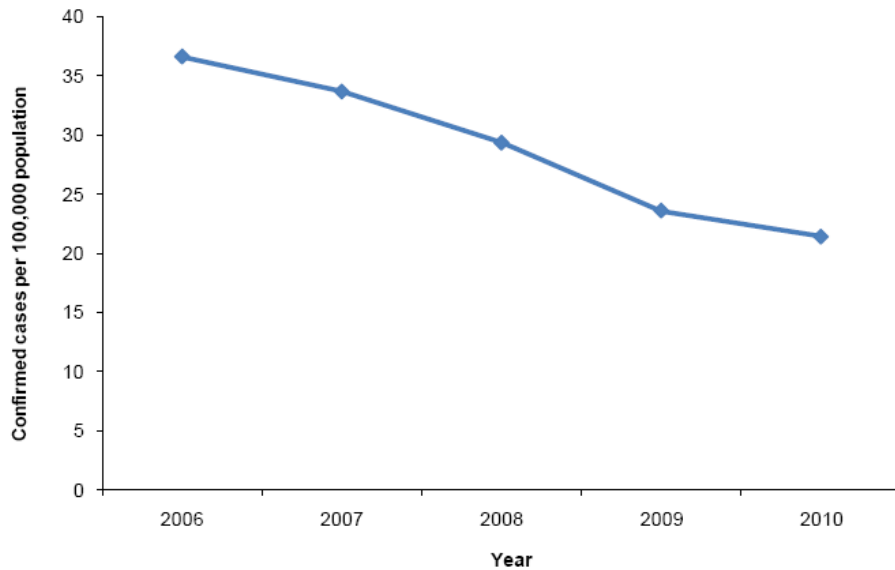
Duitsland en Frankrijk rapporteerden ongeveer 25,0% en 19,7% van alle uitbraken in Europa (EFSA, 2012; EU-rapport, 2009). Spanje rapporteerde 24,4% van alle uitbraken in de EU. Hierbij werd 5,4% van de mensen gehospitaliseerd. In Roemenië en Letland ligt de hospitalisatiegraad het hoogst met 69,6% en 66,7% (EU-rapport,2009). *Salmonella* is de belangrijkste oorzaak met 30,5% van alle voedselinfecties (tabel 3), (EFSA, 2012). Daarnaast is ook *Campylobacter* een belangrijke voedselpathogeen die in 2010 verantwoordelijk was voor 470 uitbraken. Deze wordt het meest gekoppeld aan rauw kippenvlees (EFSA, 2012). Verder werden 31 uitbraken van *E. coli* gerapporteerd waarbij in totaal 413 mensen geïnfecteerd raakten. Ook enkele meldingen van *Yersinia*, *Listeria*, *Shigella*, *Enterobacter* en *Citrobacter* werden gemeld (EFSA, 2012; EU-rapport, 2009).

Tabel 3: Overzicht voornaamste pathogenen (EU-rapport, 2009).

Pathoogeen	Aantal infecties	% infecties
<i>Salmonella</i>	2201	30,5
Onbekend	1433	25,5
Virussen	668	11,9
<i>Campylobacter</i>	461	8,9
Bacteriële toxinen	458	8,2
Andere	204	3,6
<i>Escherichia coli</i>	65	1,2
Parasieten	57	1,0
Andere bacteriële reagentia	40	0,7
<i>Yersinia</i>	22	0,4
Totaal	5609	100

#### 1.4.2.2 *Salmonella* als belangrijkste pathoogeen bij voedselinfecties

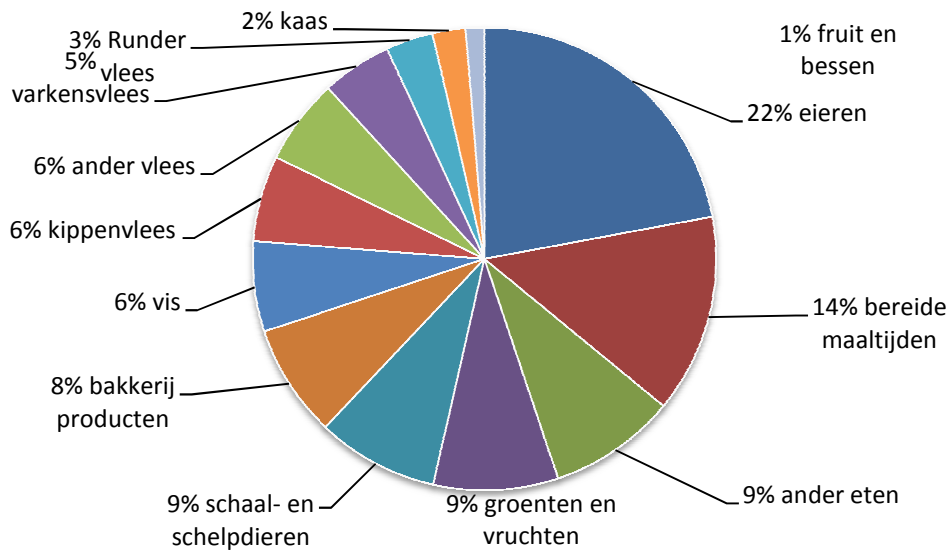
*Salmonella* is de meest voorkomende oorzaak (30,5%) van alle voedselinfecties. Zoals eerder vermeld zijn er in 2010 zijn er in heel Europa 1.604 voedselinfecties ten gevolge van *Salmonella* gemeld. 8.922 mensen waren geïnfecteerd en dit resulteerde in 1.733 hospitalisaties waarbij 10 mensen zijn gestorven. Oostenrijk, Frankrijk, Duitsland, Hongarije, Polen en Spanje zijn samen verantwoordelijk voor 86,7% van de *Salmonella*-rapporteringen in 2007 (EU-rapport, 2009). Algemeen vindt er een daling plaats van het aantal *Salmonella*-uitbraken (figuur 5). In 2005 werden er nog 3.190 uitbraken gemeld en dat evalueerde naar 2201 uitbraken in 2007. Alleen al van het jaar 2009 naar 2010 is er een daling van 8,8% (EFSA, 2012). Deze daling is specifiek te wijten aan de sterke daling in Spanje (van 444 uitbraken in 2005 naar 187 in 2007) en Slowakije (van 745 uitbraken naar 34 uitbraken) door een verbeterde hygiëne (EU-rapport, 2009; Anon, 2007c). In 53,1% van de *Salmonella* uitbraken ging het om *Salmonella enteritidis*. In 10% van de gevallen was *Salmonella thypimurium* het geïsoleerde type. Hierbij zijn eieren verantwoordelijk voor 27% van de gevallen (EU-rapport, 2009).



Figuur 5: Trend van gerapporteerde *Salmoenlla* infecties per 100 000 mensen in Europa tussen 2006-2010 (EFSA, 2012).

#### 1.4.2.3 Oorzaken voedselinfecties

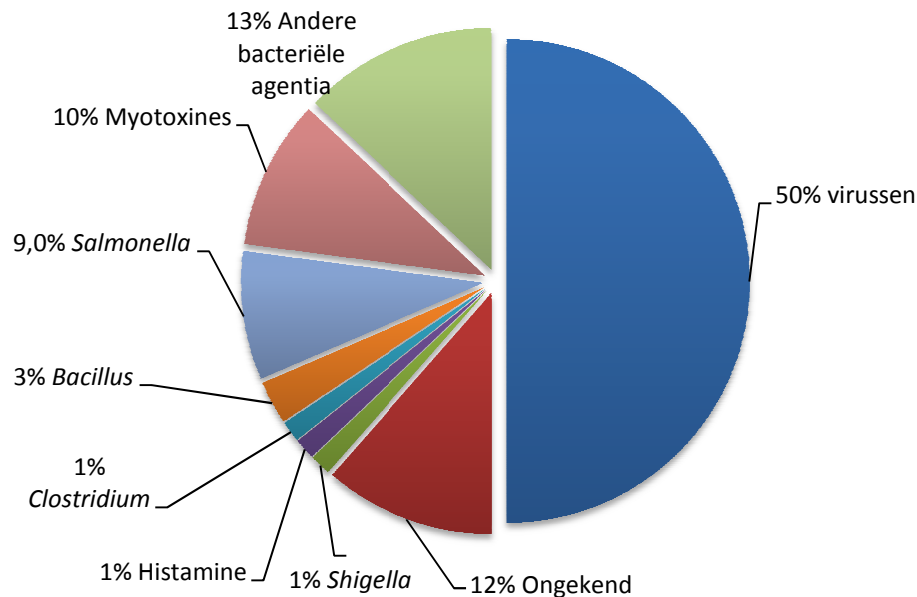
In 68,8% van alle geverifieerde uitbraken in Europa zijn details vrijgegeven over de oorzaak van de voedselinfectie (figuur 6). Hierbij zijn eieren verantwoordelijk voor 22,1% van de uitbraken terwijl vlees (kip, varken, of rundsvlees) verantwoordelijk is voor ongeveer 20% van de uitbraken (EFSA, 2012). Vis, klaargemaakte gerechten en bakkerij producten zijn allemaal verantwoordelijk voor ongeveer 6% (EFSA, 2012). Groenten zijn verantwoordelijk voor 9% van de infecties en fruit voor 1%. In 37% van alle gevallen vond de voedselinfectie gewoon thuis plaats. Daarnaast zijn restaurants, cafés of bars (29%) en scholen 8,0% ook belangrijke besmettingsbronnen. Deze gegevens van 2007 (EFSA, 2009) zijn vergelijkbaar met die van 2010 uit het EFSA-voedsel-rapport (EFSA, 2012).



Figuur 6: Oorzaken voedselinfecties (EU-rapport, 2009).

#### 1.4.2.4 Voedselinfecties ten gevolgen van groenten en fruit

In Europa is ongeveer 10% van alle voedselinfecties te wijten aan groenten en fruit. Specifiek voor groenten en fruit wordt 50% van deze voedseluitbraken veroorzaakt door virussen (figuur 7). Bij ongeveer 40% ligt de oorzaak van de infectie bij bacteriën (EFSA, 2012). Ook bij groenten en fruit is *Salmonella* de meest voorkomende pathogeen.



Figuur 7: Pathogenen aanwezig op groenten en fruit in Europa in 2010 (EFSA, 2012).

#### 1.4.2.5 Recente incidenties

Enkele recente uitbraken die specifiek geassocieerd worden met groenten en fruit worden in volgende paragraaf beschreven. In 2004 worden er 368 mensen geïnfecteerd door besmette sla in Noord Ierland. Later bleek dat *Salmonella enterica* de oorzaak was (Gillespie, 2004). *E. coli O157* was de besmettingsbron in sla waardoor 135 mensen ziek werden in Zweden in 2005. 10 mensen ontwikkelden hierbij het Hemolytisch Uremisch Syndroom (Söderström *et al.*, 2008). In 2006 werden er in Zweden 115 mensen ziek na het eten van bonen in een Indiaans restaurant. Na labo-analyse bleken *Salmonella virchow* en *Salmonella bareilly* de oorzaak te zijn (Jong *et al.*, 2007). Waterkers was verantwoordelijk voor voedselinfecties in Denemarken, Finland en Noorwegen. Hier was *Salmonella weltevreden* de pathogeen (EU-rapport, 2009). Ook in Zweden werd een *Salmonella java* uitbraak vastgesteld bij 179 personen na het consumeren van spinazie (Arthurson *et al.*, 2010). In 2011 werden in Noorwegen 46 besmettingen van *Shigella sonnei* vastgesteld door het consumeren van verse basilicum (Guzman-Herrador, 2011). Sojascheuten besmet met *E. coli O104:H4* veroorzaakte in 2011 in Duitsland 4.075 besmettingen (WHO, 2011).

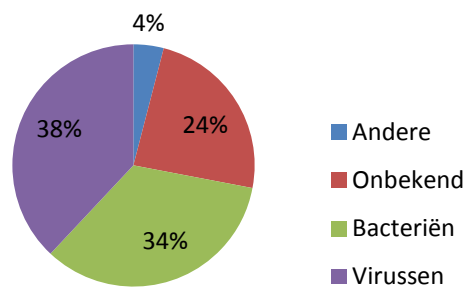
Tabel 4: Selectie van representatieve voedselinfecties in Europa door groenten en fruit.

Pathogeen	Land	Voedsel	jaar	referentie
<i>E. coli O157</i>	België	komkommer	2000	Duffell <i>et al.</i> , 2003
<i>Salmonella typhimurium</i>	IJsland	sla	2004	Gillespie, 2004
<i>S. enterica</i>	Noord-Ierland	sla	2004	Gillespie, 2004
<i>E. coli O157</i>	Zweden	sla	2004	Söderström <i>et al.</i> , 2008
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Finland	wortelen	2005	Jalava <i>et al.</i> , 2006
<i>Salmonella Virchow</i> en <i>Salmonella Bareilly</i>	Zweden	bonen	2006	Jong <i>et al.</i> , 2007
<i>Salmonella weltevreden</i>	Denemarken, Finland, Zweden	waterkers	2006	EU-rapport
<i>Salmonella java</i>	Zweden	spinazie	2010	Arthurson <i>et al.</i> , 2010
<i>Shigella sonnei</i>	Noorwegen	basilicum	2011	Guzman-Herrador, 2011
<i>E. coli O104:H4</i>	Duitsland	sojascheuten	2011	WHO, 2011
<i>Cryptosporidium</i>	Engeland	spinazie	2012	FSA, 2012

### 1.4.3 Verenigde staten

#### 1.4.3.1 Algemene situering

In de Verenigde Staten staat het Center for Disease Control and Prevention (CDC) in voor het controleren van de volksgezondheid en voedselveiligheid. In de VS werden 1.097 voedselgebonden uitbraken gerapporteerd door de CDC in 2007 met 21.244 ziektegevallen en 18 doden tot gevolg. Van deze uitbraken werd ongeveer 34% veroorzaakt door bacteriën, 38% door virussen en bij 24% was de oorzaak onbekend (figuur 8). Het Norovirus was de meest voorkomende oorzaak van voedselgebonden ziektes. De tweede meest voorkomende oorzaak was *Salmonella*, welke verantwoordelijk was voor 53% van de voedselgebonden uitbraken veroorzaakt door bacteriën (CDC, 2010).



Figuur 8: Voedselgebonden ziektegevallen per oorzaak in de VS, 2007 (CDC, 2010b)

In het Foodnet rapport van 2010 wordt beschreven dat de *Salmonella* infectie in de laatste 15 jaar bijna constant is gebleven (CDC, 2011b). Naast *Salmonella* zijn de *Vibrio* infecties sterk toegenomen. Deze infecties worden veroorzaakt door het eten van besmette zeevruchten. Van 1996 t.o.v. 2010 zijn deze zeer sterk gestegen met 115%. De *E. coli* O157:H7 infectie is de afgelopen 15 jaar gedaald met 44%. Daarnaast werd er ook nog een lichte stijging van het Norovirus waargenomen in de Verenigde staten (CDC, 2011b; FDA, 2009).

#### 1.4.3.2 Recente incidenties

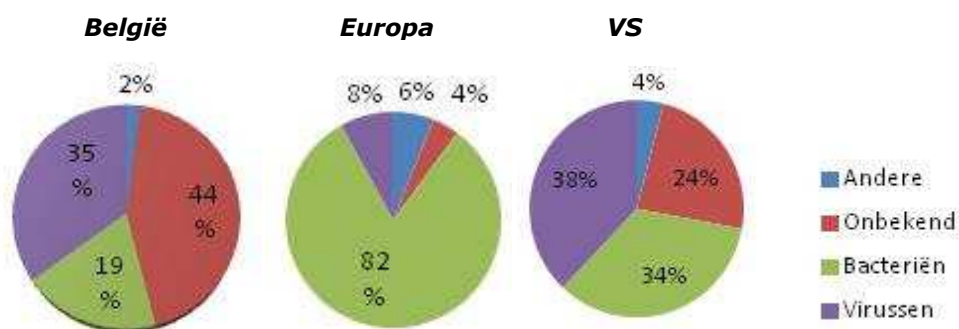
Tomaten veroorzaakte in 2001 een grootschalige voedselinfectie bij 886 mensen. Na onderzoek bleek dat de tomaten geïnfecteerd waren met *Shigella flexneri* serotype 2a (Reller *et al.*, 2006). Tussen 2001 – 2004 zijn er in de VS 9 partijen kruiden en specerijen uit de markt gehaald die besmet waren met *Salmonella*. Het ging tweemaal om paprika en gemalen komijn. Verder werd ook een besmetting op oregano, sesamzaad, basilicum, gemalen salie en gemalen peper vastgesteld (VIBHA, 2006). Ook in de VS werden in 2004 in 18 verschillende staten 561 mensen besmet door het eten van tomaten. *Salmonella braenderup* lag aan de oorzaak hiervan (Anon, 2004) en (CDC, 2005). *L. monocytogenes* veroorzaakte in 2011 147 besmettingen na het eten van meloen (CDC, 2011). In het zelfde jaar werden 1500 mensen besmet door het eten van tomaten. Na onderzoek bleken deze besmet te zijn met *Salmonella saintpaul* (Behravesh *et al.*, 2011).



Tabel 5: Selectie van representatieve voedselinfecties in VS door groenten en fruit.

Pathoogeen	Land	voedsel	jaar	referentie
<i>Shigella sonnei</i>	VS en Canada	peterselie	1998	CDC, 1999
<i>Shigella flexneri</i> serotype 2a	VS	tomaten	2001	Reller <i>et al.</i> , 2006
<i>Salmonella</i>	VS	Paprika komijn oregano sesamzaad basilicum salie peper	2004	VIBHA, 2006
<i>Salmonella braenderup</i>	VS	tomaten	2004	Anon, 2004
<i>E. coli</i> O157	VS	spinazie	2006	Doyle, 2007
<i>E. coli</i> O157:H7	VS	sla	2007	Doyle, 2007
<i>Listeria monocytogenes</i>	VS	meloen	2011	CDC, 2011
<i>Salmonella saintpaul</i>	VS	tomaten	2011	Behravesh <i>et al.</i> , 2011

#### 1.4.4 Overzicht België- Europa- VS



Figuur 9: Overzicht tussen België/Europa/VS

In België wordt 35% van de voedseluitbraken veroorzaakt door virussen. In Europa is dit slechts 8% en in de VS 38%. 82% van de uitbraken in Europa worden gelinkt aan bacteriën. Dit is zeer veel in vergelijking met België (19%) en VS (34%) (figuur 9). De grote verschillen zijn onder andere te verklaren door een verschillende manier van rapportering. Een andere verklaring is het verschil in regelgeving voor gebruik van antimicrobiële stoffen in de primaire sector tussen de Verenigde staten en Europa (Wilhelm *et al.*, 2009).

## 1.5 Contaminatiebronnen

Het identificeren van de contaminatiebronnen van verse groenten en fruit is niet makkelijk. Deze groenten en fruit bevatten in het algemeen geen conserveermiddelen of antimicrobiële bestanddelen en ondergaan zelden een verhittingsstap voor de consumptie. Er zijn verschillende manieren mogelijk waarop pathogenen geïntroduceerd kunnen worden op groenten en fruit voor het oogsten. De voornaamste wegen zijn via de bodem, onvoldoende gecomposteerde mest, dieren, vuile oogstuitrustingen en onbehandeld afvalwater dat gebruikt wordt als irrigatiewater (FAO/WHO 2008). Daarnaast is het ook mogelijk dat groenten en fruit gecontamineerd worden door de handelingen en contact met geïnfecteerde personen en objecten (Seymour *et al.*, 2001). Na het oogsten kan er contaminatie optreden door was- en spoelwater, verwerking, verpakking en transportmiddelen (De Roever, 1998).

### 1.5.1 Water als contaminatiebron

#### 1.5.1.1 Algemene waterkwaliteit

Elk contact van water met groenten en fruit tijdens de teelt houdt risico's in voor de volksgezondheid omdat microbiële contaminatie sterk afhangt van de kwaliteit van het water (WHO, 1998). De verschillende types water die kunnen gebruikt worden binnen de primaire sector zijn leidingwater, grondwaterputwater, hemelwater en oppervlaktewater. Bij het gebruik van hemelwater, putwater en oppervlaktewater is de belangrijkste contaminatie afkomstig van dierenfecaliën. Bij grondwater zal bijvoorbeeld de microbiologische kwaliteit verbeteren naarmate er uit diepere grondlagen water wordt opgenomen. De waterkwaliteit wordt ook bepaald door de seizoenen (FAO/WHO, 2008). Algemeen kan gesteld worden dat irrigatie in de Belgische fruitteelt weinig wordt toegepast. Hierbij is er ook geen rechtstreeks contact met de vrucht vermits de watergift aan de boomstam plaats vindt. Bij de groententeelt zijn spoelwater en irrigatiewater de twee voornaamste types.

De fecale bacteriën (*Escherichia coli*, fecale coliformen en fecale streptokokken) worden als indicator gebruikt om de sanitaire kwaliteit van het water te meten. De fecale bacteriën kunnen in het algemeen geen schade veroorzaken bij de mens. In theorie wordt aangenomen dat de fecale bacteriën niet kunnen groeien in natuurlijke omgevingen. Studies hebben toch aangetoond dat fecale bacteriën als indicator enkele uren tot enkele dagen kunnen overleven in het oppervlaktewater (Norris, 1994). Een studie van Monaghan geeft een relatie weer tussen 'bodem-splash' en enterische bacteriën. 'Bodem-splash' ontstaat door regendruppels die samenklitten op de bodem. Deze 'bodem-splash' vergemakkelijkt de overdracht van enterische of darm-gebonden bacteriën naar kant-en-klare gewassen. De persistentie van deze zoonoseverwekkers werd verminderd op het heetst van het groeiseizoen wanneer er het meest irrigatie is (Monaghan *et al.*, 2012).

Het aantal ziekteverwekkers wordt gecorreleerd aan het aantal fecale bacteriën. Daarom wordt aangenomen dat wanneer er relatief veel fecale bacteriën aanwezig zijn in het water er een verhoogde kans op pathogenen is. Sommige pathogene bacteriën, virussen en protozoa hebben speciale overlevingsmechanismen, zoals vorming van cysten in *Cryptosporidium*, of aanhechting van virussen aan deeltjes, zodat water vrij van fecale bacteriën toch

nog pathogenen kan bevatten. Dit kan zelfs het geval zijn voor water dat een behandeling heeft ondergaan voor drinkwater (Madsen, 1994).

Er is geen eenduidige manier om het risico van een voedselinfectie te associëren met de bacteriologische kwaliteit van water zelfs als het aantal fecale gekend is. Ten eerste is er geen direct verband tussen de aanwezigheid van fecale indicator bacteriën en de aanwezigheid van pathogenen. Ten tweede zijn mensen niet even gevoelig voor ziekteverwekkers en hangt dit af van hun immuunsysteem (Norris, 1994).

#### 1.5.1.2 Verschillende watertypes hebben een andere kwaliteit

Grondwater is een bron die vaak wordt gebruikt als irrigatiewater en bevindt zich in de waterhoudende lagen beneden het aardoppervlak (Steele *et al.*, 2004). Hierdoor wordt een frisse en donkere omgeving gecreëerd. Deze omstandigheden zorgen er voor dat veel pathogene micro-organismen en chemische componenten verwijderd worden door de trage filtratie van het water doorheen de grondlagen. Grondwater wordt daarom beschouwd als de waterbron die het minst gevoelig is voor verontreiniging door bacteriën. Dit geldt zeker voor het grondwater uit diepe, afgesloten watervoerende lagen (Geldreich, 1990). Door de kleine grootte van veel pathogenen is het toch mogelijk dat ze doorsijpelen en in het grondwater terecht komen (Pedley *et al.*, 2006). Veel bacteriën kunnen overleven met enkel een koolstofbron en deze zijn alom aanwezig in grondwater en oppervlaktewater. De aanwezigheid van virussen in grondwater kan verklaard worden door hun fysico-chemische karakteristieken. Sommige virussen vertonen oppervlakte-eigenschappen, welke een hoge diffusiesnelheid toelaten in de bodem (Pang *et al.*, 2005).

Het oppervlaktewater is de belangrijkste bron voor irrigatiewater in de Verenigde staten en bestaat uit rivieren, vijvers en meren (CDC 2009). Afhankelijk van de locatie, het seizoen en de waterbron kunnen de chemische en microbiologische samenstelling van het oppervlakte water variëren. Na regenbuien kan oppervlaktewater gecontamineerd worden door het afspoelen van de landbouwgrond en het overlopen van afwateringssystemen (Schets *et al.*, 2008). Oppervlaktewater kan besmet geraakt zijn met pathogenen afkomstig van de veeteelt of vervuild worden door lozing van afvalwater. Ook dierlijke pathogenen kunnen in het water terecht komen (Lynch *et al.*, 2009).

In België is hemelwater in hoofdzaak regenwater. Enkel in uitzonderlijke jaren kan gedurende de winter een belangrijk deel bestaan uit sneeuw. Hemelwater heeft een lage pH en een lage hardheid. Kenmerkend voor hemelwater is ook de lage concentratie aan zouten. Mogelijke verontreinigingen in hemelwater zijn koolwaterstoffen en bestrijdingsmiddelen, afkomstig van de industrie, het verkeer en de landbouw. Ook zware metalen uit de industrie kunnen zich in de lucht en bijgevolg in het hemelwater bevinden. Bacteriën kunnen afkomstig zijn van vogeluitwerpselen, organische materialen en stofdeeltjes die meegevoerd worden met de regen (Greene *et al.*, 1993).

Afvalwater vereist een waterbehandeling voordat het kan gebruikt worden voor irrigatie (Steele *et al.*, 2004; WC-FAVV 2009). Het gebruik van onbehandeld irrigatiewater is in België ten strengste verboden volgens het FAVV (WC-FAVV 2009). Er zijn strenge richtlijnen opgesteld, door de 'Environmental Protection Agency (EPA) en de 'World Health Organization' (WHO), met betrekking tot de kwaliteit van afvalwater voor irrigatie. Recyclage- of recuperatiewater wordt ook

gebruikt om het tekort aan water op te vangen. Dit afvalwater is afkomstig uit productieprocessen zoals het waswater van groenten en ondergaat een zuivering zodat het toegelaten wordt als irrigatiewater.

### 1.5.1.3 Proceswater en teelttechnieken

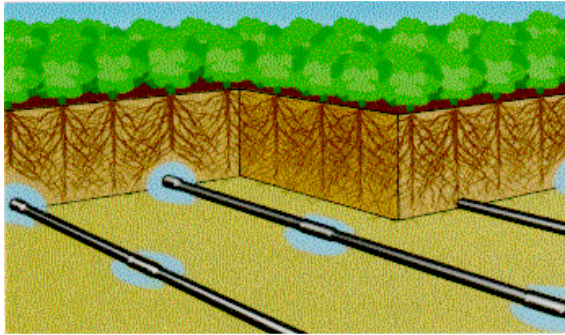
Ook het proceswater in de groenten en fruitbedrijven is een belangrijke bron van contaminatie. Hergebruik van proceswater vormt een groot probleem omwille van mogelijke accumulatie van pathogenen die aanvankelijk aanwezig waren op het oppervlak van fruit en groenten. In België vormt het sorteersysteem in de fruitsector een risico op overdracht van mogelijke pathogenen. Appelen en peren worden gesorteerd door gebruik te maken van water (figuur 10). Hierdoor is er een rechtstreeks contact tussen het transportwater en de vrucht.



Figuur 10: Sorteerkanaal appelen (agf.com)

Het wassen van verse groenten en fruit wordt uitgevoerd omdat de meeste pathogenen op het oppervlak van de groenten en fruit aanwezig zijn. Door wassen en spoelen van fruit en groenten kan de houdbaarheid hierdoor verlengd worden (Food and Drug Administration (FDA), 1998). Daarnaast garandeert het wassen niet altijd een significante reductie van de pathogenen op de gecontamineerde gewassen (De Roever, 1998). Voor oogstbehandelingen zoals het wassen van groenten en fruit wordt aangeraden om gebruik te maken van drinkbaar water. Hierdoor wordt de kans op besmetting zoveel mogelijk geminimaliseerd (Steele & Beuchat, 2001).

De manier waarop gewassen worden geïrrigeerd heeft ook een invloed op mogelijke contaminaties. Er zijn verschillende manieren van irrigatie in de tuinbouwsector: druppelbevloeiing (bv. subsurface drip irrigation, SDI), beregening of sproei-irrigatie, vorensysteem irrigatie, mobiele gootsysteem en nutriënt film technologie (Steele *et al.*, 2004). Bij SDI (figuur 11) wordt het proceswater naar het wortelsysteem van het gewas gebracht met behulp van ondergrondse, geperforeerde leidingen. Hierdoor is er minimaal contact tussen het, eventueel gecontamineerd, irrigatiewater en het bovengronds gedeelte van de plant (Oron, 2002). Deze methode is te verkiezen om eventuele contaminatie met pathogenen te vermijden.



Figuur 11: Subsurface drip irrigation (limnoterragroup.com)

De tweede methode is het beregenen van gewassen waarbij het geogste deel van de plant rechtstreeks in contact komt met irrigatiewater (WC-FAVV 2009). Een volgende methode is vorenirrigatie (figuur 12). Hier stroomt het irrigatiewater in goten tussen de rijen gewassen door. Bij deze twee vorige methoden is er direct contact mogelijk tussen het gewas en irrigatiewater. Hierdoor wordt de kans op mogelijke besmetting van pathogenen op de gewassen groter.



Figuur 12: Sproei-irrigatie (links) en voren-irrigatie (rechts)(tuinbouwnet)

Het mobiele gootsysteem is een geautomatiseerd en arbeidsbesparend systeem voor het telen van sla of kruiden op goten (figuur 13). In de licht hellende goten stroomt de recirculerende voedingsoplossing langs de perspotjes. Naarmate de planten groeien worden wordt de afstand tussen de goten groter zodat de plant in ieder groeistadium voldoende ruimte heeft. Elk groeistadium kent dus een maximale plantdichtheid. In dit nieuwe systeem is waterontsmetting mogelijk wat leidt tot een minimaal aantal aanwezige pathogenen. (VILT, 2008). Tenslotte is er nog de nutriënt film technologie (figuur 13). Dit is hydrotechniek waarbij voeding naar een tray of een goot wordt gepompt in de vorm van erg dunne, traag vloeiende filmlaag, die vervolgens door de wortels wordt opgenomen door capillaire werking. De constante toegang van de wortel tot water en voeding, gecombineerd met een toevoer van voldoende zuurstof, betekent dat planten zich snel ontwikkelen (Menzies *et al.*, 2009).



Figuur 13: mobiele gootsysteem (links) en nutriënt film technologie (rechts) (tuinbouwnet)

De fysische eigenschappen zoals de oppervlaktestructuur van het eetbaar gedeelte van het gewas is ook van belang (Stine, 2005). Zo kunnen sommige planten of eetbare gedeelten van de plant zoals de bladeren van sla, het irrigatiewater weerhouden. De manier waarop groenten en fruit worden geteeld is ook belangrijk bij de contaminatie van mogelijke pathogenen. Tomaten en appels kunnen vrij in de lucht hangen en hebben geen direct contact met de bodem. Dit in tegenstelling tot sla en spinazie die op het oppervlak liggen of wortelen en aardappelen die zich in de bodem bevinden (Stine, 2005).

### 1.5.2 Bemesting van groenten en fruit als contaminatiebron

Mest bestaat uit verteerde dierlijke uitwerpselen al of niet vermengd met stro (Goss, 2004). Andere vormen zijn compost of kunstmest. Chemisch gezien is mest een mengsel van water, mineralen, en organische stoffen. Belangrijke elementen in mest zijn stikstof, kalium, fosfor en magnesium. Daarnaast komen de sporen-elementen ijzer, zink, koper, molybdeen, borium en kobalt in mindere mate voor (Goss, 2004). In de mest van vee kunnen een heel hoog aantal *E. coli* bacteriën aanwezig zijn. In de mest van kippen kunnen ziekteverwekkende bacteriën als *Salmonella* en *Campylobacter* zitten. Als de mest over het land wordt uitgereden, kan deze door de regen naar het oppervlaktewater of grondwater uitspoelen, waarbij de micro-organismen ook in het water terecht komen (Lenntech, 2010). Een andere mogelijkheid van overdracht van de pathogeen is door direct contact met feces van vogels of andere dieren die rechtstreeks contact hebben met de landbouwgrond (Beuchat, 2002).

*Salmonella* dat via mest in de bovenlaag van de bodem terecht komt, is 66 dagen daarna tot tien centimeter diepte nog steeds traceerbaar. *E. coli* overleeft vijftig dagen in de bovenste bodemlaag. Dit blijkt uit laboratoriumtesten, waarbij de gezondheidsrisico's van landbewerking met *Salmonella* en *E.coli*-besmette mest is onderzocht (Semenov, 2009). Indien drijfmest (mest vermengd met urine) aan het oppervalk wordt aangebracht wordt de overlevingstijd korter, maar bacteriën dringen wel in grotere hoeveelheden door tot diepere bodemlagen. Het injecteren van drijfmest in de bodem bleek te resulteren in een grotere verspreiding van de pathogene bacteriën naar diepere grondlagen (Semenov, 2009). De proeven zijn herhaald op grond waar sla werd geteeld. Er was weinig verschil tussen het gebruik van drijfmest of 'vaste' mest. In beide gevallen vond een duidelijke toename van de bacterie plaats in de nabijheid van de slawortels (Semenov, 2009). Dit geeft aan dat ook dieper in de met besmette



mest behandelde grond, grotere hoeveelheden pathogenen te verwachten zijn. Hutchison concludeerde in zijn studie dat het risico op de volksgezondheid in verband met de verspreiding van bacteriën in drijfmest eerder laag is (Hutchison *et al.*, 2008).

### **1.5.3 Menselijke handelingen als contaminatiebron**

Tenslotte is het ook mogelijk dat groenten en fruit gecontamineerd worden door de handelingen en contact met geïnfecteerde personen en objecten (Seymour *et al.*, 2001). Pathogenen worden overgedragen van het ene organisme naar het andere door direct contact of door besmetting van voedsel of water. Verschillende menselijke gastro-intestinale pathogenen produceren toxinen die inwerken op de dunne darm met uitscheiding van vocht tot gevolg. Hierdoor ontstaat diarree. De pathogenen verdwijnen langs de ontlasting en kan andere personen besmetten (Norris, 1994). Overdracht van pathogenen vindt het vaakst plaats door onhygiënisch toilet bezoek, geen handen wassen, en niezen of hoesten. Hierdoor kan er ook contaminatie optreden aan oogstuitrustingen, gecontamineerde verpakking of transportmiddelen (De Roever, 1998).

## **1.6 Overdracht van contaminanten in water op groenten en fruit**

Er zijn een heel aantal mechanismen waardoor darmpathogenen zich makkelijker zouden kunnen binden aan groenten en fruit. De aanwezigheid van extracellulaire polymeren bevordert de aanhechting van bacteriën op voedsel. De aan- of afwezigheid van fimbriae speelt een rol (Fratamico *et al.*, 1996) net zoals de hydrofobiciteit van het celoppervlak en biofilmvorming (Dickson *et al.*, 1989). Ook de lading van het bacteriële oppervlak zou een invloed hebben (Ukuku *et al.*, 2002). Wanneer een pathogeen is vastgehecht blijkt het moeilijk te zijn deze pathogenen terug te verwijderen door wassen (Berger *et al.*, 2010). Dit komt doordat de pathogeen zich koloniseert op het plantenoppervlak en in sommige omstandigheden het plantenweefsel kan binnen dringen (Beuchat *et al.*, 2002).

Uit de resultaten van studies door Takeuchi bleek dat er geen eenduidige verklaring is voor het al dan niet aanhechten van bacteriën aan een bepaald product (Takeuchi *et al.*, 2000). *E. coli* O157:H7 en *L. monocytogenes* hechten bij voorkeur aan de rand van een product aan terwijl *Salmonella thyphimurium* zowel aan de rand aanhecht als over het hele oppervlak (Takeuchi *et al.*, 2000). Ook blijkt dat de omgevingsfactoren een rol speelt *L. monocytogenes* zal beter aanhechten aan plantenweefsel bij een ideale temperatuur (Ells *et al.*, 2006). Er zijn voor dezelfde pathogeen (*L. monocytogenes*) zelfs verschillen opgemerkt in hun vermogen om aan te hechten aan onbeschadigde plantenweefsels of aan snijvlakken (Ells *et al.*, 2006). Bij de overdracht van *E. coli* O157:H7 op sla werden verschillende waarnemingen gedaan (Takeuchi *et al.*, 2000). Bij sla die bewaard werd op 4°C vertoonden de pathogenen een grotere penetratie dan bij 7,25 of 37°C. Na een intensieve chloorbehandeling bleef een groot aantal van de *E. coli* O157:H7 aanwezig op de sla (Takeuchi *et al.*, 2000). Bij wortelen wordt de pathogeen *E. coli* O157:H7 vooral terug gevonden in de intracellulaire ruimes tot 50µm diep en tussen contactpunten met naburige cellen (Auty *et al.*, 2005). Burnett onderzocht de overdracht van deze pathogeen op appels (Burnett *et al.*, 2000). Hierbij bleek dat er zich meer *E. coli* O157:H7 aanhechten op het

oppervlak rondom beschadigd weefsel. De bacterie werd hier waargenomen tot een diepte van 70µm onder het schiloppervlak (Burnett *et al.*, 2000).

Bij een studie van Hassan (2003) werd een hydrofoob surfactant (Span 85) toegevoegd waardoor er 80% minder *E. coli O157:H7* werd teruggevonden in intacte sla's waarin niet gesneden is. Ditzelfde surfactant was niet effectief voor het verwijderen van de pathogeen uit gesneden oppervlakten (Hassan, 2003). In een experiment van Solomon werd aangetoond dat *E. coli O157:H7* vanuit mest kan binnendringen via de wortels van planten (Solomon *et al.*, 2002).

Van Bruggen (2011) onderzocht de voedselinfecties ten gevolge van *Salmonella enterica* op tomaten. De overdracht van *S. enterica* via de tomatenbladeren werd onderzocht door gebruik te maken van de oppervlakte-actieve stof, Silwet L-77. Deze stof bevordert het binnen dringen en de overleving van *S. enterica* op de tomatenbladeren (Van Bruggen *et al.*, 2011). Uit het onderzoek blijkt dat in een zeer klein aantal van de tomatenplanten, *S. enterica* kan groeien op de bladeren en de vrucht kan koloniseren zonder dat hierbij symptomen aan de plant waarneembaar zijn, met uitzondering van een lichte daling van de groei (Van Bruggen *et al.*, 2011). Bij een studie op sla werd er een vergelijking gemaakt tussen chloor en peroxyazijnzuur gebaseerde desinfectiemiddelen om het Feline calicivirus, het Norovirus en Hepatitis A virus op sla te reduceren (Fraisie *et al.*, 2011). Er was geen significant effect van de desinfectie stap bij het wassen van sla met peroxyazijnzuur. Ook op ontsmette sla met chloor werd geen significante vermindering van het aantal virussen gevonden (Fraisie *et al.*, 2011).

In een studie van Madsen (2012) zijn de interacties tussen bodem flagellaten, algen, en drie verschillende bacteriële pathogenen onderzocht (*C. jejuni*, *S. typhimurium*, en *L. monocytogenes*). Snelle groei van flagellaten werd waargenomen in een co-cultuur met *C. jejuni* en *S. typhimurium*. *C. jejuni* en *S. typhimurium* overleven beter wanneer deze samen gekweekt worden met flagellaten dan wanneer ze alleen worden gekweekt. De resultaten van deze studie suggereren dat bodemflagellaten een rol kunnen spelen voor de overleving van door voedsel overgedragen pathogenen van planten oppervlakken en in de bodem (Madsen *et al.*, 2012). In tabel 6 wordt een algemeen overzicht gegeven van de parameters die de transfer beïnvloeden.

Tabel 6: Overzicht parameters die transfer beïnvloeden

<b>Parameters die de transfer beïnvloeden</b>
Type product
Bacterie soort
Tijd van contact
Desinfectiemiddel
Oppervlaktestructuur product, lading, hydrofobiciteit
Temperatuur
Beschadigd/gesneden oppervlak
Biofilmvorming
Extracellulaire polymeren
Flagellen



## 1.7 Regelgeving en normen

### 1.7.1 Wetgeving en richtlijnen omtrent watergebruik in de primaire sector

Op dit moment bestaat er geen wettelijk criterium voor de kwaliteit van irrigatiewater in België. Er is geen maximumgehalte aan zware metalen of microbiologisch criterium vastgelegd voor de groenten- en fruitteelers. De richtlijnen rond afvalwater (tabel 7) illustreren de wereldwijde onzekerheid over het werkelijk risico van transmissie van pathogenen in irrigatiewater.

Tabel 7: Aanbevelingen/ richtlijnen voor verschillende typen irrigatiewater

	Type water	Aanbeveling/Richtlijn
<b>WHO</b>	(Behandeld) afvalwater	<u>Voor rauw te consumeren gewassen:</u> maximum 1 intestinaal wormei per liter water en maximum 1000 kolonie vormende eenheden (kve) fecale coliformen per 100 ml water (WHO (1989), WC-FAVV 2009) <u>Voor verwerkte gewassen:</u> maximum 1 intestinaal wormei per liter water, geen aanbevolen standaard voor fecale coliformen (WHO (1989))
<b>EPA</b>	Afvalwater	<u>Voor rauw te consumeren gewassen:</u> afwezigheid van detecteerbare fecale coliformen per 100 ml (EPA (1992)) <u>Voor verwerkte en voedergewassen:</u> maximum 200 fecale coliformen per 100 ml (EPA (1992))
	Oppervlaktewater	Minder dan 1000 fecale coliformen per 100 ml water (inclusief rivierwater) (EPA (1973))
<b>FAVV</b>	Oppervlaktewater	Maximum 10 kve <i>E. coli</i> per ml (WC-FAVV 2009)

Volgens de Belgische richtlijnen mag enkel gebruik gemaakt worden van beekwater, water van open putten, boorputwater, stadswater en regenwater voor irrigatie. Indien er twijfel is rond de waterbron worden indien nodig analyses uitgevoerd (GLOBALG.A.P. 2007). De richtlijnen die worden aanbevolen door EPA, voor het gebruik van afvalwater voor irrigatie van gewassen die rauw geconsumeerd worden, zijn gebaseerd op de veronderstelling dat indien pathogene micro-organismen gedetecteerd worden in irrigatiewater, ze een potentieel risico vormen voor de gezondheid (Blumenthal *et al.*, 2000).

De belangrijkste aanbeveling van het WHO zegt dat gebruik van onbehandeld afvalwater verboden is (tabel 7). Oppervlaktewater, grondwater of regenwater kunnen worden gebruikt voor irrigatie, indien na een risico-evaluatie kan worden aangetoond dat bij gebruik van dit water de risico's voor de voedselveiligheid worden beheerst. In 2006 is een nieuwe EU hygiënerichtlijn of de 'General Food Law' in werking gegaan. In samenhang hiermee ontwikkelde de Europese commissie een regelgeving over microbiologische criteria voor levensmiddelen. Ze wil hiermee de onduidelijkheid die bedrijven ervaren met betrekking tot zowel de microbiologische kwaliteit van producten als de beheersing van processen helpen.

Het WC-FAVV stelt enkele aanbevelingen voor irrigatiewater. Dit zijn echter geen verplichtingen (WC-FAVV, 2009). Een eerste richtlijn is om oppervlaktewater minstens één keer per seizoen te analyseren. Indien er meer dan 100 kolonievormende eenheden (kve)/ml *E. coli* in het water aanwezig is, is dit niet geschikt voor irrigatie van groenten en fruit. Onbehandeld afvalwater mag niet

gebruikt worden voor irrigatie. Behandeld afvalwater kan eventueel voor irrigatie gebruikt worden indien het voldoet aan de richtlijnen van het oppervlaktewater (WC-FAVV, 2009).

### 1.7.2 Wetgeving en richtlijnen omtrent microbiologische kwaliteit van groenten en fruit

In de Europese wetgeving worden data vermeld rond de microbiologische kwaliteit waaraan groenten en fruit moeten voldoen.

Listeria monocytogenes: Volgens EU verordening 2073/2005 moet *L. monocytogenes* afwezig zijn in 10 keer 25g groenten/fruit. Als criteria voor het einde van de houdbaarheid moet het aantal kve kleiner zijn dan 100 kve per gram. In levensmiddelen waarin groei evenwel mogelijk is geldt het criterium 'afwezig in 25 gram product' op het moment van productie. Een hoger beginaantal is toegestaan, maar dan moet de producent wel aantonen dat de pathogeen tijdens de bewaarperiode tot uiterste verkoopdatum niet kan uitgroeien tot aantallen hoger dan 100 kve per gram product. Voor proceswater zijn er echter geen normen beschreven (imik, 2006).

Salmonella spp.: Volgens EU verordening 2073/2005 moet *Salmonella* afwezig zijn in 10 keer 25g groenten/fruit. Als criteria voor het einde van de houdbaarheid moet *Salmonella* opnieuw afwezig zijn in 10 keer 25g groenten/fruit (imik, 2006).

E. coli: Volgens de wettelijke normen geldt er voor rauwe groenten en fruit een maximale limiet van 1000 kve per gram (imik, 2006). Voor irrigatiewater geven de richtlijnen een waarde van  $10^4$  kve/100ml weer. Indien het gaat om een pathogene *E. coli* moet deze afwezig zijn in zowel water als producten.

In onderstaande tabel (tabel 8) zijn voor enkele micro-organismen de maximale kolonievormende eenheden weergegeven wanneer de producten bereid en behandeld zijn. Deze normen zijn voor Nederland vanuit de voedsel waren autoriteit (Warenbesluit Bereiding en Behandeling van levensmiddelen, WBBL), (VWA, 2009). Deze gegevens zijn niet beschikbaar voor België.

Tabel 8: Normen voor bereide producten in Nederland (VWA, 2009).

Micro-organismen	Norm	Geldende wetgeving
<i>B. cereus</i>	100 000 kve/g	WBBL
<i>Campylobacter spp.</i>	Afwezig in 25g	WBBL
<i>C. perfringens</i>	100 000 kve/g	WBBL
<i>E. coli</i> O157	Afwezig in 25g	VO. 2073/2005
<i>L. monocytogenes</i>	100 kve/g	VO. 2073/2005
<i>S. aureus</i>	100 000 kve/g	WBBL
<i>Salmonella spp.</i>	Afwezig in 25g	VO. 2073/2005

## 1.8 Situering en doelstelling van de masterproef

Groenten en fruit kunnen microbiologische en chemische verontreinigingen bevatten waardoor ze een risico zijn voor de gezondheid van de consument. Verse groenten en fruit zijn dan ook een belangrijke bron van voedselvergiftigingen en voedselinfecties. Om het risico op deze voedselinfecties door consumptie van groenten en fruit in te schatten wordt de potentiële impact van de kwaliteit van het proceswater na gegaan. Hierbij wordt er door het WaterQ project een grootschalig onderzoek uitgevoerd waarbij een heel aantal bedrijven bevraagd worden naar hun procesvoering, de oorsprong van het gebruikte water, teeltwijze en gewasbeschermingsmiddelen. Daarnaast wordt het proceswater van deze bedrijven ook geanalyseerd op de aanwezigheid van microbiologische en chemische contaminanten. Op deze manier tracht men een algemeen beeld te verkrijgen van de waterkwaliteit van het proceswater uit de primaire sector in de Belgische fruit- en groentensector. Het risico op de volksgezondheid zal in grote mate afhangen van de microbiologische en chemische kwaliteit van het proceswater en de manier waarop dit wordt gebruikt. Deze parameters worden voor de Belgische fruit- en groentensector in kaart gebracht zodat een directe relatie kan worden gelegd tussen de kwaliteit van het proceswater en de contaminanten op het eindproduct. In een laatste fase worden er aanbevelingen opgesteld rond de vereiste kwaliteit van proceswater voor een welbepaald gebruik in de primaire sector.

In deze masterproef wordt de microbiologische kwaliteit van het proces water en van de groenten en fruit onderzocht. Dit onderzoek wordt aan de hand van twee verschillende methoden uitgevoerd. De eerste klassieke methode is een microbiologische analyse met behulp van klassieke plaattellingen door uitplantingen op selectieve voedingsbodems. De stalen worden geanalyseerd op aanwezigheid van *Salmonella* spp., *Escherichia coli* en *Listeria monocytogenes*. Daarnaast zullen ook het mesofiel aerobisch kiemgetal en het aantal coliformen worden meegenomen in de microbiologische analyses.

Als alternatief op de klassieke, tijdsroevende microbiologische methoden wordt een DNA gebaseerde array detectiesysteem ontwikkeld dat snel en eenvoudig de meest relevante pathogenen simultaan kan detecteren in water gebruikt voor primaire plantaardige productie. Er zal een techniek gebruikt worden analoog aan de DNA multiscan® ([www.dnamultiscan.com](http://www.dnamultiscan.com)), een door Scientia Terrae ontwikkelde DNA-array voor het opsporen van plantpathogenen. Deze semi-kwantitatieve technologie laat niet alleen toe om op een zeer snelle manier de aanwezigheid van specifieke pathogenen simultaan (in één enkele test) te detecteren, maar ook om een aanduiding te krijgen van het aantal van deze specifieke pathogenen (Lievens *et al.*, 2003; Lievens & Thomma, 2005). Een belangrijk doel voor de validatie van de array is dat kruisreacties tussen stammen uitgesloten worden, met andere woorden de specificiteit moet aangetoond worden.



## 2 MATERIAAL EN METHODEN

### 2.1 Opgroei en bewaring van bacteriële stammen

In tabel 9 wordt een overzicht gegeven van alle bacteriële stammen die tijdens deze masterproef werden opgegroeid en gehybridiseerd. Een groot deel van deze stammen is afkomstig uit de collectie van het labo zelf. Voor de andere stammen werd hun nummer weergegeven van de databank waaruit ze afkomstig zijn.

Tabel 9: Overzicht van de gebruikte stammen. LMG nummers zijn afkomstig van het Laboratorium voor Microbiologie in de universiteit Gent. STRI staat voor Scientia terrae. Dit zijn de stammen afkomstig uit de eigen collectie. ATCC staat voor American type culture collection. Stammen met een wiv-nummer komen van het Wetenschappelijk instituut volksgezondheid.

Lijst van gebruikte stammen	Referentie/ bron	Groei temperatuur	media
<i>Acinetobacter sp</i>	LMG 1235	30°C	MacConkey agar
<i>Aeromonas hydrophila</i>	LMG 3764	37°C	Nutriënt agar
<i>Aeromonas veronii</i>	LMG 9075	37°C	Nutriënt agar
<i>Agrobacterium sp</i>	Collectie STRI	37°C	Nutriënt agar
<i>Bacillus amiloliquifaciens</i>	Collectie STRI	37°C	Nutriënt agar
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC9634	37°C	Nutriënt agar
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	37°C	Nutriënt agar
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	LMG 17208	37°C	Tryptone soy agar
<i>Campylobacter coli</i>	LMG 6440	37°C	Nutriënt agar
<i>Campylobacter jejuni</i>	LMG 7790	37°C	Nutriënt agar
<i>Campylobacter sp.</i>	Collectie STRI	37°C	Nutriënt agar
<i>Clostridium baratii</i>	DSM-602	37°C	Nutriënt agar
<i>Clostridium botulium</i>	WIV	37°C	Tryptone soy agar
<i>Clostridium butyricum</i>	Collectie STRI	37°C	Tryptone soy agar
<i>Clostridium butyricum</i>	LMG 1217	37°C	Tryptone soy agar
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC12924	37°C	Tryptone soy agar
<i>Clostridium saccharolyticum</i>	Collectie STRI	37°C	Tryptone soy agar
<i>Clostridium saccharolyticum</i>	DSM-2544	37°C	Tryptone soy agar
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Collectie STRI	37°C	Nutriënt agar
<i>Cronobacter turicensis</i>	Collectie STRI	37°C	Nutriënt agar
<i>Escherichia coli 0157</i>	Collectie STRI	37°C	Nutriënt agar
<i>Escherichia coli 25922</i>	ATCC10536	37°C	Nutriënt agar
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC13048	37°C	Nutriënt agar
<i>Enterobacter aeromonas</i>	Collectie STRI	37°C	Nutriënt agar
<i>Enterobacter cloacae</i>	LMG 2683	37°C	Nutriënt agar
<i>Erwinia biilingae</i>	LMG 2606	37°C	Nutriënt agar
<i>Escherichia fergusonii</i>	LMG 7866	37°C	Nutriënt agar
<i>Flavobacterium breve</i>	LMG 21919	37°C	Nutriënt agar
<i>Helicobacter acinonychis</i>	LMG 12684	37°C	Nutriënt agar
<i>Helicobacter equorum</i>	LMG 23362	37°C	Nutriënt agar
<i>Helicobacter heilmanii</i>	DSM-23983	37°C	Nutriënt agar

<i>Helicobacter pylori</i>	LMG 19449	37°C	Nutriënt agar
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Collectie STRI	37°C	Nutriënt agar
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC13883	37°C	Nutriënt agar
<i>Legionella anisa</i>	ATCC35291	37°C	Brain haert agar
<i>Legionella pneumophila</i>	CCUG13398	37°C	Brain haert agar
<i>Listeria innocue</i>	ATCC33090	37°C	Brain haert agar
<i>Listeria ivanovii</i>	Collectie STRI	37°C	Brain haert agar
<i>Listeria monocytoca</i>	Collectie STRI	37°C	Brain haert agar
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC7644	37°C	Brain haert agar
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	CCUG 35378	37°C	Nutriënt agar
<i>Mycobacterium marinum</i>	CCUG 20998	37°C	Nutriënt agar
<i>Pseudomonas mendocina</i>	LMG21630	37°C	Nutriënt agar
<i>Salmonella Parathypi</i>	LMG16739	37°C	Nutriënt agar
<i>Salmonella typhimurium</i>	LMG14933	37°C	Nutriënt agar
<i>Serratia sp</i>	ATCC13880	37°C	Nutriënt agar
<i>Shigella sonnei</i>	LMG 10473	37°C	Nutriënt agar
<i>Sphingomonas pruni</i>	LMG 18380	37°C	Nutriënt agar
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	37°C	Nutriënt agar
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC12228	37°C	Nutriënt agar
<i>Staphylococcus equorum</i>	LMG19116	37°C	Nutriënt agar
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Collectie STRI	37°C	Nutriënt agar
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	LMG7893	37°C	Nutriënt agar + 1%NaCl
<i>Vibrio alginolyticus</i>	LMG10943	37°C	Nutriënt agar + 1% NaCl
<i>Vibrio cholera</i>	Collectie STRI	37°C	Nutriënt agar + 1%NaCl
<i>Zymomonas mobilis</i>	LMG 404	37°C	Nutriënt agar

## 2.2 Microbiologische analyses

### 2.2.1 Staalname

De staalname van het water en de producten verloopt volgens 'standard operating procedures' (SOP) door de medewerkers van het proefstation voor de groenteteelt en van het proefcentrum fruitteelt om de staalname zo uniform mogelijk te houden. De stalen worden op een zo steriel mogelijke wijze genomen om contaminatie tijdens de staalname of het transport te vermijden.

### 2.2.2 Kwantificatie van het aantal coliforme bacteriën

#### Waterstalen

Coliformen aanwezig in het water worden bepaald aan de hand van de norm NEN 6571. De waterstalen worden gehomogeniseerd door krachtig schudden. Nadien wordt een geschikt volume water (100 ml) gefiltreerd d.m.v een membraanfilter (0.45 µm). Indien de concentratie aan coliformen niet gekend is, kunnen meerdere verdunningen in pepton fysiologische zoutoplossing (PFZ) gefiltreerd worden. De membraanfilters worden vervolgens overgebracht op het oppervlak

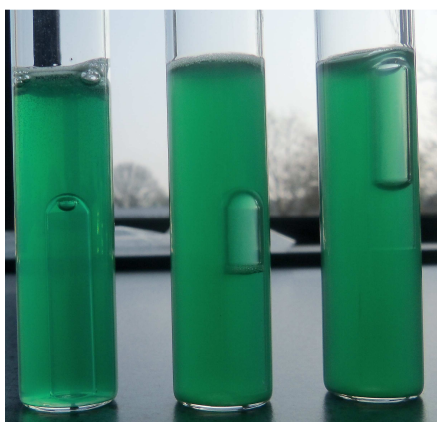
van het selectief agarmedium, Lauryl Sulfaat Agar (LSA, Oxoid) en geïncubeerd bij 37 °C onder aërobe omstandigheden gedurende 24 h.

#### Productstalen

Coliformen in productstalen werden bepaald via de ISONorm ISO 4832:2006 (Christison *et al.*, 2007). Er wordt 10 g van het groente- of fruitstaal afgewogen en aangelengd met PFZ tot 100 g. De suspensie wordt gehomogeniseerd in een stomacher gedurende 1 minuut. In een volgende stap wordt een decimale verdunningsreeks in PFZ bereid en wordt 1 ml van elke verdunning overgebracht in een lege (gelabelde) petriplaat. 15 tot 20 ml Voilet Red Bile Lactose (VRBL, Bio-Rad) medium wordt in de petriplaten gegoten en gemengd. Nadat de agar gestold is, wordt dit met een dun laagje VRBL (toplaag) overgoten en bebroed. Na het stollen van de toplaag worden de platen op 37 °C gedurende 24h geïncubeerd. Er wordt ook een blanco plaat meegenomen om de steriliteit na te gaan.

#### Aflezen resultaten en bevestigen van de water-, groenten- en fruitstalen

Na 24 h incubatie wordt het aantal karakteristieke kolonies geteld. Indien karakteristieke kolonies worden waargenomen dienen minstens 5 (of allemaal, indien het aantal < 5) kolonies bevestigd te worden. Die bevestiging gebeurt door losliggende kolonies over te brengen in Briljant Green Bile Broth (BGBB, Bio-Rad), met een durhambuisje, met behulp van een steriel entoog (figuur 14). De buisjes worden vervolgens gedurende 24-48 h geïncubeerd bij 37 °C. Wanneer de bacteriën lactose fermenteren wordt er gas geproduceerd dat door de durhambuisjes wordt opgevangen. Buisjes met gasvorming wijzen op de aanwezigheid van coliformen in het onderzochte monster. Het aantal coliformen in het monster kan dan berekend worden (Dijk *et al.*, 2007).



Figuur 14: Bevestiging coliformen in BGBB- buizen. Links: negatief resultaat, rechts: positief resultaat

### 2.2.3 Kwantificatie van het mesofiel aëroob kiemgetal

#### Waterstalen

Het totaal kiemgetal voor water werd bepaald volgens de Europese norm EN/ISO 6222. Van de waterstalen wordt een verdunningsreeks ingezet van  $10^{-2}$  tot  $10^{-6}$ . Vervolgens worden deze verdunningen uitgeplaat op steriele petriplaten en gemengd met Plate Count Agar (PCA) zonder dextrose. Deze gietplaten worden vervolgens 72h geïncubeerd op 22 °C.

#### Productstalen

De voedingsnorm is beschreven in ISO 4833: 2003 (Christison *et al.*, 2007). Van de groente- en fruitstalen wordt er 10 g staal gemengd met 90 g PFZ in een stomacherzak. Vervolgens wordt dit een korte tijd intensief gemengd in de stomacher. Hiervan wordt 1 ml overgebracht en een verdunningsreeks gemaakt. Vervolgens worden deze verdunning uitgeplaat in steriele petriplaten en gemengd met PCA. Er wordt ook een blanco meegenomen. De gietplaten worden 72 h geïncubeerd op 30 °C.

#### Aflezen resultaten van water-, groenten- en fruitstalen

Alle kolonies op de PCA-platen worden geteld (telbare platen tussen 15 en 300 KVE). Tenslotte wordt het aantal KVE/ml berekend.

### 2.2.4 Kwantificatie van *Escherichia coli*

#### Waterstalen

De ISO-norm voor water is ISO 16649-2. Van de waterstalen wordt er een (of meerdere) geschikte verdunning(en) gemaakt (afhankelijk van de te verwachte concentratie aan *E. coli*) en gefiltreerd d.m.v. een membraanfilter (0.45 µm). Deze filter wordt vervolgens op het oppervlak van het selectief agarmedium, Rapid'E.coli 2 Agar (REC2A, Bio-Rad) waaraan een supplement (RAPID'E.coli 2 supplement, Bio-Rad) wordt toegevoegd, geplaatst en vervolgens geïncubeerd op 44 °C onder aërobe omstandigheden gedurende 24 h.

#### Productstalen

De ISO-norm voor productstalen is ISO 16654. De productstalen worden verdund in PFZ door 10 g product te mengen met 90 g PFZ. Vervolgens wordt hieruit een verdunningsreeks aangemaakt. Per verdunning wordt 1 ml overgebracht in een steriele petriplaat en gemengd met REC 2-ager. De petrischalen worden samen met een blanco 24 h geïncubeerd op 44 °C.

#### Aflezen resultaten water-, groenten- en fruitstalen

Na incubatie wordt het aantal karakteristieke kolonies geteld (figuur 15). *E. coli* groeit op REC2 medium als roze tot paarse kolonies.



Figuur 15: Resultaat *E. coli* waterstaal van 100, 10 en 1ml op REC2agar



## 2.2.5 Detectie van *Salmonella*

### Waterstalen

Er wordt 100 ml waterstaal gefiltreerd doorheen een 0.45 µm membraan. In geval van drinkwater wordt er 1L gefiltreerd. Vervolgens wordt dit membraan op steriel wijze overgebracht in een falcontube gevuld met 50 ml van een niet-selectieve vooraanrijkingsmedium, gebufferd peptonwater (BPW) (Biorad) en gedurende 16-20 h geïncubeerd bij 37 °C. Na incubatie wordt vanuit de vooraanrijking enerzijds 100 µl overgeënt in Rappaport Vassiliadis Soya broth (RVS) (Biorad) en anderzijds 1000 µl in Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocine bouillon (MKTTn) (Biorad) en gemengd. De buizen worden vervolgens gedurende 24 h geïncubeerd bij 37 °C voor MKTTn en 41,5 °C voor RVS. Vanuit beide aanrijkingsmedia wordt er 10 µl uitgestreken op een RAPID'Salmonella (Rsal)-plaat (Bio-Rad) en op een Xylose Lysine Desoxycholate-agarplaat (XLD, Bio-Rad) zodat afzonderlijke kolonies bekomen worden. De platen worden vervolgens 24 h geïncubeerd bij 37 °C.

### Productstalen

Er wordt 25g product afgewogen in een steriele stomacherzak en aangelengd met BPW tot 250g. Deze massa wordt enkele seconden volledig geplet in een stomacher. Na incubatie van ongeveer 18 h op 37 °C wordt vanuit deze primaire aanrijking 100 µl overgeënt in RVS en 1000 µl in MKTTn. De MKTTn buizen worden gedurende 24 h geïncubeerd bij 37 °C. De RVS buizen worden dezelfde tijd op 41,5 °C geïncubeerd. Vervolgens wordt er een strijkening gedaan met een steriele entoog vanuit deze buizen naar Rsal en XLD. Deze worden tenslotte 24 h geïncubeerd bij 37 °C.

### Aflezen en bevestigen van de resultaten van water-, groenten- en fruitstalen

Op de Rsal-platen vertoont *Salmonella* grote paarse kolonies. Op XLD vormt *Salmonella* zwarte kolonies met een enigszins transparante zone waarbij de kleur van het medium rondom een kolonie rozerood is. Indien er verdachte kolonies gedetecteerd worden, dienen deze bevestigd te worden. De kolonies worden biochemisch bevestigd door gebruik te maken van API20E® (Biomérieux) en serologisch door gebruik te maken van een latextest (Bio-Rad)(Dijk *et al.*, 2007).

## 2.2.6 Detectie van *Listeria monocytogenes*

### Waterstalen

Afhankelijk van het soort water wordt er een volume (100 ml voor niet drinkbaar of 1 L voor drinkbaar water) gefilterd doorheen een 0.45 µm membraan. Vervolgens wordt dit membraan overgebracht in een falcontube met de vooraanrijkingsbouillon, half-Fraserbouillon (Bio-rad). De incubatie vindt plaats op 30 °C gedurende 24 h. Na incubatie wordt vanuit deze primaire aanrijking opnieuw 100 µl overgeënt in Fraserbouillon. Deze buizen worden gedurende 48 h geïncubeerd bij 37 °C. Vervolgens wordt 10 µl vanuit deze Fraserbouillon op een ALOA (Agar Listeria According to Ottaviani and Agosti) (Bio-rad) en een Palcam -plaat (Bio-rad) geënt m.b.v de vijhoekmethode zodat er losliggende kolonies bekomen worden. Deze platen worden geïncubeerd op aërobe wijze bij 37 °C gedurende 48 h.

### Productstalen

Er wordt 25 g product afgewogen in een steriele stomacherzak en dit wordt gemengd met aanrijkbouillon, half-fraserbouillon tot 250 g. Vervolgens wordt dit mengsel gehomogeniseerd in de stomacher. Na incubatie op 30 °C gedurende 24 h wordt 100 µl overgeënt in Fraserbouillon. De beënte Fraserbouillon wordt opnieuw geïncubeerd bij 37°C gedurende 48h. Nadien worden ALOA (Bio-rad) en Palcam -platen (Bio-rad) geënt m.b.v een oogentnaald. Door een suspensiehoeveelheid uit te smeren m.b.v de vijkoekmethode worden er losliggende kolonies bekomen. Tenslotte worden deze platen bebroed bij 37 °C gedurende 48 h.

### Aflesen resultaten en bevestigen van de water-, groenten- en fruit stalen

Op de ALOA-platen zijn positieve kolonies groenblauw en omringd door een ondoorzichtige halo (figuur 15). Op de Palcam-platen groeien *Listeria spp.* als kleine grijsgroene kolonies met een zwart hof (figuur 16). Specifieke kolonies worden overgeënt op een TSYE (tryptone, soy yeast extract )-agar en 24 h geïncubeerd op 37 °C. Bevestiging van positieve kolonies gebeurt met een Rhamnose (Bio-Rad) en hemolyse-test. Bij de Rhamnosetest wordt wat materiaal afgenomen m.b.v. een steriel entoog en in een buisje met koolhydraatbouillon gebracht. Na incubatie van 24 h op 37 °C kleuren positieve stalen van paars naar geel wat wijst op zuurvorming (figuur 17). Bij de tweede bevestiging wordt er een strijkening gemaakt op een bloedagarplaat (Colombia Blood Agar, Bio-rad). Na incubatie gedurende 24 h op 37 °C geven positieve *L.monocytogenes* kolonies een smalle, heldere lichte zone van hemolyse ( $\beta$ -hemolyse).



Figuur 16: Positieve listeria-kolonies op een Palcam-agar (links) en op een ALOA-agar (rechts)



Figuur 17: Rhamnose-test ter bevestiging van *Listeria*. Links: positief resultaat en rechts: negatief resultaat

## **2.3 DNA-extractie, PCR en agarose gelelektroforese van bacteriële stammen, water- en productstalen**

### **2.3.1 DNA-extractie voor waterstalen en bacteriële stammen**

Voor de waterstalen en bacteriële stammen werd DNA geïsoleerd met behulp van een fenol-chloroform extractie. Per staal wordt een microtube van 2 ml voorbereid. Als eerste stap worden in de 2 ml microtubes twee verschillende soorten glazen "beads" aangebracht. Er wordt ongeveer 75 µl beads van 212-300 µm (Sigma) toegevoegd en enkele beads (Sigma) van 3 mm. 300 µl lysisbuffer (2,5 M LiCl; 50 mM TRis HCl op pH 8; 4% Triton X-100; 62,4 mM Na<sub>2</sub>-EDTA op pH 8) wordt toegevoegd aan de cellen zodat deze openbreken met behulp van de lyserende componenten zoals Triton-X in de buffer. Indien een DNA-extractie uitgevoerd moet worden vertrekkende van een kolonie op een petriplaat, wordt er met behulp van een entnaald aseptisch voldoende materiaal (ongeveer 1 entoog) van de plaat overgebracht in de microtube. Wanneer een DNA-extractie van een waterstaal wordt uitgevoerd, wordt 1L water gefiltreerd over een 0,45 µm membraan. Dit membraan wordt dan toegevoegd aan de microtubes. Vervolgens wordt 300 µl fenol uit de fenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)-oplossing toegevoegd.

Na homogenisatie met de Fastprep™ (Bertin technologies) op hoogste snelheid en centrifugatie (5 min, 10 000 rpm) wordt de waterige fase overgenomen. Het DNA wordt vervolgens neegeslagen door toevoeging van 2 volumes ethanol (100%). Nadien worden de stalen minstens 15 min op -20°C bewaard. Na centrifugatie (5 min, 10 000 rpm) wordt het supernatans verwijderd. De DNA-pellet wordt nog gewassen met 70% ethanol en daarna gedroogd aan de lucht. Zodra alle ethanol verdampt is, wordt de pellet opgelost in een 10 mM Tris-oplossing (pH 8). Het geëxtraheerde DNA kan onmiddellijk gebruikt worden of gestockeerd worden bij -20°C. De concentratie van het geëxtraheerde DNA wordt bepaald met een nanodrop spectrofotometer.

### **2.3.2 DNA-extractie voor productstalen**

Voor de groenten en fruit stalen werd een DNA-extractie uitgevoerd met behulp van de 'UltraClean® Soil DNA Isolation Kit (MO BIO). Bij deze kit zijn alle oplossingen reeds op voorhand bereid. Er wordt 1 g product afgewogen in een "bead solution tube". Vervolgens wordt 60 µL "Solution S1" toegevoegd wat zorgt voor de cel lysis. Nadien wordt er 200 µL "inhibiter removal solution" toegevoegd. Dit zal PCR-inhibitoren neerslaan. Na het vortexen op maximale snelheid gedurende 10 min wordt er 30 s gecentrifugeerd op 10 000 rpm. Nu wordt het supernatans in een nieuwe tube overgepipetterd. 250 µL "Solution S2" zorgt voor precipitatie van aanwezige eiwitten. Nadat opnieuw het supernatans wordt overgebracht wordt 1,3 mL "Solution S3" toegevoegd wat er voor zal zorgen dat DNA bindt aan silica. Vervolgens wordt het supernatans op een "spin filter" geladen en gecentrifugeerd gedurende 1 min op 10 000 rpm. Het DNA zal nu binden aan het silica membraan in de filter. 300 µL "Solution S4" zorgt er vervolgens voor dat er geen zouten of andere contaminanten achter blijven op het silica membraan. De filter wordt nu in de finale tube geplaatst en door het bijvoegen van 50 µL "Solution S5" of 10 mM tris (pH 8) zal het DNA doorheen de silica membraan elueren. Het geëxtraheerde DNA kan onmiddellijk gebruikt worden of gestockeerd worden bij -20 °C. De concentratie van het Geëxtraheerde DNA wordt bepaald met de nanodrop.

### 2.3.3 Polymerase chain reaction (PCR)

#### 2.3.3.1 Amplificatie van doelwitgenen

De concentratie van het DNA-staal wordt verdund tot 5 ng/μL. Vervolgens wordt een PCR-mengsel aangemaakt. Deze bevat de forward en reverse primer (tabel 10), buffer, dNTP's, Taq DNA polymerase en water. De hoeveelheden worden weergegeven in tabel 11. Aan 20μL van het PCR-mengsel wordt 1 μL DNA (5 ng/μL) toegevoegd. Er wordt ook een blanco meegenomen. Voor de PCR-reactie op het 16S-rRNA gen wordt gebruik gemaakt van forward primer 8F en de reverse primer 1492R. Bij een PCR op het *pckA*-gen wordt een combinatie van F1A + F1B (forward primers) met R3A + R3B (reverse primers) gebruikt. Ook voor deze reactie worden de forward- en reverse primers toegevoegd in een totale concentratie van 0,5μM.

Tabel 10: Gebruikte primers

Naam primer	Sequenties (5' → 3')	Target-gen
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	16S
F1A	ATGAACTACCTGCTGCCGCT	<i>pckA</i>
F1B	ATGAACTACTTCCTGCCGCT	<i>pckA</i>
R3A	CATACGTTTCACCAGCAC	<i>pckA</i>
R3B	CATACGTTTTACCAGCAC	<i>pckA</i>

Tabel 11: PCR reactiemengsel voor 1 staal

Reagentia	Volume voor 1 staal (μl)	Eindconcentratie	Firma
10x Buffer (met MgCl <sub>2</sub> 45 mM)	2	1x	BD, Biosciences
dNTP/dig dNTP* mengsel 2mM	1,5	0,15mM	Invitrogen
Forward primer 20μM	0,5	0,5μM	IDTDNA
Reverse primer 20μM	0,5	0,5μM	IDTDNA
Titanium Taq DNA polymerase (50x)	0,4	1x	BD, Biosciences
s-HPLC water	14,1		
Template DNA	1	5ng/μl	
<b>Totaal</b>	<b>20</b>		

\*digoxigenin gelabelde dNTP's (gelabelde dNTP's nodig voor visualisatie bij hybridisatiereactie).

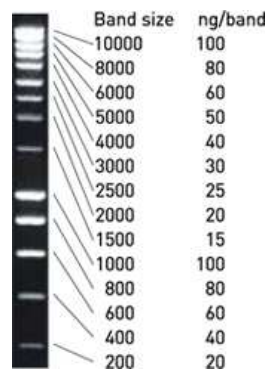
Vervolgens worden deze in het PCR-toestel (Biorad, T100 Thermal cycler) geplaatst en het PCR- programma ingesteld (tabel 12).

Tabel 12: PCR programma

Stap	Temperatuur (°C)	Tijdsduur	# Cycli
Initiële denaturatie	94	2 min	1x
Denaturatie	94	45 sec	} 30x
Annealing	59 (16S rRNA-gen) 64 ( <i>pckA</i> -gen)	45 sec	
Extensie	72	45 sec	
Extensie	72	10 min	1x

### 2.3.4 Agarosegelelektroforese

Er wordt een 1,5% agarosegel aangemaakt 150 ml TAE-buffer (grote gel) Een 50x oplossing van 1L bevat 242g Tris, 750 ml demiwater, 57.1 ml ijsazijn en 100ml van 0.5 M EDTA (pH 8.0). Na verwarming in de microgolfoven en afkoelen (tot ongeveer 50°C) wordt 2,25 µl ethidiumbromide toegevoegd bij een grote gel en 0,75 µl bij een kleine gel en gemengd. De gel wordt na afkoeling in een elektroforese-tank gegoten. Aan de te laden hoeveelheid DNA (2 µl) wordt 2 µl ladingsbuffer (Promega) toegevoegd. Als referentiemerker wordt smartladder (Eurogentec, figuur 18) toegevoegd. De elektroforese gebeurt bij een voltage van 135 V en 60 V gedurende 1h15min en 45 min voor een grote en kleine gel respectievelijk. Vervolgens wordt de gel gevisualiseerd met behulp van het Biodoc-it Imaging System.



Figuur 18: Grootte van de DNA fragmenten van de smartladder die gebruikt wordt als referentiemerker (Eurogentec, 2012).

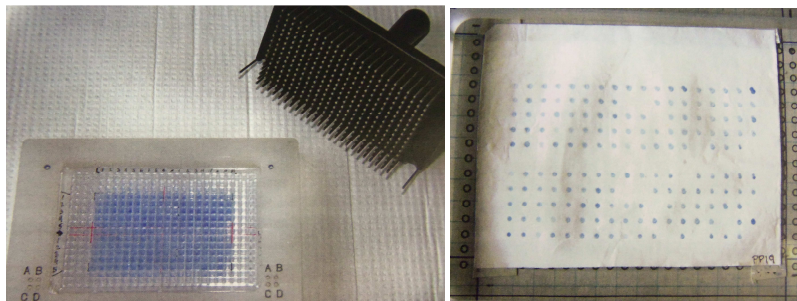
## 2.4 Ontwikkeling en gebruik van de DNA-array

### 2.4.1 Ontwikkeling van detectoroligonucleotiden

Genus- en species-specifieke detectoroligonucleotiden worden ontwikkeld op het 16S rRNA- en het *pckA* gen. De sequenties van de doelwit en niet-doelwit organismen worden opgezocht in Genbank via de website van het National Center for Biotechnology Information (NCBI). Deze sequentie worden met elkaar vergeleken en gealigneerd met behulp van Clustal W (Larkin, 2007). Hierdoor worden de gelijkenissen en verschillen tussen de targetgenen van de verschillende bacteriën blootgelegd. Na het vinden van diagnostische regio's in het targetgen gebaseerd op het 16S-rRNA of het *pckA* gen, waar aan de hand van 1 of meerdere puntmutaties een onderscheid gemaakt kan worden tussen de verschillende organismen, worden de oligonucleotiden met een lengte tussen de 17 en 23 basen ontwikkeld. De smelttemperatuur moet tussen de 55 °C en 65 °C liggen zodat dit geen probleem kan vormen voor de hybridisatie (54 °C). Eenmaal een oligo gevonden, wordt er een laatste controle uitgevoerd door deze oligo in te voeren in het BLAST programma. Indien dit geen kruisreacties oplevert, i.e. 100% identiteit vertoont met het targetgen van een niet detectororganisme, wordt dit oligonucleotide verder geëvalueerd op specificiteit en gevoeligheid in "Wet-labo".

## 2.4.2 Immobilisatie van de oligonucleotiden op een membraan

Een stockoplossing van de detectoroligonucleotiden wordt aangemaakt in een 384-well plaat door 160 µl printingbuffer (0.5 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.4 en 0.004% bromofenolblauw) te mengen met 40 µl van het oligonucleotide. Er wordt ook een 10 µM digoxigenine gemerkte referentieoplossing toegevoegd aan de 384-well plaat. Immodyne ABC Membranen (PALL Europe Limited, Portsmouth, UK) worden uitgesneden op de gewenste grootte. Vervolgens worden oligonucleotiden gespot op het membraan met een 384 pin replicator (0.2 µl; V&P Scientific) (figuur 19). Deze replicator wordt voor gebruik telkens 5 min in volgende oplossingen gezet: VP110 (V1P Scientific Pin Cleaner), water en isopropanol. Na het drukken wordt het membraan 10 minuten gedroogd aan de lucht en nadien in blockingbuffer (samenstelling buffers tabel 13), geïncubeerd gedurende 30 min bij kamertemperatuur. Daarna zijn de membranen klaar voor prehybridisatie of kunnen ze verder overnacht gedroogd worden aan de lucht. Bewaring van de membranen gebeurt in luchtdichte enveloppen bij kamertemperatuur. Hoe de verschillende detectoroligonucleotiden gespot worden op het membraan wordt in figuur 20 weergegeven.



Figuur 19: Drukken van membranen met replicator

REF						REF	
CampDR1_1		HpyloriDR1_2	CampDR1_1		HpyloriDR1_2	CbotDR1_1	8F
CampDR1_2b		HpyloriDR1_3	CampDR1_2b		HpyloriDR1_3	CbotDR1_2	1492R
CampDR3_3	EcoliDR1_1	HpyloriDR3_1	CampDR3_3	EcoliDR1_1	HpyloriDR3_1	CbotDR1_3	516F
CperfDR1_1	EcoliDR1_2	Legionella 19	CperfDR1_1	EcoliDR1_2	Legionella 19	CbotDR2_1	341F
CperfDR2_3	EcoliDR1_3	Legionella 24	CperfDR2_3	EcoliDR1_3	Legionella 24	CbotDR2_2	8F
CperfDR3_2	EcoliDR2_2	ListDR2_1	CperfDR3_2	EcoliDR2_2	ListDR2_1	CbotDR2_3	1492R
SaurDR1_1	ShigDR1_1	ListDR3_1	SaurDR1_1	ShigDR1_1	ListDR3_1	CbotDR3_1	516F
SaurDR3_1	ShigDR1_2	ListDR3_2	SaurDR3_1	ShigDR1_2	ListDR3_2	CbotDR3_2	341F
SaurDR3_2	ShigDR1_3	MycO 2	SaurDR3_2	ShigDR1_3	MycO 2	CbotDR3_3	
Flavo 4	VcholDR1_3	MycO 21	Flavo 4	VcholDR1_3	MycO 21		
Flavo DR1	VcholDR2_1	Aero3-4	Flavo DR1	VcholDR2_1	Aero3-4		
	VcholDR2_2	Aero 4		VcholDR2_2	Aero 4		
	SalmDR1_1			SalmDR1_1			
	SalmDR1_2			SalmDR1_2			

Figuur 20: Samenstelling en opbouw van het membraan gebruikt in deze studie van de analyse van de water- en productstalen. Er wordt telkens weergegeven waar de verschillende oligonucleotiden op het membraan gespot worden voor volgende doelwitorganismen: *Campylovacter sp*, *C. perfringens*, *S. aureus*, *Flavobacterium sp*, *E. coli*, *Shigella sp*, *V. cholerae*, *Slamonella sp,H*; *pylori*, *Legionella sp*, *Listeria sp*, *Mycobacterium sp* en *Aeromonas*. Er worden 4 in duplo controles voor het 16S rRNA-gen meegenomen (8F, 1492R, 516F, 341F). Als positieve controle op de hybridisatie wordt ook een referentieoplossing gespot op de membranen, bestaande uit een 10 µM digoxigenine gelabelde oligonucleotide oplossing.

### 2.4.3 Hybridisatie van de DNA-array

Een DNA macroarray is een vast oppervlak waarop een verzameling van specifieke DNA sequenties is aangebracht. DNA van water- of productstalen worden geëxtraheerd en de doelwitgenen (16S rRNA- of *pckA* gen) worden met PCR. De PCR producten worden gemerkt met Digoxigenine (DIG). De targets worden vervolgens gehybridiseerd met de probes op de microarray. Als het DNA complementair is met de detectoroligonucleotiden zal het binden op het membraan en kan na visualisatie worden nagegaan welke DNA sequenties en organismen er aanwezig zijn in een bepaald staal (Brown, 2008).

Voor de eigenlijke hybridisatiereactie worden 3 à 4 gedrukte membranen van ongeveer 10x5cm overgebracht in 50 ml falcontubes met 25 ml prehybridisatiebuffer. De samenstelling van de gebruikte buffers is weergegeven in tabel 13. Vervolgens worden de tubes geïncubeerd bij 54°C (hybridisatietemperatuur) gedurende minimum 1,5h in een roterende hybridisatieoven aan een snelheid van ongeveer 4 rpm. 50 ml falcontubes gevuld met 12 ml hybridisatiebuffer. Die worden in een waterbad geplaatst van 65°C. Na amplificatie en DIG-labeling van de targetgenen wordt dit PCR product gedenatureerd in de T100™ Thermal PCR Cycler gedurende 5 min op 95°C. De membranen worden overgebracht in de verwarmde hybridisatie-oplossing en hieraan wordt het gedenatureerde DNA dan zo snel mogelijk toegevoegd. Nadien worden de tubes overnacht geïncubeerd bij 54°C in een roterende hybridisatieoven op een snelheid van ongeveer 4 rpm.

Na overnacht incubatie wordt de hybridisatie-oplossing verwijderd en vervangen door 15 ml warme stringency buffer (samenstelling tabel 13) van ongeveer 65°C toe. Vervolgens worden de tubes opnieuw geïncubeerd in de hybridisatieoven bij 54°C gedurende 40-45 min. Nadien wordt de stringency buffer afgegoten en wordt bovenstaande stap een tweede keer herhaald. Hierna worden de membranen gedurende 5 min al schuddend (bij 3,5 rpm) gewassen in 300 ml was buffer (samenstelling tabel 13). Voor de visualisatie van de hybridisatie wordt gebruik gemaakt van Anti-Digoxigenine-Alkaline fosfatase (AP) Fab fragmenten (Roche). Deze Fab fragmenten zijn gericht tegen de DIG-moleculen waarmee de targetgenen gelabeld werden tijdens de PCR. Nadat de membranen een 1<sup>ste</sup> keer worden geïncubeerd in 300ml buffer 2 worden deze vervolgens opnieuw 30 min geïncubeerd in 250 ml van een verdunde anti-DIG-AP oplossing (1:25000 in buffer 2). De membranen worden vervolgens driemaal 20 min gewassen in 400 ml wasbuffer om al de ongebonden antilichaamconjugaten te verwijderen. Vervolgens worden de membranen 15 minuten in 250 ml buffer 3 (samenstelling tabel 13) geïncubeerd op een snelheid van 3,5 rpm. Deze buffer brengt de membranen in de juiste condities voor de enzymatische reactie.

De membranen worden ontwikkeld met behulp van CDP-Star (Roche) oplossing (1/100 verdunning in buffer 3). Dit is een chemiluminescent substraat dat na defosforylatie door het AP licht zal emitteren. Hiertoe wordt 1 ml van een verdunde CDP-Star oplossing uniform verdeeld over de membranen. Vervolgens worden de membranen gedurende 5 min bij 37 °C geïncubeerd. Na incubatie worden de membranen in het AutoChemi System (Biospectrum AC) geplaatst en ontwikkeld via bijhorende Labworks 4.6 Software. Er worden 10 foto's gemaakt gedurende 10 keer 30 sec. Deze foto's worden tenslotte gereconstrueerd in één beeld.

Tabel 13: Samenstelling buffers hybridisatiereacties

<b>Buffer</b>	<b>Samenstelling</b>
<b>Blockingbuffer</b>	150ml 6X SSC, 300ml Water, 4,5g caseïne en 250µL Tween 20 voor 450 ml blockingbuffer
<b>20X SSC</b>	315,7g NaCl (Sigma), 158,9g Natriumcitraat (Sigma) aanlengen tot 2L met water (pH 7).
<b>Hybridisatiebuffer</b>	6x SSC (saline natriumcitraat), 0,1% SDS (Natrium Dodecyl Sulfaat (Sigma))
<b>Prehybridisatiebuffer</b>	1% caseïne (Sigma) in hybridisatie buffer (6x SSC); 0.1% lauroylsarcosine; 0.02% SDS (Sigma) met 20x SSC (3 M NaCl)
<b>Stringency buffer</b>	6x SSC; 0.1% SDS (Natrium Dodecyl Sulfaat (Sigma) met 20x SSC: 3 M NaCl en 0,3 M Natriumcitraat (Sigma).
<b>Wasbuffer</b>	1x Buffer 1; 0.3% Tween 20 (polyoxyethyleen-sorbitanmonolauraat) met 5x buffer 1: 0.5M maleïnezuur
<b>Buffer 2</b>	1x buffer 1; 1% caseïne (Sigma) met 5x buffer 1 (0.5M maleïnezuur (Sigma); 0.75M NaCl en NaOH pellets (pH 7)
<b>Buffer 3</b>	(1x) (5x buffer 3: 0.5M Trizma Base (Sigma) en 0.5M NaCl (Sigma).



## 3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

### 3.1 Inleiding

Deze masterproef kadert in het WaterQ project waarin de microbiologische kwaliteit van water gebruikt in de primaire sector van groenten en fruit in kaart wordt gebracht. Dit water is een mogelijke bron van contaminatie voor groenten en fruit. Om dit in kaart te brengen werden in het waterQ project in een 1<sup>ste</sup> fase waterstalen genomen op 43 bedrijven in de groentensector (vooral bladgewassen) en 30 bedrijven in de fruitsector (vooral natte sortering appels en peren). De waterstalen genomen in de eerste fase werden in voorgaand onderzoek reeds geanalyseerd op een beperkt aantal microbiologische parameters met behulp van klassieke uitplatingen. De stalen werden geanalyseerd op de aanwezigheid van *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* en *Listeria monocytogenes*. Deze keuze is gebaseerd op de regelgeving beschreven in de EU hygiënerichtlijnen (EC/852/2004). Daarnaast werd het mesofiel aerob kiemgetal en het aantal coliformen ook meegenomen in de microbiologische analyses. Coliformen zijn bacteriën die behoren tot de *Enterobacteriaceae* en worden als hygiëne-indicator gebruikt (Tortora, 2007). Het totaal kiemgetal van water geeft een indicatie van de algemene microbiologische kwaliteit van een grondstof of product (Dijk *et al.*, 2007). *E. coli* wordt gebruikt als indicatororganisme voor hygiënische productiewijzen in het algemeen en mogelijke fecale besmetting (Dijk *et al.*, 2007).

Nadien werden in een 2<sup>de</sup> fase een selectie van bedrijven verder opgevolgd. Hierbij werden er zowel water- als productstalen onderzocht om de mogelijke overdracht van microbiële contaminanten in het water op het product te analyseren. De doelstelling van deze masterproef is om klassieke microbiologische analyses van water- en productstalen in de 2<sup>de</sup> fase (opvolging van een selectie van bedrijven) van het onderzoek uit te voeren. Naast *Salmonella*, *Listeria*, en *E. coli* zijn er ook andere pathogenen die een risico inhouden voor de volksgezondheid. Maar klassieke uitplatingen vragen veel tijd en het is onmogelijk om alle mogelijke pathogenen apart te gaan detecteren via uitplating op selectieve voedingsbodems. Daarom werd een nieuwe DNA-array ontwikkeld die toelaat om in één eenvoudige en snelle test verschillende relevante pathogenen te detecteren. Deze DNA-array werd vervolgens gebruikt om alle water- en productstalen die genomen werden in zowel de eerste als de tweede fase van het WaterQ project te analyseren op aanwezigheid van een set aan relevante pathogenen of indicatororganismen.

## 3.2 Ontwikkeling en prevalidatie van de DNA-array

### 3.2.1 Ontwikkeling van detectoroligonucleotiden

In eerste instantie werd gekozen om alle oligonucleotiden te ontwikkelen op het 16S gen. Dit is een zeer geconserveerd gen dat in alle bacteriën voorkomt. Via dit gen was het niet mogelijk om voor *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae* en *E. coli* detectoroligonucleotiden te ontwikkelen die specifiek waren voor elke stam. Daarom werd voor deze bacteriën overgestapt op het *pckA* gen. Hierbij was het wel mogelijk om oligonucleotiden te ontwikkelen die differentiëren tussen *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* en *V. cholerae*. Voor alle doelwitorganismen werden minimaal 2 detectoroligonucleotiden ontwikkeld op basis van kleine verschillen in het 16S-rRNA of het *pckA* gen. De sequenties van de ontwikkelde oligonucleotiden worden niet vrij gegeven. Voor de selectie van pathogenen waarvoor de DNA-array ontwikkeld werd, werd vooral gebruik gemaakt van een overzicht opgesteld door FAO (FAO/WHO 2008). Volgende pathogenen worden gespot op het membraan:

- *Campylobacter* spp.
- *Clostridium perfringens*
- *Helicobacter pylori*
- *Mycobacterium* spp.
- *Staphylococcus aureus*
- *Vibrio cholerae*
- *Escherichia coli*
- *Shigella* spp.
- *Salmonella* spp.
- *Listeria monocytogenes*
- *Flavobacterium* spp.
- *Legionella* spp.
- *Aeromonas* spp.

**Campylobacter** komt vooral voor bij dieren. Besmetting van uitwerpselen van vogels en dieren met het water is de voornaamste verklaring om deze bacterie te analyseren (Rombouts *et al.*, 1997). **Clostridium perfringens** is een spoorvormend anaëroob organisme dat voornamelijk wordt aangetroffen in feces van zoogdieren, en in aarde. De sporen hiervan overleven in water en natuur en zorgen vaak voor besmetting van groenten en fruit. Uit onderzoek is gebleken dat sporen van *C. perfringens* in grondwater bij 5°C gemiddeld tot 100 dagen kan overleven (Medema *et al.*, 1996). **Helicobacter pylori** heeft specifieke groeiomstandigheden nodig die kunnen gecreëerd worden in stilstaand water. De bacterie is micro-aërofiel en groeit optimaal bij een zuurstofconcentratie tussen de 2-8%. Hoewel *H. pylori* gekend staat als enige bacterie dat in de zure maag met pH 4 van de mens kan overleven zijn de ideale omstandigheden een pH tussen 5,5 en 8,5 (Blecker, 1999). De transmissie verloopt vermoedelijk via fecale-orale en orale-orale route. Gezien er is een epidemiologisch verband is tussen verschillende waterbronnen en infecties door *H. pylori* (Baker *et al.*, 2001) werd deze bacterie opgenomen in deze studie als doelwitorganisme. Water kan hierbij dienst doen als vehikel voor de transmissie van deze bacterie.

Het genus **Mycobacterium** is vooral bekend als verwekker van tuberculose en lepra, maar er zijn ook nuttige soorten aanwezig in de grond, bijvoorbeeld in symbiose met sommige planten. Heel wat studies bevestigen de aanwezigheid van *Mycobacterium* in oppervlaktewater maar ook in leidingwater (Falkinham *et al.*, 2001). Biofilms in drinkwater distributiesystemen lijken rijke bronnen van

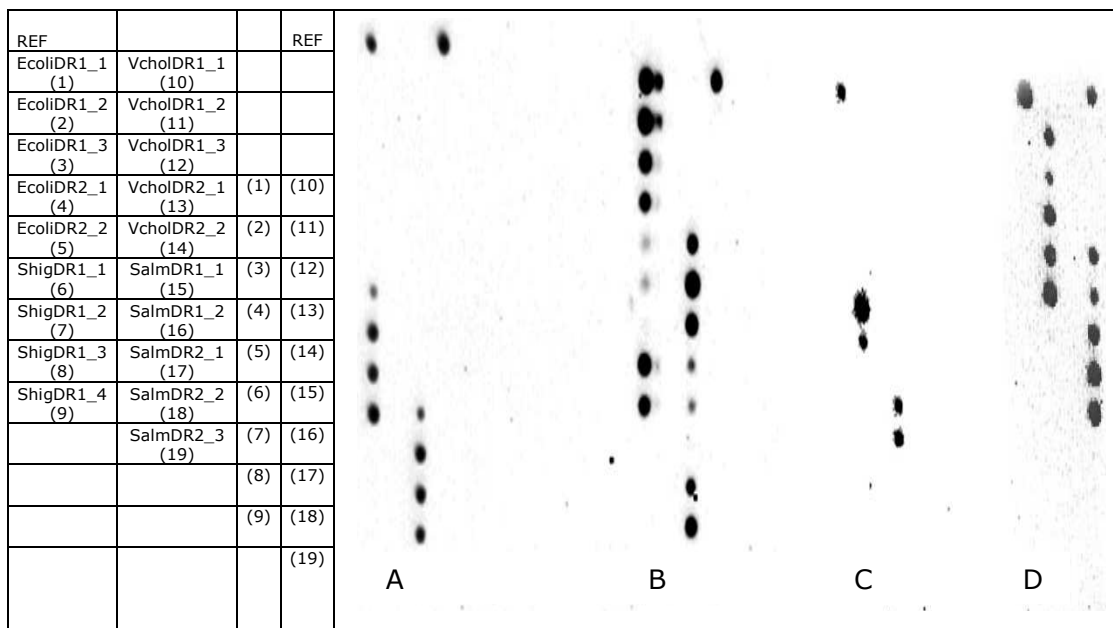
*Mycobacteria* te zijn. Hierbij varieëert het aantal van 0,8 tot 100.000 CFU/L (Taylor *et al.*, 2000). ***Staphylococcus aureus*** produceert onder gunstige omstandigheden enterotoxinen die voedselvergiftigingen veroorzaken. Deze bacterie komt voornamelijk voor op de slijmvliezen in neus en keel van de mens maar kan zich via handen verspreiden op allerlei etenswaren. ***Escherichia coli*** wordt gebruikt als indicatororganisme voor hygiënische productiewijzen in het algemeen en mogelijke fecale besmetting (Dijk *et al.*, 2007) en werd daarom ook meegenomen in deze studie. ***Shigella*** komt vaak voor in oppervlakte water. Deze bacterie komt zelden voor bij dieren en heeft vooral de mens als drager. Het is zeer besmettelijk en kan gemakkelijk van mens op mens overgedragen worden via de ontlasting (Shah *et al.*, 2010). ***Salmonella*** bacteriën zijn onderdeel van de darmflora van dieren. Besmetting voor de mens vinden langs faeco-orale weg plaats. *Salmonella* kan voorkomen in rauwe dierlijke producten, zoals vlees, vis en eieren, en op rauwe groente, kiemgroenten en fruit. ***Listeria spp.*** komt overal in de omgeving voor, zoals in dieren, in water en in de grond. De pathogeen kan zich gemakkelijk verspreiden en gedurende lange tijd in verschillende omgevingen overleven. Deze ziekteverwekker kan vervolgens in vrijwel alle rauwe levensmiddelen teruggevonden worden, meestal wel in lage aantallen. Deze bacteriën kunnen snel binden aan omgevingsoppervlakten. Vervolgens kunnen de organismen zich vermenigvuldigen en zich insluiten in een slijmerige matrix om zo ten slotte een biofilm te vormen (Simões *et al.*, 2010).

***Legionella*** leeft wijdverspreid in water en kan tot in 80% van de zoetwater locaties worden gedetecteerd (Fliermans *et al.*, 1981). Slechts enkele *Legionella* soorten zijn ziekteverwekkers en worden vaak in verband gebracht met legionellose. Van de 53 *Legionella* soorten, is *L. pneumophila* de belangrijkste oorzaak van uitbraken (91,5%) (Duncan *et al.*, 2011). De bacterie groeit in biofilms aan de oppervlakte van meren, rivieren en beken. Lage hoeveelheden kunnen in water uitgroeien tot hoge concentraties als groeibevorderende factoren (ijzeren leidingen, rubberen afdichtingen) aanwezig zijn. Omstandigheden die groei van *Legionella*-bacteriën bevorderen zijn stagnerend of stilstaand water, een watertemperatuur tussen 20° C en 50° C, met een optimale temperatuur van 35°C - 46°C. Wanneer water onder 20°C zakt gaat deze bacterie in een lethargische toestand (= slaaptoestand). *Legionella* wordt ook vaker teruggevonden wanneer er een sediment is dat aanleiding geeft tot vorming van een biofilm (Duncan *et al.*, 2011). De aanwezigheid van micro-organismen, zoals algen, flavobacteriën, amoeben,... bevordert dit. ***Aeromonas*** is een veel voorkomende bacterie in water. In waterleidingen kunnen biofilms gevormd worden die zich vasthechten aan de binnenkant. De dikte en samenstelling van de biofilm hangt af van verschillende factoren zoals de samenstelling van het water, het debiet, de temperatuur, de snelheid en de verblijftijd. De bacteriën in de biofilm kunnen de kwaliteit van het water negatief beïnvloeden (Delahaye *et al.*, 2003). Overschrijdingen van de wettelijke eis van *Aeromonas* in drinkwater (< 1000kve/100ml) treden vaker op in distributiesystemen die worden gevoed met water bereid uit oppervlaktewater dan uit grondwater (van der Kooij *et al.*, 2011).

Na ontwikkeling van de detectoroligonucleotiden werden deze getest op specificiteit en gevoeligheid. Een belangrijk doel voor de validatie van de array is dat kruisreacties met niet-detectororganismen uitgesloten worden, met andere woorden de specificiteit moet aangetoond worden. Het is uiteraard belangrijk dat de detectoroligonucleotiden een signaal geven bij het doelwitorganisme maar geen kruisreactie vertonen bij niet-doelwitorganismen.

### 3.2.2 Bepaling van de specificiteit van detectoroligonucleotiden

Voor wat betreft de specificiteit werd een set van ontwikkelde oligonucleotiden voor detectie van elk organisme op een membraan gespot. In eerste instantie werd nagegaan of de detectoroligonucleotiden een signaal geven met het geamplificeerde targetgen van het doelwitorganisme. In figuur 21 wordt een voorbeeld weergegeven van 4 membranen gehybridiseerd met het *pckA* PCR product van *Shigella*, *E. coli*, *Salmonella* en *V. cholerae*. Het DNA van deze 4 stammen bindt met de oligonucleotiden die hiervoor ontwikkeld zijn. Het DNA van *E. coli* bindt echter ook op de oligonucleotiden ontwikkeld voor *Shigella*. Enkele oligonucleotiden hebben een intenser signaal dan andere. Op deze spots zal het DNA beter binden. In tweede instantie werd nagegaan of de detectoroligonucleotiden ook een (vals positief) signaal geven bij nauw verwante niet-doelwitorganismen. Via Genbank is het mogelijk om bacteriën die mogelijk kruisreactie zouden geven op te zoeken. Deze bacteriën werden vervolgens opgekweekt zodat een DNA-extractie kan worden uitgevoerd. De targetgenen (16S of *pckA* gen) werden vervolgens geamplificeerd en gehybridiseerd op het membranen waarop de detectoroligonucleotiden gespot werden. Er werd een positief hybridisatiesignaal verwacht met target DNA en een negatief signaal voor hybridisatie van DNA van niet doelwitorganismen. De resultaten hiervan worden samengevat in tabellen 14-17.



Figuur 21: DNA-array resultaten voor de specificiteit van de ontwikkelde detectoroligonucleotiden voor *Shigella* (A), *E. coli* (B), *Salmonella* (C) en *V. cholerae* (D). In de tabel wordt aangegeven op welke plaats de verschillende detectoroligonucleotiden gespot werden op het membraan. Elke detectoroligonucleotide is in duplo gespot op het membraan. Identificatie is mogelijk door de locatie van de signalen te bekijken. Staal A is positief voor Shig DR1-1 tot en met Shig DR1\_4. Staal B is positief voor Ecoli DR1\_1, DR1\_2, DR1\_3, DR2\_1, DR2\_2, Shig DR1\_2 en DR1\_3. Bij staal C is er enkel een positief resultaat voor Salm DR1\_1 en DR1\_2. Staal D is positief voor Vchol DR1\_1 tot en met Vchol DR2\_2.

Uit tabel 14 kan afgeleid worden dat er enkele oligonucleotiden zijn die kruisreactie geven met andere bacteriën. Hierbij gaat het om Camp\_DR3\_1 dat kruisreactie geeft met *Sphingomonas pruni*. Camp\_DR2\_2 geeft een kruisreactie met *Staphylococcus equorum* en is dus ook niet bruikbaar. Volgende oligonucleotiden zijn wel geschikt: Camp\_DR1\_1, DR1\_2a, DR1\_2b, DR3\_2 en tenslotte DR3\_3. Bij *C. perfringens* is er kruisreactie van enkele oligonucleotiden met *Clostridium baratii*, *Sphingomonas pruni* en *Campylobacter sp.* Volgende oligonucleotiden zijn geschikt: Cperfr\_DR1\_1, DR2\_1, DR2\_2, DR2\_3, DR3\_1, DR3\_2 en DR3\_3. Ook bij *S. aureus* zijn er enkele kruisreacties. Het gaat om de bacteriën *Zymomonas mobilis*, *Campylobacter sp.*, *S. lugdunensis* en *S. equorum*. Volgende oligonucleotiden werden geschiktbevonden: Saur\_DR1\_1, DR1\_2, DR3\_1 en DR3\_2.

Tabel 14: Samenvatting van de specificiteit van detectoroligonucleotiden voor *Campylobacter*, *C. perfringens* en *S. aureus* oligonucleotiden. Voor elke van de ontwikkelde oligonucleotiden werden de hybridisatiesignalen visueel beoordeeld en werd er een score aan het signaal toegekend. De hybridisatiesignalen werden opgedeeld in 4 klassen: Geen signaal = 0, Zwak signaal = 1, Matig signaal = 2, Sterk signaal = 3, Zeer sterk signaal = 4. De kleurcodes in de tabel staan voor: Groen = verwachte reactie, Rood = kruisreactie, Blauw = signaal mogelijk, afhankelijk van testisolaat en oligonucleotide.

Species	Cam p_DR1_1	Camp_DR1_2a	Camp_DR1_2b	Camp_DR1_3	Camp_DR2_1	Camp_DR2_2	Camp_DR2_3	Camp_DR3_1	Camp_DR3_2	Camp_DR3_3	Cperfr_DR1_1	Cperfr_DR1_2	Cperfr_DR1_3	Cperfr_DR2_1	Cperfr_DR2_2	Cperfr_DR2_3	Cperfr_DR2_4	Cperfr_DR3_1	Cperfr_DR3_2	Cperfr_DR3_3	Saur_DR1_1	Saur_DR1_2	Saur_DR1_3	Saur_DR2_1	Saur_DR2_2	Saur_DR2_3	Saur_DR3_1	Saur_DR3_2	Saur_DR3_3	
<i>Campylobacter coli</i>	3	3	3	2	2	3	3	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Campylobacter jejuni</i>	3	3	3	1	1	3	3	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Campylobacter sp.</i>	3	3	3	1	1	2	1	0	2	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium baratii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium butyricum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	2	3	0	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Clostridium sacharolyticum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sphingomonas pruni</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	3	3	2	1	3	3	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus equorum</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Zymomonas mobilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0

Uit tabel 15 blijkt dat er 3 oligonucleotiden geschikt zijn voor *E. coli*. Het gaat om Ecoli\_DR1\_1, DR1\_2 en DR1\_3. De oligonucleotiden van *Shigella* geven allemaal kruisreactie met *Escherichia fergusonii* en/of *E. coli*. Het oligonucleotide Shigella\_DR1\_1 is wel geschikt. Voor *Vibrio cholerae* zijn de 4 oligonucleotiden bruikbaar. Bij *Salmonella* is er een kruisreactie met *Enterobacter aeromonas*. Er zijn twee oligonucleotiden geschikt: Salm\_DR1\_1 en Salm\_DR1\_2.

Tabel 15: Bepaling van specificiteit van de detectoroligonucleotiden voor detectie van *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* en *Vibrio cholera* oligonucleotiden. Legende zie tabel 14.

Species	Ecoli_pckA_DR1_1	Ecoli_pckA_DR1_2	Ecoli_pckA_DR1_3	Ecoli_pckA_DR2_1	Ecoli_pckA_DR2_2	Shig_pckA_DR1_1	Shig_pckA_DR1_2	Shig_pckA_DR1_3	Shig_pckA_DR1_4	Vchol_pckA_DR1_1	Vchol_pckA_DR1_2	Vchol_pckA_DR1_3	Vchol_pckA_DR2_1	Vchol_pckA_DR2_2	Salm_pckA_DR1_1	Salm_pckA_DR1_2	Salm_pckA_DR2_1	Salm_pckA_DR2_2	Salm_pckA_DR2_3
<i>Aeromonas veronii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Agrobacterium sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cronobacter sakazakii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cronobacter turicensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E coli 0157</i>	2	2	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E coli 25922</i>	2	1	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter aeromonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Erwinia biilingae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia fergusonii</i>	0	0	0	4	4	0	4	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas mendocina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella Parathypi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0
<i>Salmonella Thypimurium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0
<i>Serratia sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	0	0	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vibrio cholerae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	4	4	4	0	0	0	0	0

In tabel 16 worden de resultaten weergegeven van *H. pylori*, *Listeria* en *Legionella*. De oligonucleotiden ontwikkeld voor *H. pylori* geven een kruis-reactie met volgende organismen: *Brochothrix*, *B. cereus* en enkele *Listeria*'s. Volgende oligonucleotiden kunnen wel gebruikt worden: Hpylori\_DR1\_1, DR1\_2, DR1\_3, DR2\_1, DR3\_1. Bij *Legionella* zijn beide oligonucleotiden geschikt om te gebruiken op het finale membraan. Geen enkele van de ontwikkelde detectoroligonucleotiden voor *Listeria* geeft een optimale specificiteit. List\_DR3\_1 en DR3\_4 worden wel verder gebruikt in het finale membraan. Hierbij moet rekening gehouden worden dat er een kruisreactie is met *B. cereus* en *Brochothrix*.

Tabel 16: Bepaling van de specificiteit van de detectoroligonucleotiden voor detectie van *C.m botulium*, *H. pylori*, *Legionella* en *Listeria* oligonucleotiden. Legende zie tabel 14.

Species	CbotDR1_1	CbotDR1_2	CbotDR1_3	CbotDR2_1	CbotDR2_2	CbotDR2_3	CbotDR3_1	CbotDR3_2	CbotDR3_3	HpyloriDR1_1	HpyloriDR1_2	HpyloriDR1_3	HpyloriDR2_1	HpyloriDR2_2	HpyloriDR2_3	HpyloriDR3_1	HpyloriDR3_2	HpyloriDR3_3	Legionella	Legionella	ListDR1_1	ListDR1_2	ListDR1_3	ListDR2_1	ListDR2_2	ListDR3_1	ListDR3_2	ListDR4_1	ListDR4_2	
<i>Acinetobacter sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Bacillus amiloliquifaciens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Brochothrix</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
<i>Clostridium butyricum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium saccharolyticum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Helicobacter acinonychis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Helicobacter equorum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Helicobacter heilmanii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Helicobacter pylori</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	1	0	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Legionella anisa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Listeria innocua</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4	0	4	3	0	3	
<i>Listeria ivanovii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	4	0	3		
<i>Listeria monocytoca</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	0	
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4	0	4	4	0	4		
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Uit tabel 17 blijkt dat voor *Flavobacterium spp.* de oligonucleotiden 'Flavo 4 en DR1' bruikbaar zijn om op het finale membraan te spotten. Voor *Mycobacterium sp* zijn de 4 ontworpen oligonucleotiden geschikt. Bij *Aeromonas spp.* is het mogelijk om Aero 2-4 en Aero 4 op het finale membraan te spotten.

Tabel 17: Bepaling van de specificiteit van de detectoroligonucleotiden voor *Flavobacterium*, *Mycobacterium* en *Aeromonas* oligonucleotiden. Legendie zie tabel 14

Species	Flavo 25	Flavo 29	Flavo 4	Flavo DR1	Flavo DR10	Flavo DR2	Flavo DR9	Myco 1	Myco 2	Myoc 21	Myco 24	Aero 1-4	Aero 2-4	Aero 3-4	Aeros-2	Aeros-3	Aeros-4
<i>Aeromonas veronii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	2	0	0	2
<i>Flavobacterium breve</i>	0	0	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0
<i>Mycobacterium marinum</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	4	3	4	2	2	0	0	0	0

In tabel 18 wordt een overzicht gegeven van alle micro-organismen die via het finale membraan kunnen gedetecteerd worden. Per bacterie is er een overzicht weergegeven van de bruikbare oligonucleotiden. Deze oligonucleotiden zijn specifiek en geven geen kruisreactie met andere stammen.

Tabel 18: Overzicht bruikbare detectoroligonucleotiden

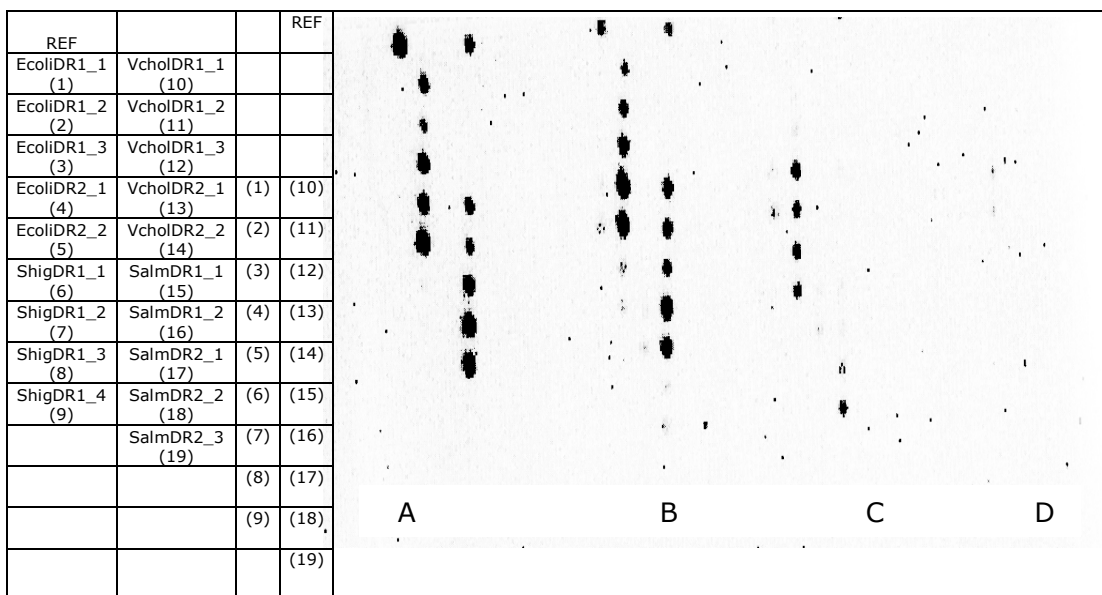
Bacterie	Bruikbare oligonucleotiden
<b><i>Campylobacter</i></b>	Camp_DR1_1, DR1_2a, DR1_2b, DR3_2 en DR3_3.
<b><i>Clostridium perfringens</i></b>	Cperf_DR1_1, DR2_1, DR2_2, DR2_3, DR3_1, DR3_2 en DR3_3
<b><i>S. aureus</i></b>	Saur_DR1_1, DR1_2, DR3_1 en DR3_2
<b><i>Salmonella</i></b>	Salm_DR1_1 en Salm_DR1_2
<b><i>E. coli</i></b>	Ecoli_DR1_1, DR1_2 en DR1_3
<b><i>Shigella</i></b>	Shigella_DR1_1
<b><i>Vibrio cholera</i></b>	Vchol_DR1_1, DR1_2, DR1_3, DR2_1, DR2_2
<b><i>Helicobacter pylori</i></b>	Hpylori_DR1_1, DR1_2, DR1_3, DR2_1, DR3_1
<b><i>Listeria</i></b>	List_DR3_1 en DR3_4* (kruisreactie met <i>B. cereus</i> en <i>Brochotrix</i> )
<b><i>Legionella</i></b>	Legionella 1 en 2
<b><i>Aeromonas</i></b>	Aero 2-4 en Aero 4
<b><i>Flavobacterium</i></b>	Flavo 4 en Flavo DR1
<b><i>Mycobacterium</i></b>	Myco 1, Myco2, Myco 21 en Myco 24

\*Dit doelwitorganisme vertoont een vals positief signaal voor *B. cereus* en *Brochotrix*.



### 3.2.3 Bepaling van de detectielimiet van de detectoroligonucleotiden

Naast de specificiteit van de oligonucleotiden werden ook de gevoeligheid of detectielimiet bepaald. In voorgaande DNA-array werd voor amplificatie van het targetgen telkens een DNA concentratie van 5ng gebruikt. Voor de bepaling van de detectielimiet werden DNA hoeveelheden van 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg, 5fg en 0,5 fg getest voor de doelwitorganismen. Dit DNA werd gebruikt als template voor amplificatie van het 16S rRNA- of *pckA* gen en het PCR product werd dan gebruikt voor de hybridisatie met de DNA-array. In figuur 22 worden de DNA-arrays voor het bepalen van de detectielimiet van *V. cholerae* weergegeven. De detectielimiet wordt bepaald door de laagste DNA concentratie die nog een signaal geeft. Dit kan verschillen per detectoroligonucleotide.



Figuur 22: DNA-array resultaten voor bepaling van de detectielimiet voor *V. cholerae*. DNA van *V. cholerae* werd in de volgende hoeveelheden getest: 5 pg (A) 500fg (B), 50 fg (C) en 5 fg (D). Elke detectoroligonucleotide is in duplo gespot op het membraan. Identificatie is mogelijk door de locatie van de signalen te bekijken. Op membraan A en B zijn de 5 oligonucleotiden Vchol DR1\_1 tot en met Vchol DR2\_2 zichtbaar. Bij membraan C zijn er nog 4 oligonucleotiden zichtbaar. Vchol DR1\_1 is hier niet zichtbaar dus heeft een detectielimiet van 500fg/ $\mu$ L. Op membraan D is geen resultaat te zien. De oligonucleotiden Vchol DR1\_2 tot en met DR2\_2 hebben een detectielimiet van 50fg/ $\mu$ L.

De detectielimiet voor de andere doelwitorganismen werd op een analoge manier bepaald. De resultaten hiervan worden samengevat in tabellen 19-22. Algemeen kan gesteld worden dat de detectielimiet tussen de 50 en 500fg/ $\mu$ L ligt. Enkele detectielimieten liggen wat hoger (5pg) of lager (5fg). Naast de gevoeligheid die wordt nagegaan is dit ook nog eens een extra controle van de specificiteit.

Tabel 19: Overzicht van de detectielimiet van de detectoroligonucleotiden voor de detectie van *Campylobacter* sp., *C. perfringens* en *S. aureus*.

Species	<i>Campylobacter</i> sp.	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Camp_DR1_1	50 fg	0	0
Camp_DR1_2a	500 fg	0	0
Camp_DR1_2b	50 fg	0	0
Camp_DR1_3	500 fg	0	0
Camp_DR2_1	50 fg	0	0
Camp_DR2_2	50fg-5 fg	0	0
Camp_DR2_3	50fg-5 fg	0	0
Camp_DR3_1	50 fg	0	0
Camp_DR3_2	50 fg	0	0
Camp_DR3_3	50 fg	0	0
Cperf_DR1_1	0	50fg-5 fg	0
Cperf_DR1_2	0	50 fg	0
Cperf_DR1_3	0	500 fg	0
Cperf_DR2_1	0	50 fg	0
Cperf_DR2_2	0	50 fg	0
Cperf_DR2_3	0	50 fg	0
Cperf_DR2_4	0	50 pg	0
Cperf_DR3_1	0	50 fg	0
Cperf_DR3_2	0	50 fg	0
Cperf_DR3_3	0	50 fg	0
Saur_DR1_1	0	0	5 pg
Saur_DR1_2	0	0	5 pg
Saur_DR1_3	0	0	5 pg
Saur_DR2_1	0	0	50 fg
Saur_DR2_2	0	0	5 pg
Saur_DR2_3	0	0	50 pg
Saur_DR3_1	0	0	50 fg
Saur_DR3_2	0	0	500 fg
Saur_DR3_3	0	0	50 fg

Tabel 20: Overzicht van de detectielimiet van de detectoroligonucleotiden voor de detectie van *E. coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* en *Salmonella*.

Species	<i>E. coli</i>	<i>Shigella</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>Salmonella</i>
Ecoli_pckA_DR1_1	5 fg	0	0	0
Ecoli_pckA_DR1_2	5 fg	0	0	0
Ecoli_pckA_DR1_3	5 fg	0	0	0
Ecoli_pckA_DR2_1	0	0	0	0
Ecoli_pckA_DR2_2	0	0	0	0
Shig_pckA_DR1_1	0	50fg	0	0
Shig_pckA_DR1_2	0	5 fg	0	0
Shig_pckA_DR1_3	0	5 fg	0	0
Shig_pckA_DR1_4	0	5 fg	0	0
Vchol_pckA_DR1_1	0	0	500 fg	0
Vchol_pckA_DR1_2	0	0	500 fg	0
Vchol_pckA_DR1_3	0	0	500 fg	0
Vchol_pckA_DR2_1	0	0	5 fg	0
Vchol_pckA_DR2_2	0	0	5 fg	0
Salm_pckA_DR1_1	0	0	0	5 fg

Salm_pckA_DR1_2	0	0	0	5 fg
Salm_pckA_DR2_1	0	0	0	0
Salm_pckA_DR2_2	0	0	0	0
Salm_pckA_DR2_3	0	0	0	0

Tabel 21: Overzicht van de detectielimiet van de detectoroligonucleotiden voor de detectie van *Legionella*, *Helicobacter pylori* en *Listeria spp.*

Species	<i>Legionella</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Listeria</i>
Legionella 19	500fg	0	0
Legionella 24	500fg	0	0
Hpylo_DR1_1	0	5pg	0
Hpylo_DR1_2	0	5pg	0
Hpylo_DR1_3	0	5pg	0
Hpylo_DR2_1	0	5pg	0
Hpylo_DR2_2	0	0	0
Hpylo_DR2_3	0	0	0
Hpylo_DR3_1	0	5pg	0
Hpylo_DR3_2	0	0	0
Hpylo_DR3_3	0	5pg	0
List_DR1_1	0	0	0
List_DR1_2	0	0	0
List_DR1_3	0	0	0
List_DR3_1	0	0	500fg
List_DR3_4	0	0	50fg
List_DR4_1	0	0	0
List_DR4_2	0	0	5pg
List_DR5_1	0	0	5pg
List_DR5_5	0	0	0

Tabel 22: Overzicht van de detectielimiet van de detectoroligonucleotiden voor de detectie van *Flavobacterium*, *Aeromonas* en *Mycobacterium*.

Species	<i>Flavobacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Mycobacterium</i>
Flavo 4	50fg	0	0
Flavo DR1	50fg	0	0
Flavo 25	0	0	0
Flavo 29	0	0	0
Flavo 9	0	0	0
Flavo 10	0	0	0
Flavo 2	0	0	0
Aeros 3	0	0	0
Aeros 4	0	50fg	0
Aeros 3-4	0	500fg	0
Aeros 2	0	0	0
Aeros 1-4	0	500fg	0
Aeros 24	0	500fg	0
Myco 1	0	0	500fg
Myco 24	0	0	500fg
Myco 21	0	0	500fg
Myco 2	0	0	500fg

### 3.2.4 Productie van de DNA-array

Van alle bruikbare oligonucleotiden per stam werden twee of drie oligonucleotiden geselecteerd. Deze waarbij de detectielimiet het laagst is en geen kruisreactie geven met niet-doelwitstammen krijgen hier de voorkeur. In tabel 23 wordt weergegeven welke oligonucleotiden er per stam worden gespot op het finale membraan. In figuur 23 wordt het membraan weergegeven. Op het finale membraan werden enkele controles gespot. Dit zijn controles voor het 16S rRNA gen. Wanneer deze oplichten op het membraan wil dit zeggen dat er bacteriën in het water aanwezig zijn met het 16S rRNA gen.

Tabel 23: Selectie van oligonucleotiden voor productie van de DNA-array

Bacterie	Bruikbare oligonucleotiden
<b>Campylobacter</b>	Camp_DR1_1, DR1_2b en DR3_3
<b>Clostridium perfringens</b>	Cperf_DR1_1, DR2_3 en DR3_2
<b>S. aureus</b>	Saur_DR1_1, DR3_1 en DR3_2
<b>Salmonella</b>	Salm_DR1_1 en Salm_DR1_2
<b>E. coli</b>	Ecoli_DR1_1, DR1_2, DR1_3, DR2_2
<b>Shigella</b>	Shigella_DR1_1, DR1_2 en DR1_3
<b>Vibrio cholera</b>	Vchol_DR1_3, DR2_1, DR2_2
<b>Helicobacter pylori</b>	Hpylori_DR1_2, DR1_3, en DR3_1
<b>Listeria</b>	List_DR3_1 en DR3_4
<b>Legionella</b>	Legionella 1 en 2
<b>Aeromonas</b>	Aero 2-4 en Aero 4
<b>Flavobacterium</b>	Flavo 4 en Flavo DR1
<b>Mycobacterium</b>	Myco2 en Myco 21

REF						REF	
CampDR1_1		HpyloriDR1_2	CampDR1_1		HpyloriDR1_2	CbotDR1_1	8F
CampDR1_2b		HpyloriDR1_3	CampDR1_2b		HpyloriDR1_3	CbotDR1_2	1492R
CampDR3_3	EcoliDR1_1	HpyloriDR3_1	CampDR3_3	EcoliDR1_1	HpyloriDR3_1	CbotDR1_3	516F
CperfDR1_1	EcoliDR1_2	Legionella 19	CperfDR1_1	EcoliDR1_2	Legionella 19	CbotDR2_1	341F
CperfDR2_3	EcoliDR1_3	Legionella 24	CperfDR2_3	EcoliDR1_3	Legionella 24	CbotDR2_2	8F
CperfDR3_2	EcoliDR2_2	ListDR2_1	CperfDR3_2	EcoliDR2_2	ListDR2_1	CbotDR2_3	1492R
SaurDR1_1	ShigDR1_1	ListDR3_1	SaurDR1_1	ShigDR1_1	ListDR3_1	CbotDR3_1	516F
SaurDR3_1	ShigDR1_2	ListDR3_2	SaurDR3_1	ShigDR1_2	ListDR3_2	CbotDR3_2	341F
SaurDR3_2	ShigDR1_3	Myco 2	SaurDR3_2	ShigDR1_3	Myco 2	CbotDR3_3	
Flavo 4	VcholDR1_3	Myco 21	Flavo 4	VcholDR1_3	Myco 21		
Flavo DR1	VcholDR2_1	Aero3-4	Flavo DR1	VcholDR2_1	Aero3-4		
	VcholDR2_2	Aero 4		VcholDR2_2	Aero 4		
	SalmDR1_1			SalmDR1_1			
	SalmDR1_2			SalmDR1_2			

Figuur 23: Samenstelling en opbouw van het membraan gebruikt in deze studie van de analyse van de water- en productstalen. Er wordt telkens weergegeven waar de verschillende oligonucleotiden op het membraan gespot worden voor volgende doelwitorganismen: *Campylobacter* sp, *C. perfringens*, *S. aureus*, *Flavobacterium* sp, *E. coli*, *Shigella* sp, *V. cholerae*, *Salmonella* sp, *H. pylori*, *Legionella* sp, *Listeria* sp, *Mycobacterium* sp en *Aeromonas*. Er worden 4 in duplo controles voor het 16S rRNA-gen meegenomen). Als positieve controle op de hybridisatie wordt ook een referentieoplossing gespot op de membranen, bestaande uit een 10 µM digoxigenine gelabelde oligonucleotide oplossing.

### 3.3 In kaart brengen van de microbiologische kwaliteit van het water in de groenten- en fruitsector

Het water gebruikt in de verschillende processen en bedrijven heeft een verschillende oorsprong. Om de termen die gehanteerd werden te verduidelijken, zijn hieronder de definities weergegeven van de verschillende types water.

- **Grondwater:** water afkomstig uit de ondergrond. Vaak wordt dit water opgepompt. Er wordt een onderscheid gemaakt tussen "diep" en "ondiep" grondwater.
- **Open putwater:** dit is water dat opgeslagen wordt in een open aarden put. De oevers zijn soms bekleed met folie maar de onderzijde van de put is steeds onbekleed. Het water in de open put is een mengeling van hemelwater, grondwater en mogelijk een gedeelte oppervlaktewater.
- **Hemelwater:** water afkomstig van regen, sneeuw, hagel, ... Vaak wordt dit water opgeslagen in waterbassins (put met folie bekleed), watersilo's, ondergrondse betonkelders, enz.
- **Leidingwater:** water afkomstig van de drinkwatervoorzieningen en is dus gecontroleerd en voldoet aan de drinkwaternormen.
- **Sorteerwater:** water dat in sorteerkanaalen aangewend wordt voor het sorteerproces van appels en peren.
- **Waswater:** water dat aangewend wordt voor het wassen van vb. prei, asperges, .... De origine van het waswater kan verschillen.
- **Irrigatiewater:** water dat gebruikt wordt om de gewassen te irrigeren (zonder toevoeging van voedingsstoffen) en dat via een bovenberegening tot bij de plant gebracht wordt. De origine van het water kan verschillen.
- **Voedingswater:** bronwater aangerijkt met voedingsstoffen dat langs de wortel van de plant stroomt (gebruikt bij hydroteelt of grondloze teelt). Het bovengrondse gedeelte komt niet in aanraking met dit water.

#### 3.3.1 Microbiologische analyses aan de hand van klassieke uitplatingmethoden

In de 1<sup>ste</sup> fase van het WaterQ project werden enkel representatieve groenten en fruitbedrijven bemonsterd om de microbiologische waterkwaliteit in de Belgische groente- en fruitsector in kaart te brengen. Hierbij werden zowel stalen genomen van het aanvangswater (grondwater, hemelwater, open putwater en leidingwater) als van het proceswater (waswater, sorteerwater, bewaarwater en irrigatiewater). De microbiële analyses via de klassieke uitplatingmethoden van deze stalen werden in een voorgaand onderzoek reeds uitgevoerd. In geen van alle waterstalen van zowel aanvangswater als proceswater, werd *Salmonella* teruggevonden. *L. monocytogenes* werd slechts in 3 gevallen teruggevonden in aanvangswater. *L. monocytogenes* werd wel frequenter gedetecteerd in proceswater, in het bijzonder in waswaters van prei en asperges en sorteerwater van appels en peren. Bij fruit waren 55% van de onderzochte stalen positief voor *E. coli*. De concentraties voor *E. coli* varieerden tussen 1 en 100 CFU/100ml voor het aanvangswater. Het is duidelijk dat het aanvangswater gebruikt voor het sorteren van fruit over het algemeen van zeer goede kwaliteit is. Voor de groentesector werd in 64% van de stalen *E. coli* teruggevonden. In het aanvangswater waren de concentraties aan *E. coli* het hoogst in het open putwater en hemelwater. In het leidingwater werd geen *E. coli* aangetroffen. Voor het proceswater werd een hoge prevalentie gedetecteerd in het waswater voor prei en asperge en de bewaarbakken voor de asperges na de oogst. Volgens de wettelijke normen geldt er voor rauwe voorgesneden kant-en-klare

groenten en fruit een maximale limiet van  $10^3$  CFU/g. Voor sorteerwater bestaat er echter geen norm. Bij de analyse naar *E. coli* werd er echter geen onderscheid gemaakt tussen pathogene *E. coli* (zoals *E. coli* O157:H7) en niet-pathogene *E. coli*. In 61% van de waterstalen van de fruitsector werden coliformen gedetecteerd. Voor de groentesector was 70% van de stalen positief. In het hemelwater en putwater werden in bijna alle stalen coliformen gedetecteerd. Het totaal kiemgetal van het aanvangswater bij fruit lag ongeveer rond de  $10^3$  CFU/ml, bij groenten is dat  $10^5$ - $10^6$  CFU/ml. In de fruitsector is het aanvangswater, meestal grond- en leidingwater, over het algemeen van betere kwaliteit dan in de groentesector. Wel voldoet het water in bijna alle gevallen aan norm verse groenten en fruit.

De microbiologische kwaliteit van de aanvangswaters is het beste in grondwater en leidingwater. Hierbij waren het gehalte aan *E. coli*, coliformen en het totaal kiemgetal het laagst. Bij putwater en hemelwater lag de concentraties aan *E. coli* en coliformen hoger. Ook het totaal kiemgetal was hoger. Wanneer de groente- en fruitsector met elkaar vergeleken worden is er duidelijk een hogere concentratie van *E. coli* en coliformen in het aanvangswater dat gebruikt wordt in de groentesector. Dit kan te wijten zijn aan de hogere frequentie van dierlijke bemesting die gebruikt wordt. Bij het proceswater vertoonden sorteerwater en bewaar- en waswater de slechtste microbiologische kwaliteit. Het gehalte aan *E. coli* en coliformen lag hier hoger. Ook werd *L. monocytogenes* regelmatig teruggevonden. Het irrigatie- en voedingswater waren over het algemeen van betere microbiologische kwaliteit. Via een DNA-array wordt het mogelijk om nog meer data te bekomen per geanalyseerd product- of waterstaal.

### 3.3.2 Microbiologische analyse met behulp van de DNA-array

Na de klassieke uitplatingsmethoden werden de waterstalen ook geanalyseerd met de DNA-array ontwikkeld in deze masterproef. Nadat de geschikte oligonucleotiden voor elke pathogeen op een finale membraan gespot werden, werd de volledige reeks van waterstalen uit fase I van het water Q project getest op de aanwezigheid van voedselpathogenen. Hiertoe werden reeds DNA-extracties uitgevoerd van alle waterstalen die al microbiologisch geanalyseerd werden. De detectie van het panel relevante pathogenen waarvoor de DNA-array ontwikkeld werd, kan een grote hoeveelheid extra informatie opleveren. De gedetailleerde resultaten van de DNA-array voor fase I zijn terug te vinden in bijlage A.

*Campylobacter* werd gedetecteerd in 4 verschillende waterstalen. Hiervan waren 2 stalen afkomstig van putwater, 1 staal was afkomstig van opgevangen regenwater. Tenslotte werd ook bij een grondwaterstaal *Campylobacter* teruggevonden. Bij dit laatste gaat het om een gemengd bedrijf waarbij de grond vooraf werd bemest met dierlijke mest van varkens. Algemeen kan gesteld worden dat water vervuild met faeces de grootste bron van *Campylobacter* is. *C. perfringens* werd terug gevonden in 6 verschillende waterstalen afkomstig van open putwater of grondwater. Bij grondwater en putwater kan er rechtstreeks contact zijn met dieren. Bij de analyse werden 5 stalen gevonden waarbij *Helicobacter pylori* aanwezig was. Het gaat 5 keer om een waterstaal afkomstig van een open put met stilstaand water. Bij deze 5 waterstalen kwam *H. pylori* altijd samen voor met *E. coli* en/of *Campylobacter* of *C. perfringens*. In een artikel van Baker *et al.* (2001) wordt deze associatie ook gemaakt. Hierbij is er een verband vastgesteld tussen *H. pylori* in water en de

aanwezigheid van *E. coli*, een traditioneel indicatororganisme voor fecale verontreinigingen. Daarnaast zijn *Campylobacter* en *C. perfringens* bacteriën die vaak voorkomen in faeces van dieren (Baker *et al.*, 2001).

*Shigella* werd 8 keer gedetecteerd via de DNA-array. Dit micro-organisme is veel voorkomend in het oppervlakte water. De 8 positieve waterstalen voor *Shigella* waren afkomstig van grondwater. *Aeromonas* is ook een veelvoorkomende bacterie in water. In 6 waterstalen was deze bacterie aanwezig. Opmerkelijk is dat in 4 van de 6 gevallen dit werd teruggevonden in leidingwater. In waterleidingen kunnen biofilms gevormd worden die zich vasthechten aan de binnenkant. *Aeromonas* wordt vaak teruggevonden in deze biofilms.

Een bacterie die vaker werd gedetecteerd is *Mycobacterium*. In de 264 onderzochte stalen werden 22 stalen positief bevonden voor *Mycobacterium*. Deze waterstalen waren zowel afkomstig van grondwater, hemelwater als leidingwater.

In 16 waterstalen werd *Legionella* gedetecteerd. In 8 waterstalen ging het om water afkomstig van gietleidingen in serres en in enkele gevallen om grondwater. In groentenbedrijven worden producten vaak besproeid via gietleidingen. Dit zijn leidingen waarin water zich enkele uren kan bevinden. Na een bepaalde tijd zullen via verneveling kleine waterstraaltjes worden vrij gelaten om tuinbouwproducten te besproeien. Wanneer deze leidingen zich vlak onder het glas van een serre bevinden kan de temperatuur makkelijk hoog oplopen. Dit zijn ideale omstandigheden voor *Legionella*-bacteriën.

*V. cholerae* werd niet terug gevonden in de waterstalen.

### **3.4 Opvolging van de microbiologische waterkwaliteit in een selectie van groenten- en fruitbedrijven**

Op basis van de bekomen resultaten uit fase 1 van de microbiologische analyses werden 5 groentenbedrijven geselecteerd om meer in detail op te volgen. Naast waterstalen worden in deze 2<sup>de</sup> fase ook telkens productstalen geanalyseerd om op die manier een directe relatie trachten te leggen tussen de kwaliteit van het proceswater en de contaminanten op het eindproduct. Dit maakt het mogelijk om een algemene inschatting te maken van het risico dat microbiologische contaminanten in het water terechtkomen op groenten en fruit en op die manier een gevaar vormen voor de voedselveiligheid. Water- en productstalen werden geanalyseerd, zowel met de klassieke uitplatingmethode als met de DNA-array die in deze masterproef werd ontwikkeld.

#### **3.4.1 Microbiologische analyses van water- en productstalen**

Voor de groentesector werden 5 bedrijven geselecteerd om verder op te volgen. Het gaat om een rucolabedrijf, een prei/aspergebedrijf, een kiemgroentenbedrijf, een preibedrijf en tenslotte een slabedrijf. In tabel 24 worden de resultaten weergegeven van de microbiologische analyses via klassieke uitplatingen en via de DNA-array.

In het rucolabedrijf (bedrijf A in tabel 24) werden al enkele keren stalen genomen. Dit bedrijf heeft naast zijn eigen teelt ook een wasinstallatie die gebruikt wordt om groenten van andere bedrijven te wassen. In het waswater

dat recirculeerd is zowel in september 2012 als in april 2013 *L. monocytogenes* teruggevonden. Het aanvangswater van dit bedrijf (putwater) bevat geen *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* was wel aanwezig op veldsla. Deze veldsla werd niet geteelt in dit bedrijf, enkel de wasinstallatie werd gebruikt om deze groenten te wassen. Ook op de veldsla die binnen komt in het bedrijf is *L. monocytogenes* aanwezig voor deze in de wasinstallatie gaat. Hieruit kan besloten worden dat de *L. monocytogenes* besmetting afkomstig is uit het bedrijf dat deze veldsla teelt en dus niet uit dit rucolabedrijf. Het aantal bacteriën op de veldsla lag tussen de 20 en 50 CFU/g en ligt dus nog binnen de norm van 100CFU/g. Via de DNA-array werd in het grondwater *Legionella* aangetroffen. In de open put werden coliformen en *E. coli*'s gedetecteerd. Ook *H. pylori* en *C. perfringens* werden hierin opgespoord. Verder kon ook vastgesteld worden dat de waterbehandeling, namelijk ontsmetting met chloor, resulteert in een reductie van *E. coli* en totaal kiemgetal. *H. pylori* en *C. perfringens* waren na ontsmetting van het water afwezig.

Het bedrijf met gemengde teelt van prei en asperges (bedrijf B in tabel 24) is interessant om verder op te volgen omdat het waswater voor beide teelten gerecirculeerd wordt en microbiologische contaminanten mogelijk kunnen accumuleren. Het gaat om een gemengd bedrijf waar de dierlijke mest aangewend wordt voor de bemesting van de percelen. In september 2012 (fase 2) werd een grondstaal genomen. In dit staal werd geen *L. monocytogenes* waargenomen. In april 2013 (fase 2) werden opnieuw staalnames uitgevoerd in het kader van de opvolging van dit bedrijf. Hierbij werd ook geen *L. monocytogenes* terug gevonden. Het aantal *E. coli* en totaal kiemgetal was ook laag. Via de DNA-array werd *Mycobacterium* gedetecteerd in leidingwater. Dit kan afkomstig zijn van een biofilm. Uit de waarde van tabel 24 blijkt dat het water in dit bedrijf een vrij goede microbiologische kwaliteit vertoont.

Omdat kiemgroenten in een vochtige en warme omgeving groeien werd ook een kiemgroenten bedrijf bemonsterd (bedrijf C in tabel 24). Hierbij werd geen *L. monocytogenes* gedetecteerd. Op soja werd wel een totaal kiemgetal van  $1,17 \cdot 10^6$  CFU/g terug gevonden. In de leidingen voor de irrigatie werd *Legionella* en *Mycobacterium* terug gevonden. Ook *E. coli* werd geanalyseerd via de DNA-array. Dit resultaat werd niet bevestigd bij de microbiologische analyses (*E. coli* < 1CFU/100ml). Vermoedelijk gaat het hier om een contaminatie.

Het preibedrijf (bedrijf D in tabel 24) is van aanzienlijke omvang voor preiteelt. Het waswater van de prei wordt hergebruikt. In tegenstelling tot andere preiwasinstallaties met hergebruik van waswater, bestaat het bezinkbekken op dit bedrijf uit slechts 1 compartiment. Het is interessant om dit mee op te volgen omdat het een gemengd bedrijf is waar ook runderen rondlopen. De dierlijke mest wordt uitgereden op de percelen waarop prei geteeld wordt. In het putwater werd in juni 2012 (fase 1) *L. monocytogenes* teruggevonden. Een nieuwe staalname in april 2013 (fase 2) bevestigde de aanwezigheid van *L. monocytogenes* in het putwater. Het putwater dat gebruikt wordt voor de eerste wasstappen bevat *E. coli*, maar blijktbaar is er geen overdracht naar prei (*E. coli* onder detectielimiet). Er werden geen andere organismen teruggevonden via de DNA-array. Ondanks dat dit een gemengd bedrijf waar ook runderen leven werden ook op de prei zelf geen bacteriën gedetecteerd. Algemeen kan gesteld worden dat de waterbehandeling effectief is omdat het aantal bacteriën verminderd.



Het geselecteerde slabedrijf (bedrijf E in tabel 24) is een representatief bedrijf voor grondgebonden slateelt onder glas. Dit bedrijf is interessant omdat in het grondwater, dat als aanvangswater wordt gebruikt, hoge concentraties aan *E. coli* werden teruggevonden. Dit grondwater bevindt zich onder een kippenren waardoor er een hogere kans bestaat op de aanwezigheid van andere pathogenen. Voor het slabedrijf werden reeds 2 extra staalnames uitgevoerd in mei 2012 en in september 2012. De resultaten tussen de verschillende staalnames waren gelijkaardig. Zowel in het grondwater als in het gietwater werd geen *Salmonella* en *L. monocytogenes* gedetecteerd. Na de staalname in mei 2012 bleek het grondwater in de verzamelput, hogere concentraties te hebben voor *E. coli*, totaal kiemgetal en coliformen dan het gemiddelde grondwater. Tussen het onbehandelde (verzamelput grondwater) en het behandelde grondwater (grondwater na ontsmetting) werden significante verschillen vastgesteld voor wat betreft het aantal *E. coli*'s, coliformen (afname van ongeveer 2 log CFU/100ml) en het totaal kiemgetal. In september 2012 werd het staal van het bronwater niet uit de verzamelput genomen maar van de opvoerleiding (net voor het water in de verzamelput terecht komt). De microbiologische analysewaarden van dit staal zijn lager dan een gemiddeld grondwaterstaal. Deze data wijzen erop dat de contaminatie die zich vermoedelijk voordoet in de verzamelput. Doordat het deksel van deze verzamelput niet 100 % afsluit kunnen faeces van de kippen in de put terechtkomen. Op de 4 slastalen die geanalyseerd werden, werden geen pathogenen en geen coliformen gedetecteerd. Het totaal kiemgetal varieerde tussen  $6,7 \cdot 10^5$  en  $6,3 \cdot 10^6$  CFU/g.

Tabel 24: Samenvatting van de resultaten van de klasieke microbiologische analyses en DNA-array voor de water- en productstalen die genomen worden in de 2<sup>de</sup> fase van het WaterQ project. Volgende bacteriën werden opgespoord: *S. aureus* (Sa), *C. perfringens* (Cp), *Campylobacter* (Ca), *E. coli* (Ec), *Salmonella* (Sal), *V. cholerae* (Vc), *Shigella* (Sh), *Helicobacter pylori* (Hp), *Legionella* (Le), *Listeria* (Li), *Mycobacterium* (My), *Aeromonas* (Ae) en totaal kiemgetal (TKG). N.B. werd niet bepaald. De Letters A tot D staan voor de 5 verschillende groentenbedrijven die werden opgevolgd in deze masterproef.

A RUCOLA BEDRIJF Staalname 1	Sal (100ml)	Li (100ml)	Ec CFU/100 ml of CFU/g	TKG CFU/ml of CFU/g	S a	C p	C a	E c	S a l	V c	S h	H p	L e	L i	M y	A e
Wasinstallatie met recirculatie water 1	-	-	1,2.10	1,1.10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Recirculatie vuile bezinkput	-	-	< 1	3,6.10 <sup>2</sup>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Wasinstallatie met recirculatie 2	-	+	3,0	2,3.10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Putwater na ontsmetting chloor	-	-	< 1	9,7.10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beregening in serre	-	-	< 1	2,5.10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Open put	-	-	5,7.10 <sup>2</sup>	1,3.10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

<b>A</b> RUCOLA BEDRIJF Staalname 2	Sal (100ml)	Li (100ml)	Ec CFU/100 ml of CFU/g	TKG CFU/ml of CFU/g	S a	C p	C a	E c	S a l	V c	S h	H p	L e	L i	M y	A e
Wasinstallatie met recirculatie water	N.B	+	8,58 . 10 <sup>0</sup>	2,02 . 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Recirculatie vuile bezinkput	N.B	-	9,40 . 10 <sup>0</sup>	3,83 . 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Putwater na ontsmetting chloor	N.B	-	< 1	1,12 . 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Veldsla voor was installatie	N.B	+	<10	6,02 . 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Veldsla na was installatie	N.B	+	<10	2,29 . 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>B</b> ASPERGE BEDRIJF Staalname 1	Sal (100ml)	Li (100ml)	Ec CFU/100 ml of CFU/g	TKG CFU/ml of CFU/g	S a	C p	C a	E c	S a l	V c	S h	H p	L e	L i	M y	A e
Grondwater na sorteer installatie	-	-	< 1 CFU	2,2.10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
wasinstallatie	-	-	< 1 CFU	2,6.10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grondwater in leiding	-	-	< 1 CFU	1,1.10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Bewaarwater	-	-	< 1 CFU	5,8.10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grondwater	-	-	< 1 CFU	1,0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
grondstaal, ±10 cm diep rond stengel	-	-	9,8.10 <sup>2</sup>	7,2.10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<b>B</b> ASPERGE BEDRIJF Staalname 2	<i>Sal</i> (100ml)	<i>Li</i> (100ml)	<i>Ec</i> CFU/100 ml of CFU/g	TKG CFU/ml of CFU/g	S a	C p	C a	E c	S a l	V c	S h	H p	L e	L i	M y	A e
Wasinstallatie	N.B	-	< 1	1,03 · 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bewaarwater	N.B	-	1,00 · 10 <sup>1</sup>	7,86 · 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grondwater	N.B	-	< 1	1,10 · 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asperges van het veld	N.B	-	<10	4,66 · 10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asperges van 1 dag oud	N.B	-	1,00 · 10 <sup>1</sup>	2,12 · 10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asperges voor wasstap leiding	N.B	-	<10	1,57 · 10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C</b> KIEM GROENTEN BEDRIJF Staalname 1	<i>Sal</i> (100ml)	<i>Li</i> (100ml)	<i>Ec</i> CFU/100 ml of CFU/g	TKG CFU/ml of CFU/g	S a	C p	C a	E c	S a l	V c	S h	H p	L e	L i	M y	A e
Recyclage water in leiding voor besproeiing	-	-	< 1	8,94	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Leidingwater	-	-	< 1	6,05 · 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Water voor ontsmetting	-	-	< 1	1,00 · 10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Water na ontsmetting	-	-	< 1	1,42 · 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sojascheuten	-	-	3,29 · 10 <sup>1</sup>	1,17 · 10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>D</b> PREI BEDRIJF Staalname 1	<i>Sal</i> (100ml)	<i>Li</i> (100ml)	<i>Ec</i> CFU/100 ml of CFU/g	TKG CFU/ml of CFU/g	S a	C p	C a	E c	S a l	V c	S h	H p	L e	L i	M y	A e
Prei van op het veld	N.B	-	<10	4,23 · 10 <sup>7</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prei na wasinstallatie	N.B	-	<10	1,40 · 10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prei na besproeiing	N.B	-	<10	7,95 · 10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Putwater	N.B	+	4,5 · 10 <sup>2</sup>	3,79 · 10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

E SLA BEDRIJF Staalname 1	Sal (100ml)	Li (100ml)	Ec CFU/100 ml of CFU/g	TKG CFU/ml of CFU/g	S a	C p	C a	E c	S a l	V c	S h	H p	L e	L i	M y	A e
Oppervlakte water vijver	-	-	4,6.10	7,9.10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Berekening water na ontsmetting	-	-	< 1	6,1.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
putwater	-	-	< 1	7,0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gietleiding in serre	-	-	< 1	1,1.10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sla 1	-	-	<10	1,1.10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sla 2	-	-	<10	6,7.10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sla 3	-	-	<10	1,9.10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 3.4.2 Vergelijking tussen microbiologische analyses en DNA-array.

De voornaamste pathogenen (*Listeria*, *Salmonella* en *E. coli*) werden zowel microbiologische als moleculair via de DNA-arry onderzocht. Bij de microbiologische analyses werd bij geen enkel staal *Salmonella* gerapporteerd.

*Listeria* werd via de klassieke uitplatingsmethoden in 52 van de 264 staalnamens terug gevonden. Dit is ongeveer in 20% van alle water- en productstalen. Via de DNA-array werden er slechts 35 stalen (13%) positief bevonden voor *Listeria*. Er worden dus meer bacteriën opgepikt wanneer klassieke microbiologische analyses werden uitgevoerd. Dit heeft vermoedelijk te maken met de vooraanrijking van deze pathogeen bij de klassieke uitplatingsmethoden. Op het membraan staan verschillende oligonucleotiden gespot voor *Listeria*. De detectielimiet van deze oligonucleotiden varieert van 500fg tot 5pg.

*E. coli* werd in zeer weinig gevallen gedetecteerd via de DNA-array. Nochtans werd dit zeer vaak opgespoord via de microbiologische analyses. Hierbij wordt het water-of product staal uitgeplaat op Rapid'E.coli 2 Agar. Dit is een selectief en chromogeen media. De detectielimiet bij microbiële analyses ligt rond de 10-20 CFU/ml. Bij de DNA-array ligt deze rond de 50fg dus er wordt verwacht dat wanneer er *E. coli* bacteriën worden gedetecteerd bij de microbiële analyses deze ook opgespoord worden via de DNA-array. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de oligonucleotiden voor *E. coli* ontwikkeld zijn op basis van 4 verschillende pathogene sequenties zoals *E. coli* O157. Deze 4 sequenties geven niet het totale beeld weer van alle verschillende *E. coli* types. Naast de pathogene *E. coli* zijn er ook heel wat niet-pathogene types. Mogelijk vertonen deze 1 of meerdere puntmutaties in het targetgen *pckA* waardoor deze stammen niet gedetecteerd werden via de DNA-array.

### 3.4.3 Overzicht gemengde bedrijven met dieren- en groententeelt

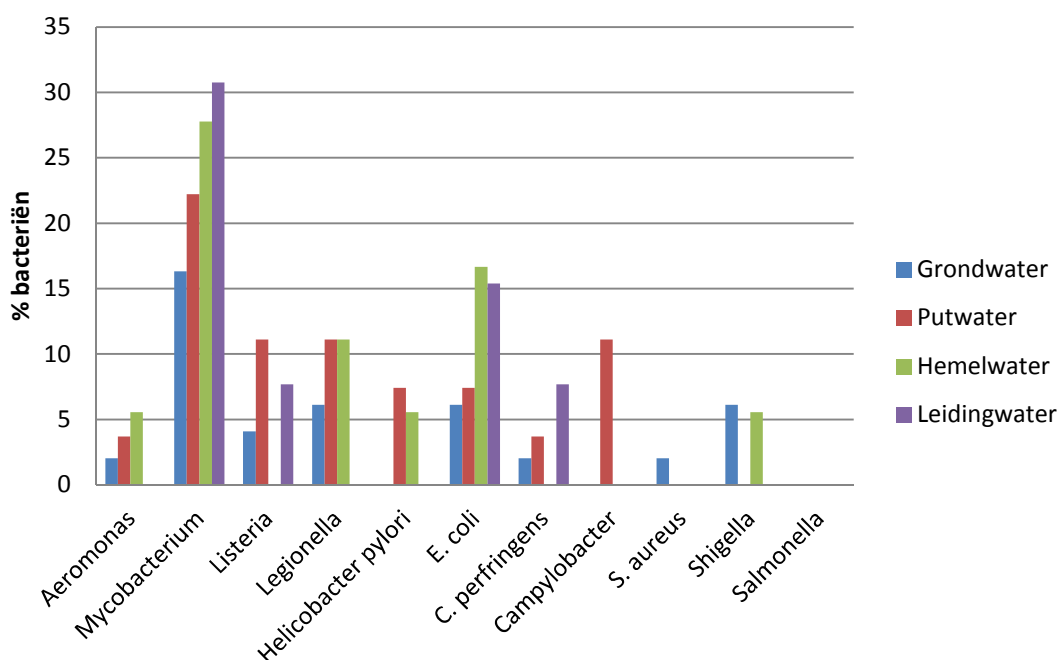
Van alle water- en productstalen die bij de telers zijn genomen waren er 5 gemengde bedrijven. Op de gemengde bedrijven waar runderen zitten, vertoont het water dat gebruikt wordt voor de groententeelt een eerder goede microbiologische kwaliteit. In deze water- en productstalen werden geen pathogenen terug gevonden via de DNA-array. De klassieke microbiologische uitplatingen bevestigen dit met zeer lage aantallen coliformen. Op het gemengde bedrijf waar er naast asperges ook varkens worden gehouden heeft het water een minder goede microbiologische kwaliteit. Hier werden via de DNA-array *C. perfringens*, *Campylobacter*, *Listeria* en *Legionella* gedetecteerd op de waterstalen. Dit resultaat werd bevestigd via de klassieke uitplatingen waarbij het aantal coliformen op verschillende waterstalen  $> 8.10^5$  CFU/100ml. Wanneer fecale colibacteriën in aquatische milieus worden aangetoond, geeft dat aan dat het water is verontreinigd met de uitwerpselen of mest van dieren of mensen.

### 3.4.4 Bacteriën per watertype

In figuur 24 worden de DNA-array resultaten per type aanvangswater (hemel-, put-, grond- en leidingwater) weergegeven. *Mycobacterium* was frequent aanwezig in de 4 verschillende watertypes. In leidingwater loopt dit zelfs op tot iets meer als 30% van de stalen. *Mycobacterium* is een typische bacterie aanwezig in biofilms in leidingen. Naast *Mycobacterium* kwamen er in enkele leidingwater stalen *Listeria* en *C. perfringens* voor. Ook *E. coli* werd hier in ongeveer 15% van de waterstalen terug gevonden. Dit lijkt redelijk veel maar er werd geen onderscheid gemaakt tussen de pathogene en niet-pathogene vorm. In grondwater werden heel wat verschillende bacteriën terug gevonden zoals *Aeromonas*, *C. perfringens*, *E. coli*, en *Legionella* maar steeds in een zeer klein aantal stalen. Enkel *Mycobacterium* werd ook in meerdere waterstalen terug gevonden. Opvallend zijn *Shigella* en *S. aureus* die enkel in grondwater zijn terug gevonden. Bij de waterstalen afkomstig van hemelwater werden hoge percentages *E. coli* gedetecteerd. Ook *Mycobacterium* en *Legionella* zijn hier frequent aanwezig. Dit is een logisch resultaat omdat het water in contact kan komen met dieren. Tenslotte is er nog putwater. Dit water was het meest vervuild. Hierbij was er een hogere prevalentie voor *Legionella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Mycobacterium*, *C. perfringens*, *E. coli* en *H. pylori*.

Algemeen kan gezegd worden dat putwater het meest verontreinigd is. Grondwater en leidingwater zijn van betere kwaliteit. In dat opzicht bevestigen de DNA-array resultaten de resultaten bekomen met klassieke uitplatingstechnieken. Hemelwater kan in contact komen met dieren en kan hierdoor enkele bacteriën bevatten in lagere percentages.

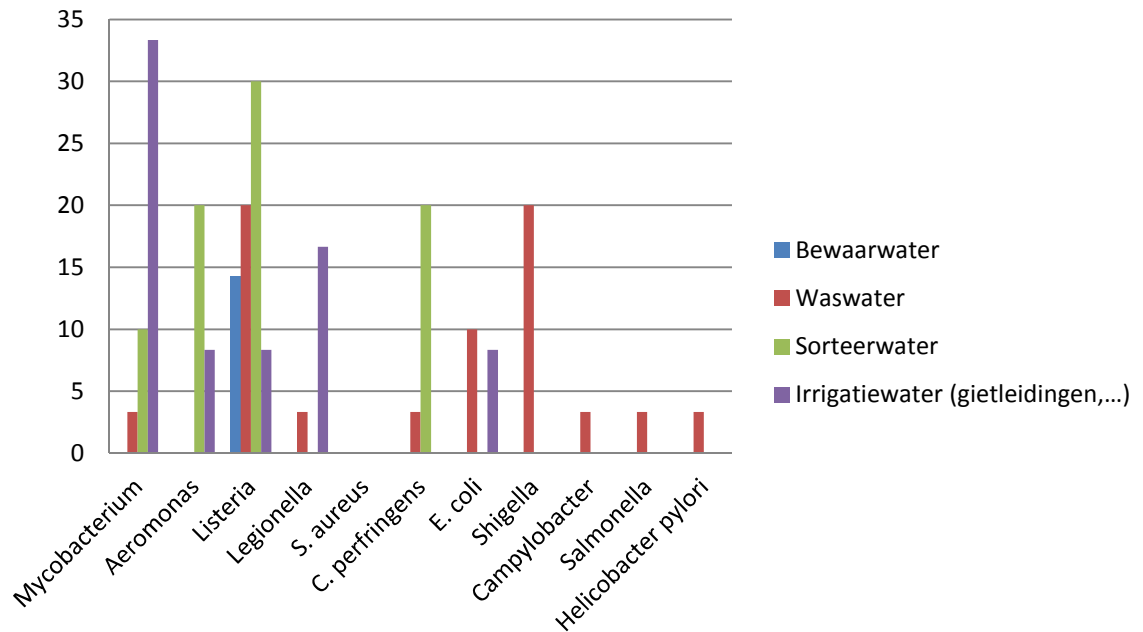
## Aanvangswater in groente- en fruitbedrijven



Figuur 24: Overzicht van het aanvangswater (grondwater, putwater, hemelwater en leidingwater) bij groenten- en fruit bedrijven

Wanneer het water in de diverse processen (sorteren, wassen, irrigeren en bewaarwater) in detail bekeken werd (figuur 25), dan valt op dat er in irrigatie- en sorteerwater in meer stalen *Mycobacterium* aanwezig was. Dit percentage ligt hoger als in het aanvangswater. Er is dus een accumulatie van bacteriën in het sorteerwater. Ook het percentage *Listeria* bij sorteer- en irrigatiewater ligt hoog. *C. perfringens* werd in 20% van de waterstalen bij sorteerwater terug gevonden. Vermoedelijk gaat het hier om een contaminatie op de vrucht die tijdens het sorteren in het water accumuleerde. In irrigatiewater werd ook in een redelijk aantal stalen *Legionella* opgespoord. Het gaat in veel gevallen om *Legionella* dat aanwezig is in de gietleidingen in serre's. *Legionella* komt ook vaak voor in hemelwater maar het percentage in gietleidingen ligt hoger. Gietleidingen vormen een extra risico door de hogere temperaturen en het stilstaand water. Waswater heeft een minder goede microbiologische kwaliteit. Hierin werden hoge prevalentie *S. aureus* en *Mycobacterium* in terug gevonden. *Aeromonas*, *H. pylori* en *Shigella* werden hier terug gevonden in hogere percentages in vergelijking met het aanvangswater. Ook hier kan er besloten worden dat er een overdracht is van het product op het water bij de wasstap. Bewaarwater wordt enkel gebruikt bij de aspergeteelt. In dit bewaarwater werd frequent *Listeria* geanalyseerd.

## Proceswater bij groente- en fruitbedrijven

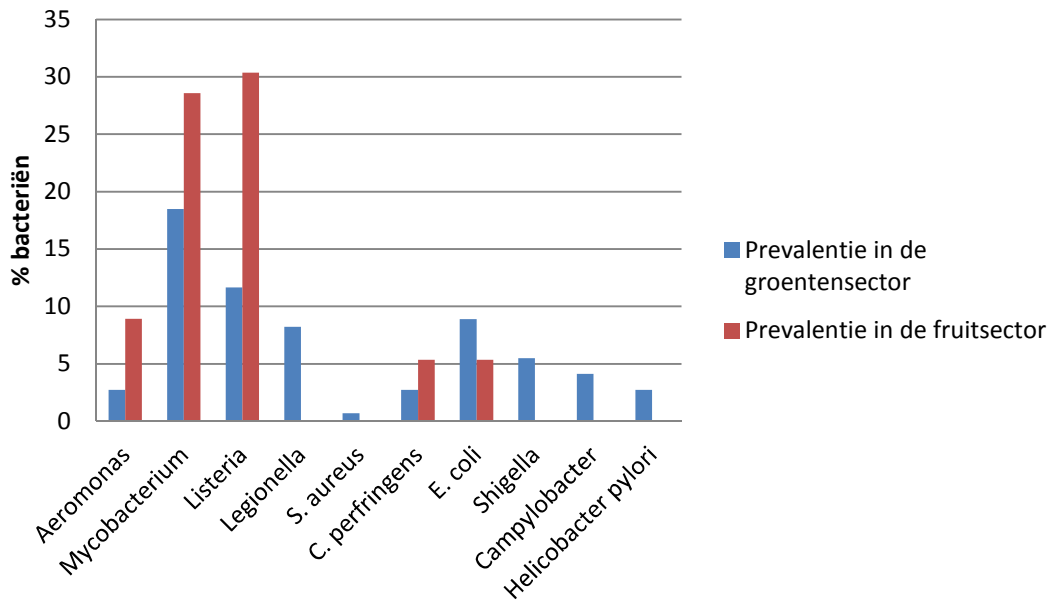


Figuur 25: Overzicht van het proceswater (bewaarwater, waswater, sorteewater en irrigatiewater) bij groenten- en fruitbedrijven

### 3.4.5 Bacteriën in groente- en fruitsector

Wanneer de resultaten van de groente- en fruitbedrijven met elkaar vergeleken worden dan kan besloten worden dat er veel minder verschillende soorten bacteriën worden terug gevonden bij de fruitteelt. Over het algemeen werd hierbij ook enkel water gebruikt afkomstig van grond- of leidingwater wat een betere microbiologische kwaliteit vertoont ivm putwater of hemelwater. In figuur 26 wordt een overzicht gegeven van de prevalentie in groente-en fruit bedrijven. In de fruitsector vallen de hoge aantallen *Listeria* op. Onderzoek wijst uit dat *L. monocytogenes* in de fruitsector voornamelijk voorkomt in het sorteewater. Er is dan ook een verhoogd risico voor contaminatie bij deze processtap. Ook *Mycobacterium* is frequent aanwezig in dit water. In de groentesector zijn deze aantallen lager maar zijn er wel meer soorten bacteriën in het water terug te vinden zoals *Shigella*, *H. pylori*, *E. coli*, *Campylobacter* en *Legionella*. In de groentesector moet vooral aandacht besteed worden aan de wasstap, daar werd vooral *L. monocytogenes* terug gevonden. Deze bevindingen worden zowel door microbiële analyses als via de DNA-array bevestigd.

## Vergelijking tussen groente- en fruitsector



Figuur 26: Vergelijking tussen de groente- en fruitsector

Er kan geconcludeerd worden dat er een accumulatie is van bacteriën in sorteeren waswater. De transfer naar het product zelf is eerder beperkt. Algemeen beschouwd tonen de resultaten van deze masterproef aan dat de microbiologische kwaliteit van het water gebruikt in de groente- en fruitteelt weinig of geen risico inhoudt voor de voedselveiligheid.



## 4 ALGEMEEN BESLUIT

In deze masterproef wordt getracht om voedselpathogenen aanwezig in het proceswater in de groente- en fruitsector te detecteren. Dit werd uitgevoerd met behulp van klassieke uitplatingsmethoden. Daarnaast werd een DNA-array ontwikkeld om een set van 14 relevante micro organismen simultaan te detecteren.

In de groentensector gebruikt men voornamelijk grondwater, regenwater of open putwater voor irrigatie van de gewassen. Voor de laatste wasstap wordt meestal leidingwater en grondwater gebruikt. In de fruitsector wordt water vooral gebruikt voor het transporteren/sorteren van appel en peer. Hiervoor wordt grondwater of leidingwater gebruikt. Bij de microbiële analyses via de klassieke uitplatingsmethode werd in geen van alle waterstalen van zowel aanvangswater als proceswater, *Salmonella* waargenomen. *L. monocytogenes* werd slechts in enkele gevallen teruggevonden in aanvangswater. *L. monocytogenes* werd wel frequenter gedetecteerd in proceswater, in het bijzonder in waswaters van prei en asperges en sorteewater van appels en peren. Naast beide pathogenen werden ook enkele kwantitatieve parameters bepaald (*E. coli*, coliformen en het totaal kiemgetal). Uit de microbiële analyses van het aanvangswater blijkt dat grondwater en leidingwater de beste microbiologische kwaliteit hebben. Zowel het gehalte aan *E. coli*, coliformen en het totaal kiemgetal waren het laagst in vergelijking met open put- en hemelwater. Hoge aantallen werden opnieuw gedetecteerd in wasinstallaties voor prei en asperges en in sorteewater van appels en peren.

Om een nog vollediger beeld te krijgen van de microbiologische waterkwaliteit, werd in deze masterproef ook een DNA-gebaseerde test ontwikkeld om meerdere pathogenen simultaan te detecteren. De DNA-array werd ontwikkeld voor detectie van *Aeromonas spp.*, *Flavobacterium spp.*, *L. monocytogenes*, *Mycobacterium spp.*, *Legionella spp.*, *Campylobacter spp.*, *C. perfringens*, *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori* en *Shigella*. Vervolgens werd zowel de specificiteit als de gevoeligheid van de DNA-array nagegaan. De detectielimiet van de DNA-array lag voor de meeste organismen tussen de 50 en 500fg. De water- en productstalen werden vervolgens geamplificeerd en gehybridiseerd op het finale membraan. De resultaten van de DNA-array bevestigen de resultaten bekomen via de klassieke uitplatingsmethoden. Bij een hoog aantal coliformen werden *E. coli*, *Campylobacter* of *C. perfringens* opgepikt via de DNA-array. Er werden ook enkele stalen teruggevonden waarin *Legionella* werd gedetecteerd. In de meeste gevallen ging het om water afkomstig uit gietleidingen van serre's. *Mycobacterium* en *Aeromonas* werden ook verschillende keren opgespoord in leidingwater. Hierbij is een mogelijke verklaring de aanwezigheid van biofilms in leidingen. Opmerkelijk is ook de hoge prevalentie van *Listeria* in was- en sorteewater. *C. perfringens* werd vaak gedetecteerd in sorteewater. Hierbij kan het gaan om een besmetting op de vrucht die vervolgens accumuleerd in het water. Bij het aanvangswater (grondwater, hemelwater, putwater en leidingwater) is putwater het meest verontreinigd is. Grondwater en leidingwater zijn van betere kwaliteit. Hemelwater kan in contact komen met dieren en kan hierdoor enkele bacteriën bevatten in lagere percentages.

Algemeen beschouwd tonen de resultaten van deze masterproef aan dat de microbiologische kwaliteit van het water gebruikt in de groente- en fruitteelt weinig of geen risico inhoudt voor de voedselveiligheid.



## 5 REFERENTIES

Adak G.K., Long S.M., O'Brien S.J., (2002). "Trends in indigenous foodborne disease and deaths". England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* 51, 832-841.

Adam R.D., (2001). "Biology of *Giardia lamblia*". *Clin. Microbiol. Rev.* July 2001 vol. 14 no. 3 447-475.

Anderson M., Jaykus L., Beaulieu S., Dennis S., (2011). "Pathogen-produce pair attribution risk ranking tool to prioritize fresh produce commodity and pathogen combinations for further evaluation". *Food control*, 22, p 1865-1872.

Anon, (2004). "Outbreaks of *Salmonella* Infections Associated with Eating Roma Tomatoes". *MMWR weekly* 54(13) 325-328.

Anon, (2007a). "The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006". *The EFSA Journal* (2007) 130.

Anon, (2007b). "Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks of *Gallus gallus*". Part A, *The EFSA Journal* (2007) 98, 1-85.

Anon, (2007c). "Turtle-Associated *Salmonellosis* in Human". *CDC, MMWR, Surveillance Summaries* July 6, 2007 / 56(26);649-652.

Arthurson V., Sessitsch A., Jäderlund L., (2010). "Persistence and spread of *Salmonella enterica* serovar *Weltevreden* in soil and on spinach plants". *FEMS Microbiology Letters* Volume 314, Issue 1, pages 67-74, January 2010.

Auty M., Duffy G., O'Beirne D., McGovern A., Gleeson E., Jordan K., (2005). "In situ localization of *Escherichia coli* O157:H7 in food by confocal scanning laser microscopy." *J Food Prot* 68, 482-486.

Bae K., Lee Y.K., Cho Min S., Ma Seong K., Kim S., Kim N.H., Choi K.C., (2006). "A Case of Hemolytic Uremic Syndrome Caused by *Escherichia coli* O104:H", *Yonsei Med J.*

Baker K.H., Hegarty J.P., (2001). "Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water is associated with clinical infection." *Scand J Infect Dis* 33: 744-746, 2001.

Barnes M., Brown M.L., (2011). "A Review of *Flavobacterium psychrophilum* Biology, Clinical Signs, and Bacterial Cold Water Disease Prevention and Treatment". *The Open Fish Science Journal*, 2011, 4, 40-48.

Behravesh CB., Mody RK., Jungk J., Gaul L., Redd JT., Chen S., Cosgrove S., Hedican E., Hoekstra R.M., Angulo F., Swerdlow D.L., Tauxe R., Griffin P., Williams T., (2011). "Outbreak of *Salmonella* Saintpaul Infections Associated with Raw Produce". *N Engl J Med.* 364:918-927.

Belmusto V., (2007). "Norovirus", Communicable Disease Controller Sacramento County.

Berger C.N., Sodha S.V., Shaw R.K., Pink D., Frankel G., (2010). "Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens". *Environmental Microbiology*, 12(9), p 2385-2397.

Berin M., Darfeuille-Michaud A., Laurence E., Miyamoto Y., Kagnoff M., (2002). "Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NFκB and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8," *Cellular Microbiology*.

Beuchat L.R., (2002). "Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables." *Microbes and Infection* 4(4): 413-423.

Blecker U., (1999). "Helicobacter pylori". Dissertation library 1-58112-078-8.

Blumenthal U.J., Mara D.D., et al., (2000). "Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines." *Bulletin of the World Health Organization* 78(9): 1104-1116.

Brandl M.T., Haxo F., Bates A., Mandrell R., (2004). "Comparison of Survival of *Campylobacter jejuni* in the Phyllosphere with That in the Rhizosphere of Spinach and Radish Plants", *Appl Environ Microbiol*.

Braeye T., (2012). "Vlaams Infectieziekte bulletin 2012". [http://www.infectieziektebulletin.be/uploadedFiles/2012-1-79\\_bulletin\\_volledig.pdf](http://www.infectieziektebulletin.be/uploadedFiles/2012-1-79_bulletin_volledig.pdf) (geraadpleegd op 03/09/2012).

Brown T., (2002). "Genomes, 2nd edition". Wiley-Liss: Oxford.

Brown T., (2008). "Gene cloning & DNA analysis". p269-270.

Buck J.W., Walcott R.R., Beuchat L.R., (2003). "Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables". <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2003/safety/> (geraadpleegd op 08/09/2012).

Burnett S.L., Chen J., Beuchat L.R. (2000). "Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy". *Appl Environ Microbiol* 66, 4679-4687.

Busch S., Dalsgaard I., Buchmann K., (2003). "Concomitant exposure of rainbow trout fry to *Gyrodactylus derjavini* and *Flavobacterium psychrophilum*: effects on infection and mortality of host." *Vet Para-sitol* 2003; 117: 117-22.

CDC, Center for Disease Control and Prevention, (2011 b). "Making food safer to eat", Vital Signs, <http://www.cdc.gov/vitalsigns/FoodSafety/index.html>, (geraadpleegd op 03/09/2012).

CDC, Center for Disease Control and Prevention, (2012 a). <http://www.cdc.gov/> (geraadpleegd op 03/09/2012).

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, (1999). "Outbreaks of *Shigella sonnei* Infection Associated with Eating Fresh Parsley". Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). 48(14);285-9.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, (2005). "SHIGELLA SURVEILLANCE: ANNUAL SUMMARY: 2005 (2007)".  
<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/shigtab/2005/ShigellaIntroduction2005.pdf> (geraadpleegd op 01/10/2012).

CDC, Center for Disease Control and Prevention, (2009). "Agricultural water."  
<http://www.cdc.gov/healthywater/other/agricultural/>  
(geraadpleegd op 18/09/2012).

Chen Y., (2012). "*Listeria monocytogenes*". FDA- Bad Bug Book - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Int. Med. Pub. 12-16.

Christison C.A., von Holy A., (2007). "Cleaning and Handling Implements as Potential Reservoirs for Bacterial Contamination of Some Ready-to-Eat Foods in Retail Delicatessen Environments". Journal of Food Protection®, Volume 70, Number 12, December 2007 , pp. 2878-2883(6).

Claeys W., De Voghel S., Schmit J., Vromman V., Pussemier L., (2008). "Exposure assessment of the Belgian population to pesticide residues through fruit and vegetable consumption". Food Additives and Contaminants, TFAC-2007-346.R1.

Creel R., (1912). "Vegetables as a possible factor in the dissemination of typhoid fever". Public Health Report. 27, 187-193.

Crepet A., Albert I., Dervin C., Carlin F., (2007). "Estimation of microbial contamination of food from prevalence and concentration data: Application to *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables". Applied and Environmental Microbiology 73, 250-258.

Danciger M., (1975). "Numbers of *Giardia* in the feces of infected children". The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene; 2: p. 237-42.

Darfeuille-Michaud A., Neut C., Barnich N., Lederman E., Marine P., Gambiez L., Joly B., Cortot A., Colombel J.F., (1998). "Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease". Gastroenterology Volume 115, Issue 6 , Pages 1405-1413, December 1998.

Delahaye E.B., Leblon G., Montiel A., (2003). "An ATP-based method for monitoring the microbiological drinking water quality in a distributoin network". Water Research 37:3689-3696.

Denamur E., (2011). "The 2011 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak: a lesson in genomic plasticity". Clinical Microbiology and Infection, Volume 17, Issue 8, pages 1124-1125, August 2011.

De schrijver K., (2009). "Statusrapport, infectieziekten Vlaanderen in 2009". Infectieziektebestrijding, Antwerpen, Vlaams agentschap zorg en gezondheid.

De schrijver K., Van den Branden D., (2008). "*Een voedelinfectie voor norovirus in Antwerpen*", Infectieziekten Bulletin nr. 63/2008/1, Agentschap voor Zorg en Gezondheid.

De schrijver K., Mak R., Forier A., Top G., (2008). "*Overzicht van de geregistreerde infectieziekten in Vlaanderen*", Bulletin nr. 63/2008/1, Agentschap voor Zorg en Gezondheid.

De Roever C., (1998). "*Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce.*" Food Control 9(6): 321-347.

Dickson J.S., Koohmaraie M. (1989). "*Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces.*" Appl Environ Microbiol 55, 832– 836.

Dijk *et al.*, (2007). "*Microbiologie van Voedingsmiddelen:methodes, principes en Criteria*". Noordervliet Media BV, Houten, Nederland ISBN 978 90 72072 77 1.

Doyle M.P., Erickson M.C., (2007). "*Summer meeting 2007 – the problems with fresh produce: an overview*". Centre for Food Safety, University of Georgia, Griffin, GA, USA, Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072.

Duffell E., Espié E., Nichols T., Adak G.K., De Vlak H., Anderson K., Stuart J.M., (2003). "*Investigation of an outbreak of E. coli O157 infections associated with a trip to France of schoolchildren from Somerset*", England. pp. 81-86.

Duncan C., Prashar A., SO J., Tang P., Low D.E., Terebiznik M., Guyard C., (2011). "*I Lcl of Legionella pneumophila Is an Immunogenic GAG Binding Adhesin That Promotes Interactions with Lung Epithelial Cells and Plays a Crucial Role in Biofilm Formation*". Infection and immunity, June 2011, p. 2168–2181, Vol. 79, No. 6.

Eurogentec (2012). "*Smartladder*".  
<https://secure.eurogentec.com/product/research-smartladder.html?country=bel>  
(geraadpleegd op 06/09/2012).

European Commision. (2010) "*Rapid alert system for food and feed (RASFF) – RASFF Portal - online searchable database*".  
[http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/rasff\\_portal\\_database\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/rasff_portal_database_en.htm)  
(geraadpleegd op 23/10/2012).

EFSA, European Food Safety Authority (2010). "*The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in the European Union in 2008.*" EFSA Journal 2010 8(1): 1496 [410 pp.].  
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1496.htm> (geraadpleegd op 29/09/2012).

EFSA, European Food Safety Authority (2009). "*Food-borne outbreaks in the European Union in 2007*", EFSA journal 2009.

EFSA, European Food Safety Authority (2012). "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010", EFSA journal 2012;10(3):2597.

Ells T.C., Hansen L.T., (2006). "Strain and growth temperature influence *Listeria spp.* attachment to intact and cut cabbage". Int J Food Microbiol 111, 34-42.

Environmental Protection Agency (EPA 1973). "Water quality criteria." Ecological Research Series. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA R3-73-033.

Environmental Protection Agency (US)/Agency for International Development (US) (EPA (1992)). "Guidelines for water reuse." Washington, DC, Environmental Protection Agency, Office of Wastewater Enforcement and Compliance, 1992 (technical report no. EPA/625/R-92/004).

Evmi, Management in de voedingsindustrie, "voedselveiligheid- kwaliteit", <http://evmi.nl/voedselveiligheid-kwaliteit/weer-minder-meldingen-voedselinfecties/>, (geraadpleegd op 04/09/2012).

Evmi, Management in de voedingsindustrie, "voedselveiligheid- belgisch melkpoeder", <http://evmi.nl/voedselveiligheid-kwaliteit/belgisch-melkpoeder-besmet-kinderen-rusland/>, (geraadpleegd op 04/09/2012)

Falkenhorst G., et al., (2005). "Imported frozen raspberries cause a series of norovirus outbreaks in Denmark, 2005." Eurosurveillance, Volume 10, Issue 38, 22 September 2005.

Falkinham J.O., Norton C.D., LeChevallier M., (2001). "Factors Influencing Numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and Other *Mycobacteria* in Drinking Water Distribution Systems". Appl Environ Microbiol. 2001 March; 67(3): 1225-1231.

Farber J., Peterkin P., (1991). "*Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen." Microbiological Reviews , 55 (3), 476-511.

FAO/WHO (2008). "Herbs: Meeting Report", Microbiological Risk Assessment Series, 14, 1-115.

FAO/WHO (2008). "Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables." Microbiological risk assessment series, Meeting report, 1-28.

FASFC, Federal Agency for the Safety of the Food Chain (2008 - 2009). "Trends and sources: report on zoonotic agents in Belgium, 2008-2009". [http://www.favv.be/publicationsthematiques/\\_documents/2008-2009\\_Report-on-zoonoticagents\\_en.pdf](http://www.favv.be/publicationsthematiques/_documents/2008-2009_Report-on-zoonoticagents_en.pdf) (geraadpleegd op 22/09/2012).

FAVV, Federaal agentschap voor voedselveiligheid, (2011). "West-Nile koorts".

FAVV, Federaal agentschap voor voedselveiligheid, (2011). "Feiten en cijfers van 2011".

FDA (1998). Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables

Finale Disposal Methods, "Subsurface drip irrigation"  
[www.limnoterragroup.com/sfi/drain.html](http://www.limnoterragroup.com/sfi/drain.html), (geraadpleegd op 19/09/2012)

Flanders food, Duquenne B., (2010). "Salmonella bestrijding in de varkensproductie",  
<http://www.flandersfood.com/artikel/2010/02/25/salmonella-bestrijding-de-varkensproductie>, (geraadpleegd op 06/09/2012).

Fliermans C.B., Cherry W.B., Orrison L.H., Smith J.S., Tison D.L., Pope D.H., (1981). "Ecological distribution of *Legionella pneumophila*." Appl. Environ. Microbiol.41:9-1.

Food-Info. (2009). "*Listeria monocytogenes*". <http://www.food-info.net/nl/bact/limon.htm>, (geraadpleegd op 06/11/2012)

Forier A., Dehollogne C., Maes I. en Meertens,. (2011). "Een voedselgebonden outbreak van hepatitis A in Limburg", Infectieziekten bulletin nr. 2011/3/77, Agentschap Zorg en Gezondheid, 8-11.

Fraisse A., Temmam S., Deboosere N., Guillier L., Delobel A., Maris P., Vialette M., Morin T., Perelle S., (2011). "Comparison of chlorine and peroxyacetic-based disinfectant to inactivate Feline calicivirus, Murine norovirus and Hepatitis A virus on lettuce". International Journal of Food Microbiology 151 (2011) 98-104.

Fratamico P.M., Schultz F.J., Benedict R.C., Buchanan R.L., Cooke, P.H. (1996). "Factors influencing attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to beef tissues and removal using selected sanitizing rinses." J Food Prot 59, 453-459.

Geldreich EE., (1990). "Microbiologische kwaliteit van de bron water voor de drinkwatervoorziening". pp 3 tot 31 in GA McFeters (red.) Drinkwater Microbiologie: Vooruitgang en recente ontwikkelingen. Springer-Verlag, New York.

Gillespie IA., (2004). "Outbreak of *Salmonella* Newport infection associated with lettuce in the UK". Euro Surveill. 8(41):pii=2562.

GLOBALG.A.P., (2007). "Belgian Interpretation Guideline, Integrated Farm Assurance, Control Points and Compliance Criteria", MODULES: ALL FARM | CROPS BASE | FRUIT AND VEGETABLES."

Goss M.J., Unc A. (2004). "Transport of bacteria from manure and protection of water resources". Applied Soil Ecology, Volume 25, Issue 1, January 2004, Pages 1-18.

Greene G.R., Thomas T.R., (1993). "Rainwater Quality from Different Roof Catchments". Water Science & Technology, vol 28 nr 3-5, p 291-299.

Griffiths A.J.F., Gelbart G., Miller L., Lewontin S., (2008). "Modern Genetic introduction to genetic analysis". Freeman & Co. New York.

Guzman-Herrador B., Vold L., Comelli H., MacDonald E., Heier B., Stavnes E., Jensvoll L., Aanstad L., Severinsen G., Grini JA., Johansen W., Cudjoe K., Nygard K., (2011). "Outbreak of *Shigella sonnei* infection in Norway linked to consumption of fresh basil". Eurosurveillance. 16.



Hammack T., (2012). "*Salmonella species*". FDA- Bad Bug Book - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. p12-16. International Medical Publishing.

Hassan A.N., Frank J.F., (2003). "*Influence of surfactant hydrophobicity on the detachment of Escherichia coli O157:H7 from lettuce.*" Int J Food Microbiol 87,145-152.

HPA, Health protection agency, "*Update on Legionnaires cluster associated with a hotel in Spain*",  
<http://www.hpa.org.uk/NewsCentre/NationalPressReleases/2012PressReleases/120210LegionnairesinSpainupdate/> (geraadpleegd op 05/09/2012).

Heaton J.C. and Jones K., (2007). "*Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review*", Journal of Applied Microbiology.

Hiller E.J., Zhang Y., Peng B.I., (2008). "*Weather and the transmission of bacillary dysentery in Jinan, Northern China, A time-series analysis*". Public Health Reports. 2008 Jan-Feb; 123(1): 61-66.

Huffman D. E., Nelson K.L., et al. (2003). "*Calicivirus - An emerging contaminant in water: State of the art.*" Environmental Engineering Science 20(5): 503-515.

Hutchison M.L., Avery S.M., Monaghan J.M., (2008). "*The air-borne distribution of zoonotic agents from livestock waste spreading and microbiological risk to fresh produce from contaminated irrigation sources*". Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-S072.

Imik, Instituut voor microbiële ketenbeheersing. (2006). Europese hygiëne richtlijnen en microbiologische criteria.  
([www.imik.org/wettelijke\\_context/Europese\\_hygienerichtlijn\\_en\\_microbiologisch\\_e\\_criteria.pdf](http://www.imik.org/wettelijke_context/Europese_hygienerichtlijn_en_microbiologisch_e_criteria.pdf), geraadpleegd op 19-10-2012).

Invitrogen. *UltraPure Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol (25:24:1;v/v)*.  
<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/15593031> (geraadpleegd op 30/09/2012).

Isaaa, International service for the acquisition of agro-biotech applications (2008). "*Plant disease diagnostics*".  
<http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/22/default.asp> (geraadpleegd op 15/09/2012).

Isaacs S., Aramini J., Ciebin B., Farrar J.A., Ahmed R., Middleton D., (2005). "*An International Outbreak of Salmonellosis Associated with Raw Almonds Contaminated with a Rare Phage Type of Salmonella Enteritidis*". Journal of Food Protection®, Volume 68, Number 1, January 2005 , pp. 191-198(8)

Isonormen, International Organisation for standardisation. "Water quality -- Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria". [www.iso.org/iso/home/store/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=20878](http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=20878), geraadpleegd op 05/11/2012.

Jalava K., Hakkinen M., Valkonen M., Nakari U.M., Palo T., Hallanvuori S., Ollgren J., Siitonen A., Nuorti J.P., (2006). "An outbreak of gastrointestinal illness and erythema nodosum from grated carrots contaminated with *Yersinia pseudotuberculosis*". *Journal of Infectious Diseases* 194, 1209-1216.

Jong B., Öberg J., Svenungsson B., (2007). "Outbreak of salmonellosis in a restaurant in Stockholm, Sweden". *Euro Surveillance* 2007;12(11).

Koopmans, M. and E. Duizer (2004). "Foodborne viruses: an emerging problem." *International Journal of Food Microbiology* 90(1): 23-41.

Kotloff K.L., Winickoff J.B., Ivanoff B., Clemens J., Swerdlow D.L., Sansonetti P.J., Adak G., Levine M., (1999). "Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies". *Bulletin of the World Health Organization*, 1999, 77 (8) pag 651-666.

Lampel K.A., (2012). "Shigella species". FDA- Bad Bug Book - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. P12-16. International Medical Publishing.

Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G., (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0". *Bioinformatics*, 23, p2947-2948.

Lenntech, Water treatment solutions (2010). "Noodzaak desinfectie van (drink)water". [www.lenntech.nl/processen/desinfectie/noodzakelijkheid/noodzaak-desinfectie-water.htm](http://www.lenntech.nl/processen/desinfectie/noodzakelijkheid/noodzaak-desinfectie-water.htm) (geraadpleegd op 20-09-2012).

Lievens B., Thomma BPHJ., (2005). "Recent developments in pathogen detection arrays: implications for fungal plant pathogens and use in practice". *Phytopathology*. 95; 1374-1380.

Lievens B., Brouwer M., Vanachter ACRC., Cammue BPA., Thomma BPHJ., (2003). "Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomato vascular wilt pathogens". *FEMS Microbiol. Lett.* 223: 113-122.

Lungu B., Ricke S. C., Johnson M. G., (2009). "Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions", *Anaerobe*, 2009, Vol. 15, pp. 7-17.

Lynch M.F., Tauxe R.V., Hedberg C.W., (2009). "The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risk and opportunities". *Epidemiology & Infection*, 137, p. 307-315.

- Madsen E.L., Ghiorse W.C., (1993). "Grondwater microbiologie: ondergrondse ecosysteem processen". Aquatische Microbiologie. Blackwell Scientific Publications, Boston. pp 167 tot 214.
- Madsen M., Thanh bui X., Wolff A., Bang D., (2012). "Interaction between Food-borne Pathogens (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes*) and a Common Soil Flagellate (*Cercomonas sp.*)." Journal of Food Research Vol. 1, No. 2; May 2012.
- Mak R., Broucke C., (2010). "Een uitbraak van Norovirus gastro-enteritis na een barbecue". Infectieziekten bulletin nr. 67/2009/1, Agentschap Zorg en Gezondheid, 3-5.
- Medema G.J., Bahar M., Schets F.M., (1996). "Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, faecal enterococci and *Clostridium perfringens* in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms". Water Science and Technology, Volume 35, Issues 11-12, 1997, Pages 249-252.
- Menzies J.G., Ehret D.L., Stan S., (2009). "Effect of inoculum density of *Pythium aphanidermatum* on the growth and yield of cucumber plants grown in recirculating nutrient film culture". Canadian Journal of Plant Pathology, Volume 18, Issue 1, 2009.
- Mermin J.H., Griffin P.M., (1999). "Invited Commentary: Public Health in Crisis: Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 Infections in Japan". Am. J. Epi. 150.
- Monaghan J.M., (2006). "United Kingdom and European approach to fresh produce food safety and security". Horttechnology 16, 559-562.
- Monaghan J.M., Hutchison M.L., (2012). "Distribution and decline of human pathogenic bacteria in soil after application in irrigation water and the potential for soil-splash-mediated dispersal onto fresh produce". Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072.
- Moriarty EM., Weaver L., Sinton LW., Gilpin B., (2012). "Survival of *Escherichia coli*, Enterococci and *Campylobacter jejuni* in Canada Goose Faeces on Pasture". Zoonoses Public Health. 2012 Sep 11. doi: 10.1111/zph.12014.
- National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIAID), (2012). "Norovirus Infection", <http://www.niaid.nih.gov/topics/norovirus/Pages/Default.aspx>, ( geraadpleegd op 21/09/2012).
- Norris R.D., (1994). "Handbook of bioremediatie". US EPA Robert S. Kerr Environmental Research Laboratory. Lewis Publishers, Ann Arbor.
- Oron G., (2002). "Effluent reuse in agricultural production." In Modern and traditional irrigation technologies in the eastern Mediterranean, chap. 9. International Development Research Centre. <http://www.idrc.ca/openebooks/304-6/> ( geraadpleegd op 26/09/2012).

Parashar U., Hummelman E., Bresee J., Glass I., (2003). "Global Illness and Deaths Caused by Rotavirus Disease in Children". *Emerg Infect Dis.* 2003 May; 9(5): 565–572. doi: 10.3201/eid0905.020562.

Pedley S., Yates M., Schijven F.J., West J., Howard G., Barrett M., (2006) "Pathogens: health relevance, transport and attenuation", p49-80. <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd59/protecting/sect1-3.pdf> (geraadpleegd op 09/09/2012).

Peeters L., Hanssen I., Luyten L., Willems K., (2005). "Microbiële veiligheid van groenten en fruit:bedreiging of opportuniteit", *Proeftuinnieuws*,15, 7, 20-22.

Ponka A., Maunula L., (1999). "An outbreak of calicivirus associated with consumption of frozen raspberries." *Epidemiology and Infection* 123(3): 469-474.

Rediers *et al.*, (2013). "Voortgangsverslag:Samenvatting van de resultaten voor het beleidscomité, FOD-RT Project: WaterQ".

Reller M.E., Nelson J.M., Mølbak K., Ackman D.K., Schoonmaker-Bopp D.J., Root T.P., Mintz E.D., (2006). "A Large, Multiple-Restaurant Outbreak of Infection with *Shigella flexneri* Serotype 2a Traced to Tomatoes". *Clin Infect Dis.* 42 (2): 163-169.

Ries A.A., (1994). "Epidemic *Shigella dysenteriae* type 1 in Burundi:pan-resistance and implications for prevention". *Journal of infectious diseases*, 1994, 169: 1035±1041.

Rivm, Rijksinstituut voor Volksgezondheis en milieu, "Infectieziekten Bulletin", [http://www.rivm.nl/Bibliotheek/Algemeen\\_Actueel/Uitgaven/Infectieziekten\\_Bulletin/Jaargang\\_23/Juli\\_2012/Inhoud\\_juli\\_2012/Gesignaleerd\\_tot\\_en\\_met\\_14\\_juni\\_2012?searchbase=64650&pagenr=6466&sp=cml2bXE9ZmFsc2U7c2VhcmNoYmFzZT02Mjg0MDtyaXZtcT1mYWxzZTs=&](http://www.rivm.nl/Bibliotheek/Algemeen_Actueel/Uitgaven/Infectieziekten_Bulletin/Jaargang_23/Juli_2012/Inhoud_juli_2012/Gesignaleerd_tot_en_met_14_juni_2012?searchbase=64650&pagenr=6466&sp=cml2bXE9ZmFsc2U7c2VhcmNoYmFzZT02Mjg0MDtyaXZtcT1mYWxzZTs=&), (geraadpleegd op 04/09/2012).

Rombouts F.M., Koenraad P.M., Notermans S.H., (1997). "Epidemiological aspects of thermophilic *Campylobacter* in water-related environments: A review". *Water Environment Research*, Volume 69, Number 1, January/February 1997 , pp. 52-63(12).

Schets F.A., Van Wijnen J.H., *et al.* (2008). "Monitoring of waterborne pathogens in surface waters in Amsterdam, The Netherlands, and the potential health risk associated with exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in these waters." *Applied and Environmental Microbiology* 74(7): 2069-2078.

Schuit F.C., (2008). "Medische biochemie moleculaire benadering van de geneeskunde". Bohn Stafleu van Loghum. Hoofdstuk 8. 234-245.

Semenov A.V., Overbeek L., Van Brugen A.H.C., (2009). "Percolation and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurion in soil amended with contaminated dairy manure or slurry". *Applied and environmental microbiology*, May 2009, p 3206-3215.

Seymour I. J., Appleton H., (2001). "Foodborne viruses and fresh produce." *Journal of Applied Microbiology* 91(5): 759-773.

Shah S., Azmuda N., Ziaur Rahman M., Akhter H., Begum A., (2010). "Survival potentiality of shigella boydii 15 atcc12034 in laboratory microcosm using water from two sources". Dhaka University Journal of Biological Sciences > Vol 19, No 2 (2010).

Simões M., Simões L., Vieira M. (2010). "A review of current and emergent biofilm control strategies". Food Science and Technology , 43, 573-583.

Sivapalasingam S., Friedman C.R., Cohen L., Tauxe R.V., (2004). " Fresh produce: A growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997". Journal of Food Protection 67, 2342-2353.

Söderström A., Österberg P., Lindqvist A., Jönsson B., Lindberg A., Blide Ulander S., Welinder-Olsson C., Löfdahl S., Kaijser B., De Jong B., Kühlmann-Berenzon S., Boqvist S., Eriksson E., Szanto E., Andersson S., Allestam G., Hedenström I., Ledet Muller L. and Andersson Y., (2008). "A Large Escherichia coli O157 Outbreak in Sweden, Associated with Locally Produced Lettuce". Foodborn pathogens and diseases.

Solomon E.B., Yaron S., Matthews K.R., (2002). "Transmission of E. coli O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization." Applied environmental microbiology, 68(1), p376-400.

Steele M. and J. Odumeru (2004). "Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables." Journal of Food Protection 67(12): 2839-2849.

Stine S.W., Song I.H., et al. (2005). "Application of microbial risk assessment to the development of standards for enteric pathogens in water used to irrigate fresh produce." Journal of Food Protection 68(5): 913-918.

Takeuchi K., Frank J.F., (2000). "Penetration of Escherichia coli O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability". J Food Prot 63, 434-440.

Takeuchi K., Matute C.M., Hassan A.N., Frank J.F. (2000). "Comparison of the attachment of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes, Salmonella Typhimurium, and Pseudomonas fluorescens to lettuce leaves." J Food Prot 63, 1433-1437.

Tauxe R., Kruse H., (1997). "Microbial hazards and emerging issues associated with produce - A preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiologic Criteria for Foods." Journal of Food Protection 60(11): 1400-1408.

Taylor R.H., Falkinham J.O., Norton C.D., LeChevallier M., (2000). "Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of Mycobacterium avium". Appl Environ Microbiol. 2000;66:1702-1705.

Tortora J.G., Funke B.R., Case C.J., (2007) "Microbiology: an introduction". Pearson education, San Francisco ISBN 0 321 39602 2.

- Ukuku D.O., Fett W.F. (2002). "Relationship of cell surface charge and hydrophobicity to strength of attachment of bacteria to cantaloupe". *J Food Prot* 65, 1093–1099.
- Van Bruggen A., Ganyu G., Jiahuai H., Cevallos-Cevallos J., Richardson S., Bartz J., (2011). "Internal Colonization of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Tomato Plants". *PLoS ONE*: November 2011, Volume 6, Issue 11, e27340.
- Van der Kooij D., van der Wielen P., (2011). "Inventaris van *Aeromonas* en koloniegetal 22°C in drinkwater en relaties met fysische/chemische parameters". BTO 2011.001, Jan 2011 p60-67.
- Van Kreijl CF., Knaap A., Kramers PGN., Kromhout D., (2004). "Ons eten gemeten. Gezonde voeding en veilig voedsel in Nederland". RIVM-rapport nr. 270555007. Houten: Bohn Stafleu Van Loghum, 2004.
- Van meervenne E., Botteldoorn N., Mak R., Lokietek S., Dierick K., De Schrijver K., Bertrand S., (2005). "Salmonella-infecties verkregen door exotische dieren in België". Bulletin nr. 54/2005/5, Agentschap voor Zorg en Gezondheid.
- Verhaegen J., Vandeven J., Pyckavet M., (2010). "Medische microbiologie voor laboratoriumtechnologen". Acco, Leuven ISBN 978 90 334 7588 7.
- VIBHA VIJ V., (2006). "Recalls of Spices Due to Bacterial Contamination Monitored by the U.S. Food and Drug Administration: The Predominance of *Salmonellae*". *Journal of Food Protection* 69 (1) 233 – 237.
- VILT, Vlaamse tuinbouw toonaangevend in teeltautomatisering, Mobiel gootsysteem  
[http://www.vilt.be/nl\\_BE/search?q=mobiel+gootsysteem](http://www.vilt.be/nl_BE/search?q=mobiel+gootsysteem), (geraadpleegd op 09-01-2013).
- von Reyn C.F., Waddell R.D., Eaton T., Arbeit R.D., Maslow J.N., Barber T.W., Brindle R.J., Gilks C.F., Lumio J., Lähdevirta J., Ranki A., Dawson D., Falkinham J O., (1993). "Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya". *J Clin Microbiol.* 1993;31:3227–3230.
- VWA, Nederlands voedsel en warenautoriteit, *vibrio-parahaemolyticus*,  
<http://www.vwa.nl/onderwerpen/gevaren/dossier/vibrio-parahaemolyticus/waarzit-vibrio-parahaemolyticus-in>, (geraadpleegd op 04/09/2012).
- VWA, Nederlands voedsel en warenautoriteit, Microbiologisch onderzoek van levensmiddelen 2008-2009.
- Wetenschappelijk comité van het federaal agentschap voor de veiligheid van de voedselketen (WC-FAVV 2009). "Kwaliteit van irrigatiewater in de primaire plantaardige productie en voedselveiligheid." Advies 28-2009.
- Wilhelm B., Rajić A., Waddell L., Parker S., Harris J., Roberts K., Kydd R., Greig R., Baynton A., (2009). "Prevalence of Zoonotic or Potentially Zoonotic Bacteria, Antimicrobial Resistance, and Somatic Cell Counts in Organic Dairy Production: Current Knowledge and Research Gaps". *Foodborne Pathogens and Disease.* June 2009, 6(5): 525-539.

World Health Organisation (WHO), (1989). "*Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture.*" Report of a WHO Scientific Group. Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, No. 778).

World Health Organisation (WHO), (1998). "*Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review*".

World Health Organisation (WHO), (2006). "*WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater*". volume III: Wastewater and excreta use in aquaculture.

World Health Organisation (WHO), (2011). "*Outbreaks of E. coli O104:H4 infection*".





## 6 BIJLAGE

### A Resultaten water- en productstalen DNA-array

Tabel 25: Samenvatting van de resultaten van de DNA-array. Na amplificatie werden alle water- en productstalen gehybridiseerd op het finale membraan.

	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>V. cholera</i>	<i>Shigella</i>	<i>C. botulinum</i>	<i>H. pylori</i>	<i>Legionella</i>	<i>Listeria</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Aeromonas</i>
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	4	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	4	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	4	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0

30	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	4	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	2
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
63	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	4	2	0
64	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
65	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0
66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0
68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0

69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0
74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0
77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	0	0
79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	0	0	0	2	0	0	1	0	0	2	0	4	0	0
81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	2	0
82	0	0	3	0	0	0	0	0	0	2	3	4	3	0
83	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0
93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	0	0
97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	2	0
98	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0
99	0	0	4	0	0	0	0	0	0	1	0	4	3	2
100	0	0	0	3	0	0	3	0	0	0	0	4	0	0
101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	2
103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
104	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0
105	0	0	2	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
106	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
107	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	4	0	2

108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
109	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0
118	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	2	0
119	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
121	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
123	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
124	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
125	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4
126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	2	2
127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0
129	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	
130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0
131	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
132	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
133	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0
134	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	3	0
136	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0
137	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	3	3
138	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0
139	3	3	0	3	0	0	0	0	0	2	0	4	2	0
140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0
141	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	1	1
142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
143	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0
144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0
145	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
146	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	2	0

147	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0
148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0
150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
151	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	2	2
152	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	2	0
153	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0
154	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
155	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
156	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0
157	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
158	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
159	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	4	0	0
160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0
161	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
162	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
163	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
164	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
166	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
168	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
169	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
171	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
172	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
173	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
174	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
175	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
176	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	1	2	0	0
177	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
178	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	2	0
179	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	2	0
180	0	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0
181	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
182	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
183	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
184	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
185	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

186	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
187	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
188	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
189	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
191	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
192	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
193	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
194	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
195	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
196	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	4	0	0
197	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	4	0	0
198	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	4	0	0
199	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
201	0	2	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
202	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0
203	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
205	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0
206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	2	0
207	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0
208	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
209	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
211	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
212	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
215	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
216	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
217	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
218	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
245	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
246	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	4	4	0
247	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
248	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
249	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0

<b>251</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
<b>252</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>253</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
<b>254</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
<b>255</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
<b>256</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>257</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
<b>258</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
<b>259</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
<b>260</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	0	0
<b>261</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>262</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0
<b>263</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<b>264</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0





