



Besmettingsrisico tijdens distributie

BTO 2013.025
Maart 2013



Watercycle Research Institute

Besmettingsrisico tijdens distributie

BTO 2013.025
Maart 2013

© 2013 KWR

Alle rechten voorbehouden.

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

Colofon

Titel

Besmettingsrisico's tijdens distributie

Opdrachtnummer

B111545

Rapportnummer

BTO 2013.025

Onderzoeksprogramma

Microbiologie

Projectmanager

N. Dammers

Opdrachtgever

CvO

Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

Auteur(s)

Edwin Kardinaal, Patrick Smeets & Gertjan Medema

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar.

Samenvatting

Belang: veilige distributie

In Nederland wordt drinkwater zonder desinfectiemiddel gedistribueerd. Nederland is daarmee redelijk uniek in de wereld. Het niet desinfecteren vergt wel strikte eisen aan de fysieke en hydraulische integriteit van het distributienet, terugstroombeveiliging en strikte hygiëne bij werkzaamheden. Waterbedrijven bewaken de kwaliteit van het drinkwater dat zij aan de klant leveren met een meetprogramma dat is gebaseerd op het Drinkwaterbesluit. Een landelijke analyse in het BTO gaf aan dat met de wettelijke controle grofweg in 1 op de 300-400 monsters uit woningen *E. coli* wordt aangetroffen. In 1 op de 80 van die gevallen wordt bij herhaling *E. coli* aangetroffen (in reservoirs in 1 op de 10). Wat is het niveau van bescherming dat we kunnen toewijzen aan de wettelijke microbiologische monitoring van de waterkwaliteit? Niet al het drinkwater wordt getest, maar er worden steekproefsgewijs monsters genomen, verdeeld over ruimte en tijd. Een simulatiestudie in het BTO liet zien dat de kans dat het wettelijke meetprogramma een verontreiniging met (riool)water ergens in het distributienet daadwerkelijk detecteert erg laag is (5,6%). Dit betekent dat het wettelijk meetprogramma gemiddeld zo'n 95% kans heeft een verontreiniging te missen. De lage gevoeligheid wordt voornamelijk bepaald door de voorbijgaande aard van verontreinigingen. Een steekproefsgewijs, incidenteel meetprogramma is dus niet erg geschikt om plaatselijke, kortdurende verontreinigingen op te sporen. De afgelopen jaren verschenen er diverse studies uit Noord-Amerika en Europa over fecale verontreinigingen van het drinkwaternet, als gevolg van dwarsverbindingen, drukgolven en onderhoudswerkzaamheden en de associatie daarvan met gezondheidsrisico's voor de drinkwaterconsument. Deze studies vergrootten de noodzaak om de veiligheid van de Nederlandse benadering aan te kunnen tonen.

Doel van dit onderzoek is het verbeteren van het beeld van de veiligheid van de distributie van drinkwater zonder desinfectiemiddel, ten aanzien van het risico op het binnendringen van verontreinigingen. om beter inzicht te krijgen in het eventuele binnendringen van verontreinigingen in het net. Daartoe is een nieuwe meetstrategie ontwikkeld en getest in een aantal praktijksituaties om de frequentie en mate van het voorkomen van eventuele verontreinigingen en de betekenis daarvan door het meten van de daadwerkelijke ziekteverwekkers.

Aanpak:

Om de doelstellingen van dit onderzoek te bereiken was een meetstrategie nodig die op efficiënte wijze een zo hoog mogelijke pakkans van kortdurende, plaatselijke verontreinigingen in het distributienet oplevert. Hiertoe is een speciaal bemonsteringsapparaat ontwikkeld (tap sampler). De tap sampler kan eenvoudig aan de (buiten)kraan worden gemonteerd en neemt over 24 uur continu een monster uit het drinkwaternet. Het totale monstervolume over 24 uur ligt op minimaal 10 liter. Naast een monster voor analyse op *E. coli* (kweekmethode) wordt een monster genomen voor analyse op pathogenen (*Campylobacter*, EHEC, *Cryptosporidium*, *Giardia* en Adenovirus 40/41) onderzocht (DNA-methode: qPCR).

De methode is toegepast in een tweetal distributiegebieden (Amersfoort en in Annen (Dr.)), waarvan de bron grondwater betref. In beide netwerken is op een drietal locaties + bij het pompstation een tap sampler geplaatst die drie maanden operationeel zijn geweest. Bij Annen is de pakkans van fecale verontreinigingen door plaatsing van de tap samplers berekend met Infoworks.

Resultaat:

Er is nu een meetinstallatie (tap sampler) en meetstrategie (continue meten op plaatsen die met Infoworks zijn geverifieerd) beschikbaar. Deze is getest en geoptimaliseerd in de praktijk.

In beide veldonderzoeken zijn geen *E. coli* bacteriën gedetecteerd. Wel zijn er in een aantal gevallen bacteriën aangetroffen die geen *E. coli* bleken te zijn. Deze bevinding toont aan dat de tap sampler in staat is om bacteriën uit het netwerk te detecteren. Ook bij de reguliere monsternamen in hetzelfde distributie gebied zijn geen sporen van fecale verontreiniging aangetroffen. Ook ten tijde van werkzaamheden zijn geen fecale verontreinigingen aangetroffen met behulp van de tapsampler en met

behulp van de reguliere controlemonsters. Onderzoek van de pathogeenfilters met PCR heeft geen pathogenen aangetoond.

Implementatie:

Het niet aantreffen van sporen van fecale verontreiniging met dit veel gevoeliger Tap Sampler meetprogramma is in ieder geval een duidelijke aanwijzing dat er in de twee onderzochte distributienetten niet frequent verontreinigingen optreden die door het ongevoelige wettelijke meetprogramma niet worden gezien. En hoewel het maar twee (delen van) distributienetten betreft, levert dit onderzoek een sterkere onderbouwing van de veiligheid van distributie van drinkwater in Nederland.

De voornaamste aanbevelingen zijn van deze studie zijn:

1. De ontwikkelde meetstrategie en bemonsteringsmethode zijn geschikt voor toepassing in het veld. Drinkwaterbedrijven en -laboratoria kunnen de Tap Sampler inzetten voor onderzoek van de veiligheid van hun distributienet.
2. Gezien het niet aantreffen van sporen van fecale verontreiniging in het distributienet van Amersfoort en Annen lijkt reproduceren van dit onderzoek op meer locaties niet efficiënt.
3. De Tap Sampler leent zich beter voor gericht onderzoek naar de veiligheid van distributie van drinkwater, zoals bij verontreinigingen, calamiteiten of ingrepen.

Inhoud

Samenvatting	1
Inhoud	3
1 Inleiding	5
1.1 Veilige distributie zonder chloor	5
1.2 Mate van bescherming van het distributienet tegen verontreinigingen	6
1.3 Uitbraken van ziekte via drinkwater	6
1.4 Waterkwaliteitsbewaking	7
1.5 Doel	8
2 Ontwikkeling meetstrategie	9
2.1 Analyseparameters en -methoden	9
2.2 Monstervolume, frequentie, locaties	10
2.3 Bemonsteringsmethode	10
3 Tap sampler Amersfoort	11
3.1 Methode en principe	11
3.2 Analyse	14
3.3 Uitkomsten	15
4 Tapsampler Annen	17
4.1 Methodiek	17
4.2 Analyse resultaten	20
4.3 Uitkomsten	24
5 Ingrepen	25
5.1 Methode	25
5.2 Analyse resultaten	27
6 Discussie	31
7 Implementatie en aanbevelingen	35

Referenties

37

- I **Recovery testen E. coli**
- II **Tapsampler gebruikersprotocol**
- III **Detectiekans verontreiniging in voorzieningsgebied Annen**
- IV **Volume resultaten**

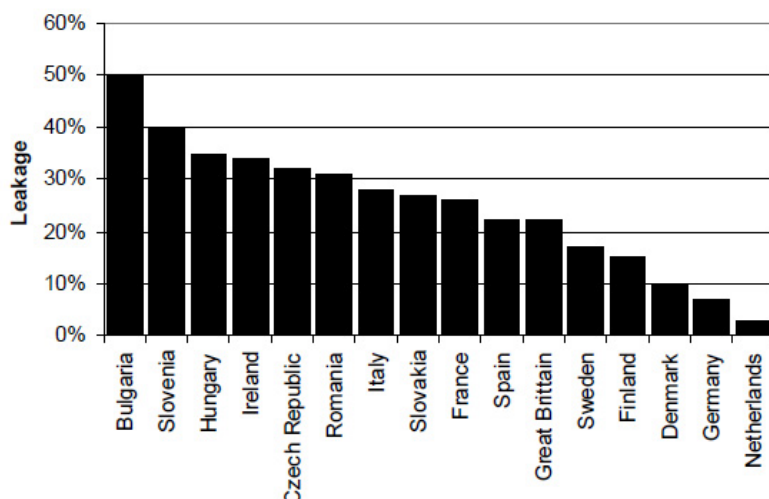
1 Inleiding

1.1 Veilige distributie zonder chloor

In Nederland wordt drinkwater nagenoeg overal zonder desinfectiemiddel gedistribueerd. Nederland is daarmee redelijk uniek in de wereld. In enkele staten van Duitsland, Denemarken, Luxemburg en Zwitserland wordt een dergelijk distributiebeleid eveneens toegepast. Elders in de wereld is het desinfecteren met bijvoorbeeld chloor en/of chloordioxide de normale gang van zaken. De argumenten om te desinfecteren zijn nagenoeg even omvangrijk als de argumenten om het niet te doen. Het zal per situatie verschillen of desinfectie bijdraagt aan een gezonder product. Voor de Nederlandse situatie was de ontdekking van het ontstaan van desinfectie-bijproducten in de vroege 70'er jaren een aanleiding om het gebruik van chloor te reduceren. In de aansluitende jaren is er op diverse locaties getest met het achterwege laten van chloordesinfectie. In begin tachtiger jaren liet een grote proef zien dat bij water zonder desinfectie de mutageniteit afnam, bijproducten verdwenen uit het drinkwaternet zonder dat bacteriën van de coligroep of enterococcon toenamen. Daarnaast bleven het aantal heterotrofe bacteriën (koloniegetal) gelijk en nam het AOC gehalte aanzienlijk af (met 40%). Dit resultaat was aanleiding om de chloor dosering voor nadesinfectie te stoppen (Schellart, 1986).

Het achterwege kunnen laten van desinfectie is wel gebonden aan een aantal voorwaarden, zo is een distributienet van goede kwaliteit onmisbaar voor het leveren van drinkwater van goede waterkwaliteit. De basiselementen zijn:

- Fysieke integriteit. De fysieke integriteit van het leidingnet voorkomt binnendringen op plaatsen of tijdstippen waar de hydraulische druk laag of afwezig is. Fysieke integriteit is van bijzonder belang bij bijvoorbeeld reservoirs die niet onder druk staan. Nederland heeft een zeer laag lekverlies: <3% (Beuken *et al.*, 2006). In vergelijking met andere Europese landen is dit zeer laag (figuur 1.1). In een vergelijkende studie werden verschillende factoren geïdentificeerd die bijdragen aan dit lage lekverlies (UKWIR, 2006). De druk in het netwerk kan relatief laag zijn door het vlakke terrein; hoge gebouwen zijn uitgerust met een eigen pomp; het merendeel van het netwerk is relatief jong en geproduceerd van PVC met relatief weinig voegen en verbindingen. Net als veel andere landen, wordt Nederland geconfronteerd met de verouderende netten. Dat maakt actieve beoordeling van de staat van het netwerk en haar integriteit noodzakelijk om lekkage en mogelijk binnendringen van verontreinigingen te beheersen.



Figuur 1.1. Lekkage in de Europese landen (VEWIN, 2009a; DVGW, 2008).

- Hydraulische integriteit. Continue handhaving van voldoende hoge druk in het netwerk is vereist om verontreinigingen in het netwerk te voorkomen. Drukschommelingen en golven worden geminimaliseerd door variabele pompen, drukdempende apparaten, afsluiter procedures, en

geautomatiseerde distributie controle en druk zonerings in (de weinige) heuvelachtige gebieden (Smeets *et al.*, 2009).

- Bescherming tegen terugstroming door het gebruik van breek tanks voor grotere gebruikersinstallaties (industrie, ziekenhuizen) en het gebruik van terugstroombeveiligers in watermeters van huisaansluitingen, waarbij >96% van de aansluitingen zijn bemeaten.

- Strikte hygiëne tijdens aanleg en onderhoud van het net. Een nationale Hygiëncode Distributie is ontwikkeld door de waterbedrijven (Nobel, 2001, Van Lieverloo *et al.*, 2002). Deze code is onderdeel geworden van de kwaliteitsborgingsystemen van de waterbedrijven. Hij is onlangs bijgewerkt (Meerkerk & Kroesbergen, 2010) en is uitgegroeid tot een integraal onderdeel van het Drinkwaterbesluit. De code geeft de beginselen van goede hygiëne tijdens aanleg en onderhoud en beschrijft controlemaatregelen voor een veilige opslag van materialen, inspecties, reiniging en desinfectie van materialen en leidingen na aanleg of reparatie, persoonlijke hygiëne en het gebruik van apparatuur, zoals brandkranen. Ook training, supervisie en controle van de waterkwaliteit om de effectiviteit van de Hygiëncode te controleren wordt beschreven.

- Goedkeuring voor materialen en kleppen en brandkranen. Certificatie van materialen en appendages die worden gebruikt in distributienetten is ontwikkeld sinds de oprichting van KIWA in 1948. Alle materialen moeten worden goedgekeurd in overeenstemming met deze certificeringregeling.

1.2 Mate van bescherming van het distributienet tegen verontreinigingen

Het Nederlandse Drinkwaterbesluit kent de Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater (AMVD) als centrale benadering om de microbiologische veiligheid van (oppervlakte) water systemen (Anonymus, 2001, 2011) aan te tonen. Waterbedrijven hebben daarin de opdracht om de veiligheid van hun drinkwater aantoonbaar te maken door de aanwezigheid van referentie-pathogenen (*Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, kweekbare Enterovirussen) in hun bron te meten en aannemelijk te maken dat deze pathogenen door hun zuiveringsprocessen in voldoende mate worden geëlimineerd om veilig drinkwater te produceren. Veilig is hierbij gedefinieerd als een drinkwaterkwaliteit die overeenkomt met een kans op infectie door deze referentie-pathogenen van minder dan 1 op 10.000 personen per jaar.

De veiligheid van het water tijdens distributie is niet expliciet opgenomen in de Inspectierichtlijn AMVD opgenomen, maar het ligt voor de hand om ditzelfde veiligheidsniveau te verlangen van het drinkwater dat aan de klant wordt geleverd. Het aantonen van deze hoge mate van veiligheid is voor het distributienet echter veel lastiger. Met de afwezigheid van een restdesinfectans hebben de waterbedrijven een barrière minder in het distributienet en is de noodzaak extra groot om aan te kunnen tonen dat de andere barrières effectief zijn. In 2000 was dit al onderwerp van een gezamenlijk onderzoeksproject samen met de Engelse waterbedrijven, waar wel chloor wordt toegepast als nadesinfectie (van der Kooij *et al.*, 2002). Conclusie was dat een restchloor-gehalte in het water ten minste enige bescherming kan bieden tegen fecale besmetting van het netwerk.

Sinds die tijd verschenen er diverse studies uit Noord-Amerika en Europa over fecale verontreiniging en van het drinkwaternet, als gevolg van dwarsverbindingen, druggolven en onderhoudswerkzaamheden en de associatie daarvan met gezondheidsrisico's voor de drinkwaterconsument (Payment *et al.*, 1991, 1997; Craun & Calderon, 2001; Karim *et al.*, 2003; Hunter *et al.*, 2005; Nygard *et al.*, 2007; Besner *et al.*, 2011; LeChevallier *et al.*, 2011). Deze studies vergrootten de noodzaak om de veiligheid van de Nederlandse benadering aan te kunnen tonen. Eerder BTO onderzoek is gericht op de evaluatie van het bewijs dat de distributie zonder desinfectie voldoende bescherming tegen het binnendringen van pathogenen biedt.

1.3 Uitbraken van ziekte via drinkwater

Dat een verontreiniging van het net grote gevolgen kan hebben bleek recentelijk (2010) in België (Gazet van Antwerpen, 10 dec. 2010). Het vermoedelijk fout aansluiten van een brandweerslang leidde in Antwerpen tot een verontreiniging van het drinkwater (Nieuwsblad.be, 17 dec. 2010) en daarvan werden naar schatting 3300-6100 mensen ziek.

Het vergelijken van de gedocumenteerde uitbraken van ziektegevallen door verontreiniging van drinkwater in Nederland en de Verenigde Staten geeft aan dat het aantal uitbraken en ziektegevallen in

Nederland laag is: in de periode 1971-2002 waren er 671 uitbraken via drinkwater in de Verenigde Staten (ongeveer 22 uitbraken per jaar of 0,08 uitbraken per miljoen consumenten per jaar), vergeleken met 2 (1 per 15 jaar of 0,004 uitbraken per miljoen inwoners per jaar) in Nederland. In Europa zijn 86 uitbraken via drinkwater geregistreerd (ongeveer 6 per jaar of 0,01 uitbraken per miljoen consumenten per jaar) van 1990-2004. Hoewel de verschillen in de watervoorziening en ziekte surveillance systeem een directe vergelijking moeilijk maken, suggereren deze statistieken zeker niet dat de distributie van drinkwater zonder een desinfectiemiddel het risico op een uitbraak verhoogd.

1.4 Waterkwaliteitsbewaking

Waterbedrijven bewaken de kwaliteit van het drinkwater dat zij aan de klant leveren met een meetprogramma dat is gebaseerd op het Drinkwaterbesluit. Soms leidt dat er toe dat een verontreinigingsincident (herhaaldelijk aantreffen van fecale indicator-organismen als *E. coli*) wordt geconstateerd. Van Lieverloo *et al.* 2006, 2007b hebben in het BTO informatie verzameld over dergelijke verontreinigingsincidenten. Gedurende een periode van 10 jaar werden vijftig incidenten geregistreerd door 9 waterleidingbedrijven (totaal 11 miljoen klanten), ofwel (ongeveer) 0,4 gevallen per miljoen mensen per jaar. Dat is honderdmaal hoger dan de geregistreerde uitbraken. Een van deze incidenten was de uitbraak met ziektegevallen door de kruisverbinding met het huishoudwaternet in Leidsche Rijn in 2001; bij de andere incidenten werd geen verhoogde ziekte incidentie waargenomen. Het aantal klanten dat gevolgen kon ondervinden van deze incidenten werd geschat op tussen de 5 en 50.000 personen, met 9 incidenten die van invloed waren op meer dan 1.000 klanten. De totale getroffen bevolking werd geschat op 185.000 personen. De waterbedrijven benadrukten dat niet alle incidenten goed zijn geregistreerd, zodat dit ook een onderschatting is van het werkelijke aantal gebeurtenissen.

Om de gezondheidskundige betekenis van deze incidenten in te schatten hebben Van Lieverloo *et al.* (2007b) de gegevens (frequentie, getroffen bevolking, duur, *E. coli* concentratie) gebruikt in een kwantitatieve microbiële risico analyse (QMRA). Dit vereiste een set veronderstellingen, waarvan de bron van de verontreiniging de belangrijkste was. Aangenomen dat oppervlaktewater de besmettingsbron was leverde een infectierisico (95%) per gebeurtenis van 0,16, rioolwater als bron gaf een infectierisico (95%) van 0,013. Hoewel de precieze hoogte van het infectierisico onzeker bleek, leverde deze schattingen het inzicht dat, zelfs bij lage concentraties fecale indicatorbacteriën in drinkwater, het gezondheidsrisico groot is. Dit is in lijn met uitbraken via drinkwater met lage aantallen *E. coli* (Hrudey & Hrudey, 2004; Fernandes *et al.*, 2006).

In Nederland wordt het meetprogramma voor *E. coli* gebruikt door de waterbedrijven in de water kwaliteitsindex van de benchmark. De wettelijke controle geeft aan dat drinkwater in Nederland zeer goed aan de normen voldoet. Gemiddeld was er in 2008 1 geval van niet-naleving van de *E. coli* normen (herhaaldelijk aantreffen van *E. coli*) voor de 333 miljoen m³ geleverd door de sector (VEWIN, 2009b). Dit is in vergelijking met andere landen (ook met nadesinfectie) laag (Medema *et al.*, 2013), een duidelijke aanwijzing dat ook zonder desinfectiemiddel veilig drinkwater kan worden geleverd. Een aantal keren per jaar worden met het reguliere meetprogramma van *E. coli* in het gedistribueerde water wel sporen van verontreiniging aangetroffen, die soms aanleiding zijn tot negatieve publiciteit. In eerder BTO is hier nader onderzoek aan gedaan (Tabel 1, van Lieverloo *et al.*, 2003).

Tabel 1. Percentage positieve monsters (meetdata Nederland 1996-1998)

	n	Coliformen aanwezig	Bij herhaling coliformen aanwezig	Thermotolerante coliformen aanwezig	Bij herhaling thermotolerante coliformen aanwezig
Water af pompstation	26656	0.70%	0.086%	0.10%	0.004%
Water in reservoirs	6682	2.02%	0.614%	0.31%	0.030%
Water in woningen	54741	0.96%	0.037%	0.31%	0.0037%
Totaal	88079	0.96%	0.095%	0.24%	0.0057%

Zowel coliformen en thermotolerante coliformen werden vaker aangetroffen in gebouwen en reservoirs dan in water af pompstation. Dat is een indicatie voor binnendringen van fecale verontreiniging (op een

laag niveau) tijdens de distributie. Herhaalde detectie van (thermotolerante) coliformen werd het meest frequent waargenomen in de reservoirs. Gezien de relatief lange verblijftijd van het water (en verontreinigingen) in reservoirs, en de kwetsbaarheid van reservoirs voor verontreiniging, is dit niet verwonderlijk. Maar hoe moet dit nu worden geduïd? Er wordt grofweg in 1 op de 300-400 monsters *E.coli* aangetroffen en in woningen in 1 op de 80 van die gevallen bij herhaling *E. coli* aangetroffen (in reservoirs in 1 op de 10). Wat is het niveau van bescherming dat we kunnen toewijzen aan de wettelijke microbiologische monitoring van de waterkwaliteit? Niet al het drinkwater wordt getest, maar er worden steekproefsgewijs monsters genomen, verdeeld over ruimte en tijd. Besmettingen kunnen binnendringen op veel plaatsen en tijdstippen en het wettelijk meetprogramma kan dus niet alle besmettingen in het netwerk detecteren. Een simulatiestudie liet zien dat de kans dat het reguliere meetprogramma een verontreiniging met (riool)water ergens in het distributienet daadwerkelijk detecteert erg laag is (5,6% (0-13%): BTO 2004.063). Dit betekent dat het wettelijk meetprogramma gemiddeld zo'n 95% kans heeft een verontreiniging te missen. Dit komt overeen met het gegeven dat uitbraken van ziekte of besmettingsincidenten vaker worden gevonden door klachten van klanten dan door monitoring van de waterkwaliteit (Hrudey & Hrudey, 2004, Fernandes *et al.*, 2007). Dit betekent dat het wettelijk meetprogramma erg ongevoelig is voor het detecteren van verontreinigingen. De lage gevoeligheid wordt voornamelijk bepaald door de voorbijgaande aard van verontreinigingen (Van Lieverloo *et al.*, 2007b, Besner *et al.*, 2011, LeChevallier *et al.*, 2011). Een steekproefsgewijs, incidenteel meetprogramma is niet erg geschikt om plaatselijke, kortdurende verontreinigingen op te sporen. Het wettelijk meetprogramma is ook primair bedoeld als verificatie dat de barrières tegen verontreiniging (zie paragraaf 1.1) goed werken; niet om alle verontreinigingen op te sporen. Maar de vraag blijft of het meetprogramma voldoende verificatie biedt, of dat er verontreinigingen "onder de radar" blijven die wel leiden tot een infectierisico boven de 1 op de 10.000.

1.5 Doel

Het doel van dit onderzoek is het verbeteren van het beeld van de veiligheid van de distributie van drinkwater zonder desinfectiemiddel, ten aanzien van het risico op het binnendringen van verontreinigingen.

Specifieke doelen daarbij zijn:

- ontwikkelen en testen van een meetstrategie die een hogere pakkans heeft op fecale verontreinigingen in het distributienet dan het wettelijke meetprogramma;
- in een aantal praktijksituaties vaststellen van de *frequentie* waarin verontreinigingen optreden onder normale omstandigheden en tijdens werkzaamheden;
- in een aantal praktijksituaties vaststellen van de *mate* waarin verontreinigingen optreden door de concentratie indicatororganismen te meten;
- in een aantal praktijksituaties vaststellen van de *betekenis* van verontreinigingen door het voorkomen van ziekteverwekkers te meten.

2 Ontwikkeling meetstrategie

Om de doelstellingen van dit onderzoek te bereiken was een meetstrategie nodig die op efficiënte wijze een zo hoog mogelijke pakkans van kortdurende, plaatselijke verontreinigingen in het distributienet oplevert. Daarbij zijn van belang analyseparameters en –methoden, monstervolume, frequentie, locaties en bemonsteringsmethode.

2.1 Analyseparameters en –methoden

E. coli wordt in het wettelijk meetprogramma gebruikt als indicatorparameter voor fecale verontreiniging. *E. coli* wordt gedetecteerd met een kweekmethode (Nobel, 2001). Met de kweekmethode worden levende *E. coli* gedetecteerd. Daarvoor moeten monsters binnen 24 uur na monsterneming worden onderzocht. Langer wachten betekent dat *E. coli* kan afsterven en dan zijn de monsters niet representatief meer (NEN). Er zijn ook moleculaire methoden beschreven voor detectie van *E. coli* in drinkwater, zoals NASBA (Heijnen & Medema, 2009), RT-PCR (Heijnen & Medema, 2006) en PCR (Juhna *et al.*, 2007) en FISH (Lepeuple *et al.*, 2003). Van PCR en FISH is zowel voordeel als nadeel dat ze niet strikt afhankelijk zijn van levende bacteriën; ook dode bacteriën kunnen een positief signaal geven. Voor deze methoden kunnen monsters dus waarschijnlijk langer worden bewaard, maar de interpretatie is minder eenduidig. Zo hebben Juhna *et al.* (2007) bijvoorbeeld *E. coli* in het drinkwater in Parijs en Riga aangetroffen met de FISH methode, terwijl de kweekmethode negatief was. Om die reden is er in dit onderzoek voor gekozen om voor *E. coli* met de kweekmethode te werken. Dit beperkt de bemonsteringstijd tot 1 dag, maar levert resultaten die direct vergelijkbaar zijn met het wettelijke meetprogramma en die te interpreteren zijn als een recente fecale verontreiniging.

Doel van dit onderzoek was ook inzicht te krijgen in de concentratie pathogenen die in drinkwater aanwezig kunnen zijn bij een fecale verontreiniging. Daarom zijn naast *E. coli* de volgende referentiepathogenen opgenomen in dit onderzoek:

- *Campylobacter*, om dezelfde redenen dat deze pathoogeen in de Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater is opgenomen;
- Enterohemorragische *E. coli* (EHEC), vanwege de ernst van het ziektebeeld;
- *Cryptosporidium* en *Giardia*, om dezelfde redenen dat deze pathogenen in de Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater is opgenomen;
- Adenovirus 40/41, omdat deze virustypen in hoge concentraties in rioolwater en oppervlaktewater worden gevonden (en in de VS ook in drinkwater (Teunis *et al.*, 2010)).

Voor de detectie van deze pathogenen zijn qPCR methoden gebruikt. Ook hier speelt het onderscheid tussen levend en dood, maar vanwege de gevoeligheid zijn de methoden toch zeer goed inzetbaar.

Deze moleculaire methoden zijn recentelijk beschikbaar gemaakt voor toepassing in drinkwateranalyse (BTO rapport 2011.010, Heijnen & Medema, 2006; Heijnen, 2013).

Moleculaire detectiemethoden pathogenen

Al het op het pathoogeen filter aanwezige DNA is geïsoleerd met behulp van een isolatie kit (PowerBiofilm TM DNA Isolation Kit). Hiertoe is het filter overgebracht in een buisje met glaskorrels. Door het toevoegen van lysisbuffer, verwarmen en schudden zijn de aanwezige cellen gelyseerd, zodat het DNA vrij komt. Vervolgens zijn de eiwitten geprecipiteerd en verwijderd, waarna het DNA is opgehoopt en schoongespoeld. Ten slotte is het DNA geëluëerd in 200 µl elutie-buffer. Van dit geïsoleerde DNA is 10 µl in duplo voor de qPCR reactie gebruikt, voor elk onderzocht organisme. Naast een ijklijn voor het kwantificeren van de organismen, is bij elke run ter controle een duplo PCR blanco meegenomen. Er zijn in dit project geen blanco filters geïsoleerd, welke als procedure blanco dienst zouden kunnen doen.

Tijdens de isolatie is in de lysisbuffer bij elk monster een interne controle toegevoegd. Dit interne controle DNA fragment is ook met qPCR geanalyseerd. Het resultaat van de interne controle geeft voor elk monster kwantitatief inzicht in het rendement van de opwerking en het mogelijk optreden van remming van de qPCR reactie. Het rendement van de interne controle is gebruikt om de metingen van de onderzochte organismen te corrigeren.

2.2 Monstervolume, frequentie, locaties

In het wettelijk meetprogramma wordt meestal 100 ml water onderzocht. Een eenvoudig te realiseren uitbreiding van het meetnet zou zijn om een groter volume te bemonsteren. Onderzoek van een veel groter volume (ca. 100 liter) per monster gaf aan dat ook dan geen sporen van fecale verontreiniging worden aangetroffen (Nobel & Oosterholt, 2005: BTO 2004.071). Uit een vergelijking van 100 en 2000 ml monsters in de VS bleken wel vaker coliformen te worden gevonden in het grotere volume (100 ml leverde 0,9-2,2% positieve monsters, 2000 ml leverde 4,1-8,2% positieve monsters; Fricker *et al.*, 2010), maar niet vaker *E.coli*. Zij bevelen ook aan het volume voor de reguliere monsters niet te verhogen, maar in het geval van een positief monster wel grotere volumes te gebruiken om de bronopsporing te vergemakkelijken.

Blokker *et al.* (2009) hebben onderzocht op welke wijze de pakkans van kortdurende, plaatselijke verontreinigingen in het distributienet het beste kan worden vergroot. Daaruit kwam naar voren dat vaker meten de pakkans vergroot. Vooral continu meten op een aantal strategische locaties in het distributienet vergroot de pakkans substantieel (tot ca 80%). Aantal locaties en de precieze locaties van monsterneming zijn te bepalen met optimalisatieprogramma's zoals beschreven in Blokker *et al.* (2009).

Voor de selectie van de monsterpunten zijn de volgende eisen en wensen geformuleerd:

- Drinkwater wordt geproduceerd uit diep grondwater, om te voorkomen dat via de winning of zuivering detecteerbaar DNA van de referentiepathogenen in het drinkwater aanwezig zou kunnen zijn
- Alle monsterpunten liggen binnen één voorzieningsgebied dat wordt gevoed door één pompstation, zodat de herkomst van het water duidelijk is
- Het voorzieningsgebied is uitgestrekt en de vier monsterpunten liggen verspreid over het gebied
- In het voorzieningsgebied is een (drukloos) reservoir aanwezig, omdat hier een hoger besmettingsrisico zou kunnen zijn
- Het pompstation wordt ook dagelijks bemonsterd, om bij een verontreiniging vast te kunnen stellen of hij in de winning/zuivering plaats had gevonden of in het net
- Monsterpunten moeten 24h per dag minimaal 4 dagen per week continu beschikbaar zijn
- Het monsterpunt kan daarbij eventueel als tappunt in gebruik blijven
- Het bemonsteringsfilter moet iedere dag worden verwisseld door de monsternemer.

2.3 Bemonsteringsmethode

De beste meetstrategie voor dit onderzoek is dus op een aantal locaties in het distributienet het water continu bemonsteren. Daarvoor is een bemonsteringsmethode nodig die continu water uit het drinkwaternet bemonsterd. In eerder BTO onderzoek is de hemoflow cross-flow ultrafiltratiemethode ontwikkeld die een goede opbrengst geeft van zowel bacteriën, bacteriesporen, virussen (bacteriofagen) als parasitaire protozoa. Als eerste strategie is aansluiting van een hemoflow cross-flow filter (met een vlottervat en circulatiepomp) aan het drinkwaternet overwogen. Zo kan het water in het net continu worden bemonsterd. Dit had echter als nadeel dat er op de monsterlocaties een circulatiepomp, vlottervat en koeling nodig zijn. Daarom is een nieuwe monsternameconstructie ontwikkeld die direct aan de kraan bij eindgebruikers te monteren valt: de tap sampler. De tap sampler bestaat uit twee membraanfilterhouders die 24 uur op een (buiten)kraan kunnen worden aangesloten, een met een filter met poriëgrootte van 0,45 µm voor onderzoek van ca. 10 liter water op *E. coli* met de reguliere kweekmethode en een met filter met een poriëgrootte van 0,04 µm voor onderzoek van ca. 40 liter water op de referentie-pathogenen met PCR. Het water wordt door de reguliere waterdruk door de filters geperst en het gefiltreerde volume per filter wordt geregistreerd met een regenmeter. Na 24 uur worden de filterhouders gewisseld met steriele nieuwe filterhouders. In vergelijking met de hemoflow is geen pomp en vlottervat nodig. Bijkomend voordeel van de tap sampler is dat het *e. coli* membraanfilter direct, zonder verdere behandeling, op het agarmedium kan worden ingezet.

Bij de ontwikkeling van het instrument is aandacht besteed aan praktische uitvoerbaarheid van monstername (bedieningsgemak en hygiënisch werken), druk(verloop) en volume en de recovery van micro-organismen. In de loop van het project zijn verdere verbeteringen aan de tap sampler aangebracht. Deze zijn in de volgende hoofdstukken beschreven. In bijlage II is het uiteindelijke protocol voor bediening van de tap sampler opgenomen.

3 Tap sampler Amersfoort

3.1 Methode en principe

Volume

De bedoeling van de tap sampler is om deze continue water te laten opvangen vanuit het distributienet. Na het aanvankelijk doorspoelen van de kraan, blijft deze gedurende de monsternamende de gehele tijd open staan en zal er continue water door de filters stromen. Voor het *E. coli* filter wordt een volume van ca. 10 liter / dag bemonsterd, voor het pathogeenfilter ligt het doelvolumen bij ca. 40 liter / dag (uitgaande van 4 pathogeengroepen, komt dat eveneens neer op 10 l. / dag per pathogeen). Na circa 24 uur worden de filters vervangen door nieuwe filters, en dit in ieder geval 4 maal per week.

Ontwerp tapsampler

De tapsampler zoals die toegepast is in het onderzoek in Amersfoort bestond uit diverse koppelingen en kranen. Uitgangspunt hierbij was dat er zo min mogelijk koper in de constructie opgenomen was om de afdoening van *E. coli* als gevolg van hoge koperconcentraties te voorkomen. De constructie beschikte over een kraan waarmee de leiding gespoeld kon worden (A in figuur 3.1), vervolgens 2 naaldkranen (B) en een tweetal filterhouders (C). Voor het bepalen van het volume wat de filters gepasseerd heeft zijn voor elk filter regenmeters (D) geïnstalleerd, waarin het gefiltreerde water door kon lopen. De regenmeters kunnen op afstand digitaal uitgelezen worden (E). Het water kon vervolgens vrij uit de regenmeters (Conrad Electronics) weglopen. De hele constructie werd beschermd door het plaatsen van een krat (foto hieronder). In kort bestaat de constructie uit:

- Gietijzeren verbindingstukken
- 2 Naaldventielen en 1 kogelkraan
- Twee aansluitingen voor filterhouders (aangepast schroefdraad)
- Twee filterhouders
- 1 Stylux filter 0.04 µm
- 1 standaard filter 0.45 µm
- Filterhouder connectors Luer-lock
- Slang connectors Luer-lock
- Waterafvoerslang
- Regenmeter meetunit
- Regenmeter uitleesunit
- Opstellingskrat

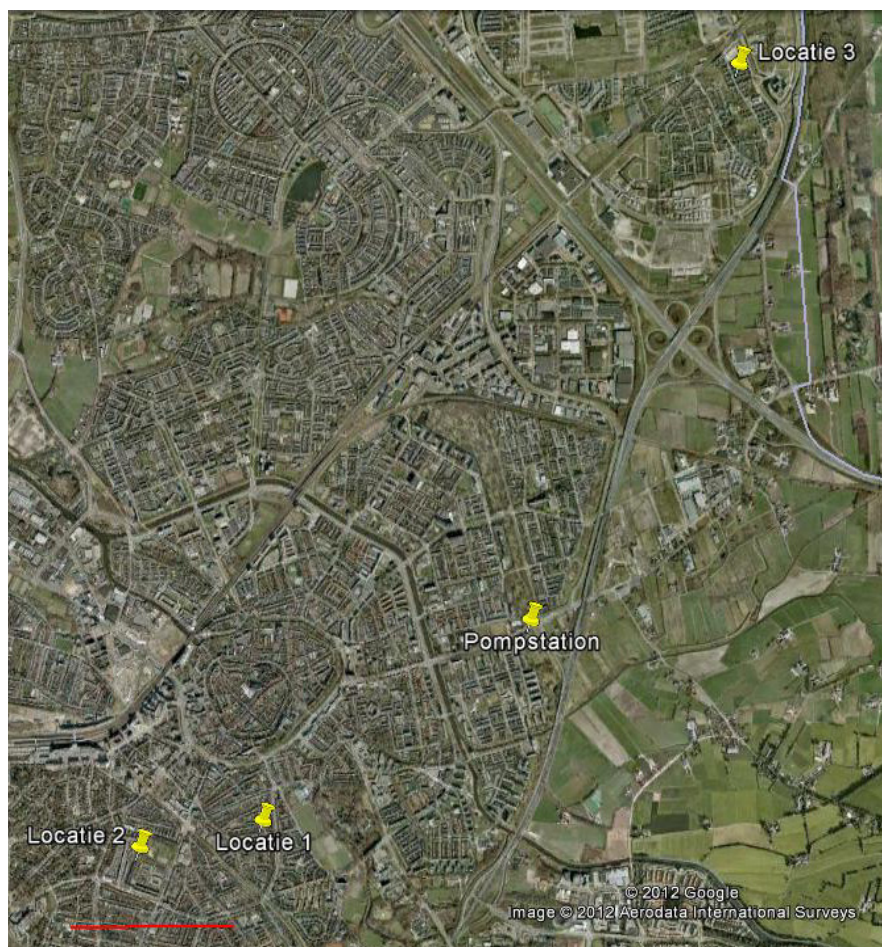


Figuur 3.1. Tap sampler opstelling: A. spoelkraan; B. naaldkraan; C. filterhouders; D. regenmeters en E. uitlees unit regenmeter.

Voor verdere instructies voor het gebruik van de tap sampler zie bijlage II.

Locaties

In Amersfoort zijn van eind maart t/m eind juni 2010 een viertal tap samplers geplaatst, één bij het pompstation Hogeweg en een drietal in het voorzieningsgebied van dit station (zie figuur 3.2). De tap samplers zijn allen aangesloten op een buitenkraan om zodoende eventuele wateroverlast te voorkomen. Om praktische redenen zijn de samplers geplaatst bij KWR medewerkers om ervaring op te doen en om een stabiele toestroom van de filters te waarborgen.



Figuur 3.2. Drietal locaties in Amersfoort waar de tapsamplert is aangesloten en de locatie van het pompstation Hogeweg.

Detectiemethoden micro-organismen

In dit onderzoek is *E. coli* gebruikt als indicator voor fecale besmetting. De *E. coli* filters zijn volgens de KWR kweekmethode (huisvoorschrift LMB-042) geanalyseerd, die enigszins afwijkt van NEN-EN-ISO 9308-1. In plaats van Lactose TTC-agarmedium wordt in de KWR methode gebruik gemaakt van het LSA-medium. Vergelijkend onderzoek heeft aangetoond dat beide media gelijkwaardig zijn, waarbij het gebruik van LSA iets specifieker blijkt. Met betrekking tot de pathogenen zijn moleculaire technieken toegepast voor de organismen enterohemorragische *E. coli* (EHEC), thermofiele *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *Giardia* en Adenovirus 40/41. De methoden zijn recentelijk beschikbaar gemaakt voor toepassing in drinkwateranalyse (BTO rapport 2011.010, Heijnen & Medema, 2006; Heijnen, 2013), zie materiaal en methoden (hfdst.2) voor de gehele procedure.

Recovery testen

Voor elk van de locaties is beoordeeld of het water dat de filters zou passeren ook enige remming op zou leveren in de kweek van de *E. coli* bacteriën. Een uitgebreide beschrijving van het recovery onderzoek is opgenomen in de Bijlage (I). Bij het voorbereidende laboratoriumonderzoek bleek de gemiddelde recovery 91%, met een onzekerheidsmarge die volgt uit de Poisson-verdeling van organismen in het water. Deze recovery was voldoende hoog om de tap sampler in de praktijk in te zetten.

In de praktijk was de recovery lager. Op één van de locaties (met een pas aangelegde binneninstallatie) veroorzaakte een koperconcentratie van ca. 420 µg/l een recovery van <2%. Op de overige locaties was de recovery rond de 30%.

Uitvoering

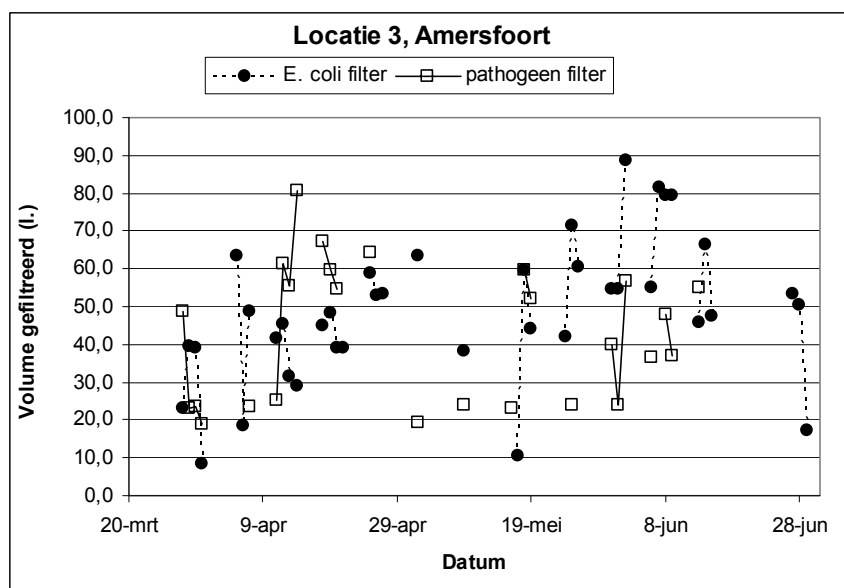
De uitvoering van het tapsamplert meetprogramma heeft plaats gevonden vanaf 28 maart t/ 30 juni 2010. De monsternamen werden over het algemeen gestart op zondagochtenden en per week werd het laatste

filter op donderdagen verwijderd. Bij de wisseling van ieder filter zijn de regenmeters afgelezen en op 0 gesteld om zodoende nieuwe aflezing mogelijk te maken. Zo zijn de locaties van dertien weken (meestal) 4 dagen per week continu bemonsterd.

3.2 Analyse

Gefiltreerd volume

De volumes zoals die op de vier locaties in Amersfoort gefiltreerd zijn lagen rond het doelvolumen, maar lopen nogal uiteen. Het bleek niet eenvoudig om de tap samplers goed af te stellen. Daardoor kon er ook per locatie een nogal uiteenlopende hoeveelheid water gefiltreerd worden. De volumes voor de *E. coli* filters varieerden van nabij het pompstation van 10 tot ruim 80 liter water per etmaal (zie figuur 3.3). Ook de stroomsnelheid van de pathogeenzijde van de tap sampler bleek moeilijk af te stellen. Bij deze filters fluctueerde de flow tussen 20 tot 80 liter per etmaal. Voor zowel de *E. coli* filters als voor de pathogeenfilters geldt dat op overige locaties de volumes nog meer uiteen konden lopen (Bijlage IV). Deze variaties zijn niet kritisch (zolang het bemonsterde volume bekend is), maar maken het lastig reproduceerbare monsters te nemen.



Figuur 3.3. Gefiltreerde volumes op de locatie 3 in Amersfoort.

E.coli resultaten

Gedurende de drie maanden dat de tapsampler aangesloten is geweest op pompstation Hogeweg en de drie locaties in het net in Amersfoort zijn in totaal 154 filters verzameld die bruikbaar waren voor de *E. coli* analyse, zie tabel 3.1 voor aantal monsters per locatie. Op deze filters bleek er geen groei plaats te vinden van typische kolonies die kon duiden op de aanwezigheid van *E. coli* bacteriën.

Tabel 3.1 Kentallen *E. coli* meetprogramma tap sampler Amersfoort

Locatie	Aantal monsters	Aantal monsters bruikbaar voor <i>E.coli</i>	Aantal dagen bemonsterd	Totaal volume bemonsterd (l)
Pompstation	33	28	33	817
Locatie 1	45	43	45	1128
Locatie 2	44	44	44	580
Locatie 3	41	39	41	1889

Pathogenen

Vanuit de totale verzameling pathogeenfilters (zie tabel 3.2 voor de kentallen) is random een selectie gemaakt van 36 meetmomenten. Van deze filters is na DNA extractie met behulp van qPCR bepaald of en zo ja hoeveel DNA kopieën aanwezig zijn geweest. Behalve voor *Cryptosporidium* gaf geen enkel van de qPCRs een positief resultaat. Van *Cryptosporidium* bleek in de eerste analyseronde dat 9 monsters

“positief” reageerden in de PCR analyse, dat wil zeggen dat er meer dan enkele DNA kopieën aangetroffen werden. Na heranalyse van de 9 monsters bleken geen van de monsters nog een positief resultaat te geven. Daarom zijn de monsters als negatief gerapporteerd.

Tijdens de isolatie is in de lysisbuffer bij elk monster een interne controle toegevoegd. Dit interne controle DNA fragment is ook met qPCR geanalyseerd. Het resultaat van de interne controle geeft voor elk monster kwantitatief inzicht in het rendement van de opwerking en het mogelijk optreden van remming van de qPCR reactie. Het rendement van de interne controle is gebruikt om de metingen van de onderzochte organismen te corrigeren. De monsters afkomstig uit Amersfoort hadden een gemiddelde opbrengst van 37,2% (range 13,4 - 61,2%) en een gefiltreerd volume van gemiddeld 47,5 liter (range 23,3-75,4). De gemiddelde detectie limiet voor Amersfoort is 6 gen kopieën per liter.

Tabel 3.2 Kentallen referentie-pathogenen meetprogramma tap sampler Amersfoort

Locatie	Aantal monsters	Aantal monsters onderzocht op pathogenen	Aantal dagen bemonsterd	Totaal volume bemonsterd
Pompstation	31	9	33	1341
Locatie 1	44	9	45	2284
Locatie 2	34	9	44	1861
Locatie 3	40	9	41	2088

3.3 Uitkomsten

Toepasbaarheid tap sampler

Het gebruik van de tapsampler is redelijk verlopen. De bemonstering is voldoende hygiënisch uit te voeren om besmetting door de monsternemer of op het laboratorium te voorkomen. Het handmatig instellen van de flow van met name het *E. coli* filter bleek niet altijd even eenvoudig. Dit heeft geresulteerd in grote verschillen in de liters gefiltreerd water per filter.

Met betrekking tot de recovery van *E. coli* cellen is gebleken dat de recovery onder goed gecontroleerde condities hoog is (gemiddeld 91%), maar in de praktijk terugzakt tot rond de 30%. Ook is gebleken dat koper een negatief effect heeft. Het materiaal van de binnenleidingen en de leeftijd daarvan zal dan mogelijk van invloed zijn op het uiteindelijke resultaat van dit tapsampler onderzoek. Of overige factoren ook van invloed zijn geweest op de overleving van *E. coli* cellen valt niet uit te sluiten. Bijvoorbeeld een te hoge temperatuur zal een negatief gevolg hebben voor de overleving van de *E. coli* cellen op de filters.

Voor het vervolg van dit onderzoek op andere locaties dient rekening gehouden te worden met de volgende zaken:

- Om groeiremming/inactivatie te voorkomen (zoals in Amersfoort op de locatie met een hoge koperconcentratie) moeten locaties eerst getest worden op recovery van kweekbare *E. coli*.
- Temperatuur is waarschijnlijk van invloed op de recovery. Aanpassing van het ontwerp van de tap sampler zodat de filterhouders gekoeld worden is nodig.
- De flow over de filters laat zich slecht afstellen. Aanpassen van de tap sampler om meer constante flow te bewerkstelligen is wenselijk.

Risico op fecale besmettingen

Met behulp van de inzet van de tapsamplers in Amersfoort zijn in totaal 154 monsters genomen. In geen van de monsters is met behulp van de kweekmethodiek een positief resultaat voor *E. coli* aangetroffen. Dit resultaat duidt erop dat er op de 31 tot 44 monsterdagen (afhankelijk van de monsternamelocatie) geen verontreinigingen bij het pompstation en in het distributienet “bovenstreams” van de meetlocaties hebben plaatsgevonden. Het feit dat er geen *E. coli* aangetroffen is zegt wel iets over de waterkwaliteit.

Behalve dat er in het tap sample onderzoek een groter volume per tijdseenheid (ca. 4400 l.) ten opzichte van de reguliere monstername (0,8 l. tijdens de loop van dit experiment) bemonsterd werd, is de frequentie bepalend voor een hogere detectiekans van een eventuele verontreiniging (zie ook bijlage III).

Vanwege het semi-continue monsternamebeleid zijn er gedurende de loop van dit experiment (ca. 3 maanden) met behulp van de tap sample methodiek 154 monsters geanalyseerd, tegen 8 tijdens de

reguliere monsternamen. Hierbij zijn de 154 monsters genomen gedurende 24 uur, de 8 reguliere monsters zijn een momentopname. In bijlage III is een simulatieberekening uitgewerkt voor de situatie in Annen. De detectiekans neemt als gevolg van continue monsternamen met circa een factor 65 toe.

Ook de 36 monsters die onderzocht zijn op de aanwezigheid van pathogenen hebben geen positief resultaat opgeleverd. Dit betekent in ieder geval dat pathogenen niet zijn voorgekomen in afwezigheid van *E. coli*. Het relateren van concentraties van pathogenen aan het indicatororganisme *E. coli* is daarmee niet mogelijk.

4 Tapsampler Annen

4.1 Methodiek

Ontwerp

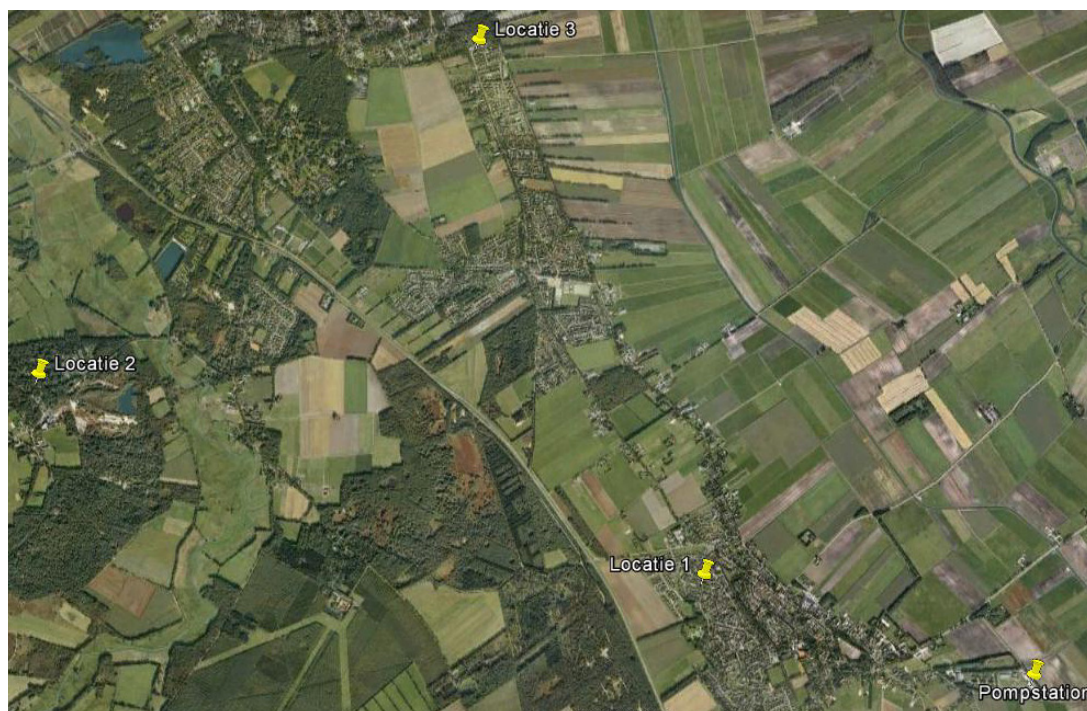
Naar aanleiding van de resultaten vanuit Amersfoort zijn er aan de tap sampler aanpassingen gemaakt voordat deze opnieuw ingezet zijn. De belangrijkste aanpassingen betroffen het op temperatuur houden van de filters zodat de overleving van eventueel gefilterde *E. coli* bacteriën beter te waarborgen is dan in een ongethermostreerde tap sampler. De filterhouders zijn daartoe ingebouwd in een kleine koelkast (zie figuur 4.1), waarin de streeftemperatuur 4°C. was. De koelkasten werden net als de eerdere tapsampler ontwerpen aangesloten op de buitenkranen van de monsternamelocaties. De koelkast bood aansluitend voldoende bescherming tegen het inregenen van de regenmeters. De vrije uitstroom bleef gehandhaafd. Aansluitend is er een drukreducerventiel toegepast om de afstelling van de 10 l. /dag voor het *E. coli* filter beter te kunnen inregelen. Tijdens het vervangen van de filters hoefde de monsternemer nu slechts tijdelijk de kraan af te sluiten om deze na het vervangen van de filters weer open te draaien.



Figuur 4.1. Indruk van de tap sampler zoals die toegepast is in Annen en omgeving, de afmeting van de koelkast is ca 60*60*60, en daarmee handzaam om eenvoudig in te zetten.

Locaties

Voor de meetlocaties in het net van Annen waren vier woningen van WLN medewerkers qua logistiek het meest geschikt. (figuur 4.2). Voorafgaand aan het daadwerkelijk plaatsen van de tapsamplers is er met behulp van modelrekeningen beoordeeld hoe goed dit aantal meetpunten en hun locaties in staat waren verontreinigingen te detecteren. Met behulp van Waterleidingmaatschappij Drenthe is het distributienetwerk van pompstation de Bulten in een hydraulisch model opgenomen. Met behulp van het rekenpakket Infoworks zijn vervolgens in de invloedzone van de 4 meetlocaties (ca 2/3^e van het voorzieningsgebied) 50 verontreinigingen gesimuleerd. Aan de hand van de uitkomsten is beoordeeld of de verontreinigingen op één of meerder monsternamen locaties waarneembaar zouden zijn. Dat bleek bij 22 van de 50 verontreinigingen (44%) het geval (zie Bijlage III voor gedetailleerde rapportage). De locaties zijn daarmee geschikt bevonden voor het plaatsen van een tapsampler.



Figuur 4.2. Locaties in de omgeving van Annen waar de tapsamplers aangesloten is geweest en de locatie van het pompstation de Bulten.

Recovery testen

Om op voorhand inzicht te krijgen in de eventuele aanwezigheid van versturende stoffen in het water afkomstig van de te onderzoeken locaties zijn recoverytesten uitgevoerd. Van elk adres is er een grote hoeveelheid water verzameld. Met dit water is in het laboratorium van KWR getest of er afdoening van *E. coli* cellen plaatsvond. Van ieder locatie heeft men 10 liter water overnacht onder vrij verval door filters laten stromen. De filters waren vooraf geënt met bekende hoeveelheid *E. coli* culture. Uit deze test bleek dat er wel enige reductie in vitale *E. coli* cellen optrad maar dat de recovery aanvaardbaar was (tabel 4.1). De resultaten van dit experiment staan hieronder weergegeven.

Tabel 4.1. Indicatie van de recovery van *E. coli* cellen na blootstellen van de cellen aan water afkomstig van de locaties zoals die in deze studie meegedaan hebben.

	Opbrengst (%)	Gem
Locatie 1	70,7%	68,1%
	68,1%	
	65,6%	
Locatie 2	66,8%	77,5%
	100,3%	
	65,6%	
Locatie 3	77,1%	58,3%
	47,6%	
	50,1%	
Pompstation	72,0%	61,3%
	57,8%	
	54,0%	

Uitvoering

In Annen zijn in maart 2012 een viertal tap samplers uitgezet: één op het pompstation de Bulten en een drietal in het voorzieningsgebied van dit pompstation. Alle tapsamplers zijn aangesloten op buitenkranen om eventuele wateroverlast te voorkomen. De monsternamen zijn gedurende de maanden maart t/m mei uitgevoerd door medewerkers van het WLN uit Glimmen.

De monstername heeft plaats gevonden van begin maart tot eind mei 2012, de totale looptijd van het experiment was 12 weken. Dit heeft per locatie geresulteerd in ca. 40 bruikbare monsters. De uitvoering van het monsternameprogramma was voor deze locaties in handen van WLN. De monsternemer plaatste vanaf maandag t/m donderdag de filters waarna deze aansluitend in het laboratorium van WLN onderzocht zijn op de eventuele aanwezigheid van *E. coli* bacteriën. De filters voor pathogeen analyse zijn opgeslagen in de vriezer en na afloop van het meetprogramma naar KWR vervoerd.

Reguliere monstername in de periferie

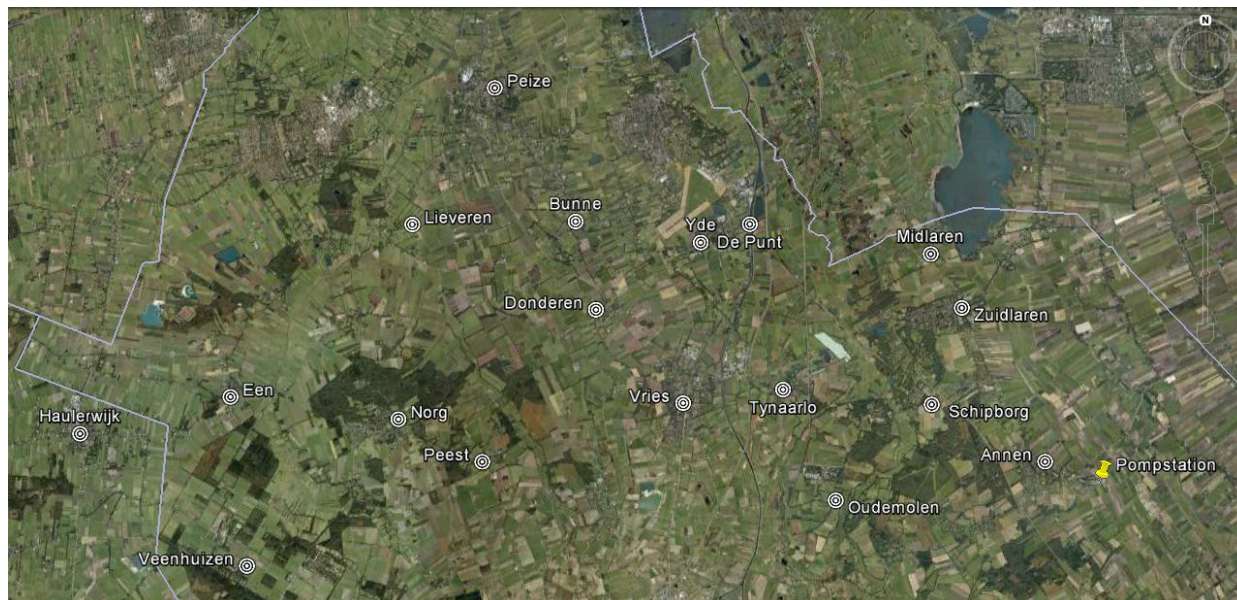
Tijdens het tapsampler onderzoek in Annen zijn in het distributiegebied van pompstation de Bulten ook reguliere monsternames uitgevoerd. De monsternames maakten deel uit van het reguliere monsternameprogramma zoals dat door WLN uitgevoerd wordt voor Waterleidingmaatschappij Drenthe. Op iedere locatie zijn monsters genomen van 100 ml. Elk monster is bij WLN geanalyseerd op de volgende parameters:

- Koloniegetal bij 22° C.
- Verdachte kolonies Coli 37° C.
- Aeromonas
- Aeromonas 37° C.
- Verdachte kolonies Enterokokken, MF
- *E.coli* mbv LSA
- Bacteriën van de coligroep 37° C.
- Enterokokken m.b.v. S&B

De frequentie van de monstername is elke week of één keer per twee weken. Per week worden 6 of 7 locaties bezocht. Gedurende de loop van het tapsampler onderzoek zijn 6 monsternamerondes uitgevoerd.

Locaties reguliere monstername

De reguliere monstername heeft gedurende de drie maanden dat de tapsamplers geplaatst waren plaatsgevonden op 39 unieke locaties in het voorzieningsgebied van pompstation de Bulten. De locaties zijn verdeeld over een twintigtal dorpskernen (zie figuur 4.3).



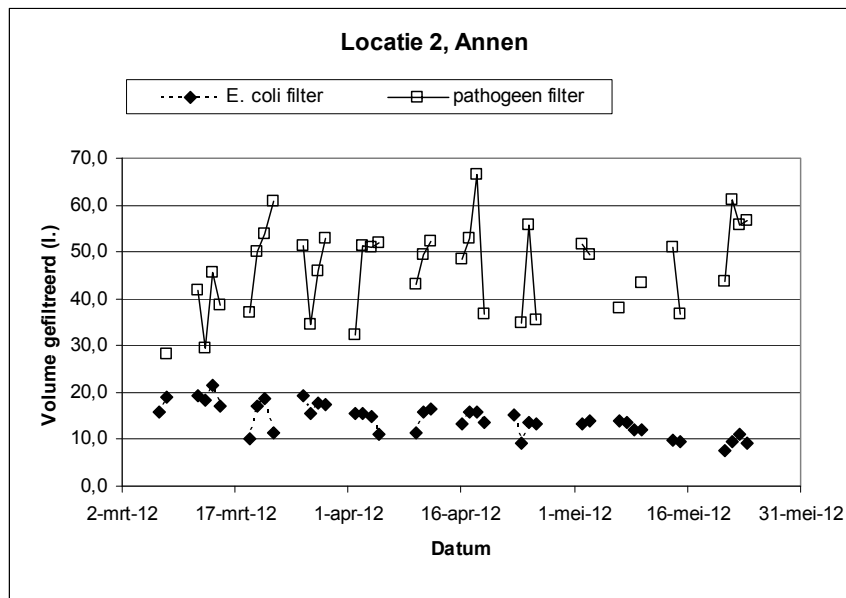
Figuur 4.3. Dorpskernen in de omgeving van Annen waar gedurende het tapsampler onderzoek op regulier basis monsters genomen zijn uit het drinkwaterleidingnet.

4.2 Analyse resultaten

De analyse resultaten bestaan uit diverse gegevens. In eerste plaats is de hoeveelheid water die de filters gepasseerd zijn van belang om in geval van een eventuele opsporing te kunnen calculeren wat de concentratie van een organisme geweest is. Aansluitend zijn gegevens omtrent de aanwezigheid van de doelorganismen van belang; zijn ze wel of niet aanwezig en in welke mate.

Gefiltreerd volume

Door de tap sampler uit te voeren met een drukventiel voor in ieder geval de toevoer naar het *E. coli* filter bleek de flow meer constant te zijn dan het geval was in Amersfoort. Dit betekent dat de opbrengsten per dag en daarmee de opsporingskansen per locatie constanter zijn. De hoeveelheid gefiltreerd water in het *E. coli* filter varieerde van 8 tot ca. 20 liter per etmaal (figuur 4.4). Het gefiltreerde volume water dat het pathogeenfilter gepasseerd heeft was beduidend lager dan de 40 liter die gewent is. Aangezien de toevoer op dit filter niet extra gereguleerd wordt met een drukventiel moet op deze filterhouder de flow goed afgesteld worden met het naaldventiel. Bij uitzondering was de hoeveelheid gefiltreerd water meer dan 70 liter per etmaal. Op de ander locaties is de spreiding in de hoeveelheid gefiltreerd water ruimer; van 3 tot ca. 30 liter per etmaal voor het *E. coli* filter. Een voorbeeld van de variatie van de hoeveelheid watermonster op een monsterlocatie (Annen) is te zien in figuur 4.4.



Figuur 4.4. Gefiltreerde volumes op locatie 2 in Annen.

E.coli

Gedurende de drie maanden dat de tap samplers aangesloten zijn geweest op de buitenkranen (maart t/m mei 2012) zijn er in totaal 164 monsters bruikbare filters gegenereerd (zie tabel 4.2). Alle filters zijn in de laboratoria van WLN geanalyseerd op de aanwezigheid van *E. coli* bacteriën. Eind maart is zowel op filters afkomstig van het pompstation als op filters afkomstig van de locatie Ritmeesterlaan, Zuidlaren een verdachte kolonie aangetroffen. Ter bevestiging of het hier *E. coli* betrof zijn de kolonies nader geanalyseerd met behulp van MALDI-TOF. Het bleek in beide gevallen te gaan om een kolonie van de bacterie *Buttiauxella*, een naar het zich laat aanzien onschuldig bacteriegenus dat in diverse milieus voorkomt (zie kader). En niet duidt op fecale verontreiniging. Op de overige filters zijn geen typische kolonies aangetroffen.

Tabel 4.2 Kentallen *E. coli* meetprogramma tap sampler Annen

Locatie	Aantal monsters	Aantal monsters bruikbaar voor <i>E.coli</i>	Aantal dagen bemonsterd	Totaal volume bemonsterd (l.)
Pompstation	43	43	43	725
Locatie 1	43	40	43	441
Locatie 2	43	41	43	585
Locatie 3	43	40	43	814

Buttiauxella

- Behoort tot de familie van de Enterobacteriën
- Het betreft gram negatieve staafvormigen, met de afmetingen 0.5-0.7 x 2-3 µm, ze zijn beweeglijk bij 36 °C met behulp van meerdere flagellen.
- Er zijn 7 *Buttiauxella* soorten beschreven
- Twee daarvan groeien op LSA (het groeimedium gebruikt voor *E. coli* analyse), het betreft in dit geval waarschijnlijk *B. agrestis* of *B. izardii* (lactose fermentatie)
- Geïsoleerd uit oppervlaktewater, bodems, ingewanden slakken en enkele menselijke monsters, komt ook voor in rauwe melk en kaas.
- Pathogeniteit onbekend, 2 stammen (waaronder *B. agrestis*) geassocieerd met menselijke infecties (wond & blinde darm).

Pathogenen

Uit de totale hoeveelheid beschikbare filters voor pathooganalyse (zie tabel 4.3 voor de kerngetallen) is een keuze gemaakt voor 40 filters die nader onderzocht zijn op de aanwezigheid van pathogenen. Van *Campylobacter*, *Giardia* en Adenovirus 40/41 zijn in geen van de 40 monsters positieve resultaten verkregen. Van *E. coli* O157:H7 is in de eerste analyseronde 1 monster positief bevonden. Van *Cryptosporidium* bleken 11 monsters na eerste analyse een positief resultaat te geven. Na heranalyse van de 11 monsters bleken alle monsters negatief te zijn. Bij het positieve *E. coli* O157 monster is opnieuw een analyse met stx1 en stx2 uitgevoerd (beide doelgenen coderen voor de toxische stof die *E. coli* O157 aanmaakt). Ook voor dit monster bleek dat niet opnieuw een positief resultaat aangetroffen werd. Daarom zijn de monsters voor alle referentie-pathogenen als negatief gerapporteerd.

Tijdens de isolatie is in de lysisbuffer bij elk monster een interne controle toegevoegd. Dit interne controle DNA fragment is ook met qPCR geanalyseerd. Het resultaat van de interne controle geeft voor elk monster kwantitatief inzicht in het rendement van de opwerking en het mogelijk optreden van remming van de qPCR reactie. Het rendement van de interne controle is gebruikt om de metingen van de onderzochte organismen te corrigeren. De monsters afkomstig van de tapsampler in Annen hadden een gemiddelde opbrengst van 23,1% (range 0,0 - 41,8%). Het gemiddelde gefiltreerde volume op deze locatie is 42,3 liter (range 6,4-62,5 liter). De gemiddelde detectie limiet voor Annen is 10 gen kopieën per liter.

Tabel 4.3 Kentallen referentie-pathogenen meetprogramma tap sampler Annen.

Locatie	Aantal monsters	Aantal monsters onderzocht op pathogenen	Aantal dagen bemonsterd	Totaal volume bemonsterd (l.)
Pompstation	39	10	43	1479
Locatie 1	41	10	43	1743
Locatie 2	37	10	43	1720
Locatie 3	36	10	43	1772

Reguliere monstername

Veel van de analyses die uitgevoerd zijn in het kader van de reguliere monstername geven geen positief resultaat (tabel 4.4). Een enkele maal zijn de aantallen *Aeromonas* verhoogd, met een maximum van 570 kve/100 ml in het dorp Donderen in eind mei 2012. In de week van 8 mei 2012 zijn op alle monsternamelocaties de koloniegetallen bij 22°C. verhoogd. Er zijn geen *E. coli*, bacteriën van de coligroep of (verdachte) enterococcen aangetroffen in de meetperiode in het net van Annen.

Tabel 4.4. Resultaten van reguliere monsternamen in distributiegebied van pompstation de Bulten.

Periferie		Koloniegetal bij 22 C	Verd.kol. Coli 37 C	Aeromonas	Aeromonas 37 graden C	Verd.kol. Enterokok., MF	E.coli mbv LSA	Bact. van de colligr. 37 C	Enterokok. mbv S&B	ondergrens
		kve/ml	kve/100ml							kve/l
Lieveren, Zwarteweg 3	13-3-2012		0				0	0		10
De Punt, Ydermade 4	22-3-2012		0				0	0		10
Oudemolen, Linthorst Homanweg 1	22-3-2012		0				0	0		10
Schipborg, Holle Drift 79	22-3-2012		0				0	0		10
Veenhuizen, Hoofdweg 120	22-3-2012		0				0	0		10
Vries, De Fledders 12	22-3-2012		0				0	0		10
Vries, Kanaaldijk 11	22-3-2012		0				0	0		10
De Punt, Kanaaldijk 11	11-4-2012		0				0	0		10
Een, Verlengde Scheidingsweg 60	11-4-2012		0				0	0		10
Haulerwijk, Rolpaal 1	11-4-2012		0				0	0		10
Vries, Heidenheim 9	11-4-2012		0				0	0		10
Vries, Soltstede 33	11-4-2012		0			0	0	0	0	10
Midlaren, Tolhuisweg 30	12-4-2012		0	60			0	0		10
Zuidlaren, Meerzicht 1	12-4-2012		0				0	0		10
Annen, De Bulten 6 (dressuurstal)	17-4-2012		0				0	0		10
Donderen, Roozand 2	17-4-2012		0				0	0		10
Yde, Norgeweg 159	17-4-2012		0				0	0		10
Een, Haulerwijksterweg 28	18-4-2012		0				0	0		10
Norg, Asserstraat 46 (Kregel)	18-4-2012		0				0	0		10
Norg, Oosteind 33 (café Zwaneveld)	18-4-2012		0				0	0		10
Veenhuizen, Bieuwweg 6	24-4-2012		0	140			0	0		10
Veenhuizen, Kolonievvaart 16	24-4-2012		0				0	0		10
Annen, Annermoeras 6	25-4-2012		0				0	0		10
Annen, De Hullen 16	25-4-2012		0				0	0		10
Bunne, Bongveenweg 4	25-4-2012		0				0	0		10
Vries, Eswal 5	25-4-2012		0				0	0		10
Zuidlaren, De Knijpe 3	25-4-2012		0				0	0		10
Anloo, Schipborgerweg (school)	8-5-2012	7	0				0	0		10
Annen, Spijkerboorsdijk	8-5-2012	228	0				0	0		10
Peest, Langelaan 2	8-5-2012	6	0				0	0		10
Peize, Rietweg 20	8-5-2012	6	0				0	0		10
Tynaarlo, Eisenbroeken 1	8-5-2012	8	0				0	0		10
Tynaarlo, Vriezerweg (manege Dolfing)	8-5-2012	7	0				0	0		10
Veenhuizen, Bankenbosweg (portiersloge)	8-5-2012	101	0				0	0		10
Schipborg, Holle Drift 88	22-5-2012		0				0	0		10
De Punt, Ydermade 5	23-5-2012		0				0	0		10
Donderen, Roozand 2	23-5-2012			570	1					10
Oudemolen, Linthorst Homanweg 1	23-5-2012		0				0	0		10
Veenhuizen, Dominee Germsweg 17	23-5-2012		0				0	0		10
Vries, De Fledders 6	23-5-2012		0				0	0		10
Vries, Kanaaldijk 11	23-5-2012		0				0	0		10

4.3 Uitkomsten

Toepasbaarheid tap sampler

De aanpassingen van de tapsamplers (drukventiel en inbouwen in koelkastjes) hebben ertoe geleid dat de flow over de *E. coli* filters veel beter te reguleren valt. Hiermee is de continuïteit in monsternamen genomen. Het monstervolume over het pathogeenfilter verdient nog aandacht. De plaatsing in de koelkast heeft de bemonstering ongevoelig gemaakt voor de omgevingstemperatuur en voorkomt afsterving van de bemonsterde micro-organismen.

Locatiekeuze

In dit onderzoek was de locatiekeuze bepaald door de logistiek. Met bekende monsterlocaties kan de pakkans van verontreinigingen onderzocht worden met een simulatiestudie (zie Bijlage III). Als de locaties niet vast staan kan een optimalisatieprogramma zoals TEVA-SPOT worden toegepast.

Risico fecale verontreiniging

Met behulp van de inzet van de tapsamplers in Annen zijn in totaal 164 monsters genomen. In geen van de monsters is met behulp van de kweekmethodiek een positief resultaat voor *E. coli* aangetroffen. Wel zijn er op de filters verdachte kolonies aangetroffen, die bij nadere analyse *Butauiella* (m.b.v. Maldi-TOF) bleken te zijn. Aan drinkwaterbedrijven wordt in dergelijke gevallen teruggemeld dat er coliformen in het distributienet zijn aangetroffen. De bedrijven ondernemen in de regel de acties die ze moeten doen indien er coliformen worden aangetroffen. Dat komt neer op herbemonsteren nadat de leiding gespoeld is. Omdat het hier niet om *E. coli* gaat wordt er geen kookadvies afgegeven of gedesinfecteerd.

Het niet aantreffen van *E. coli* duidt erop dat er tijdens de monsterdagen geen verontreinigingen in het distributienet van Annen "bovenstrooms: van de meetlocaties hebben plaatsgevonden. Bovendien betekent dit dat er ook tijdens vervanging van de filters en vervoer van en naar het laboratorium geen verontreiniging opgetreden is. Blijkbaar is de inzet van de tapsampler niet gevoelig voor verontreiniging van buitenaf.

Het feit dat er geen *E. coli* aangetroffen is zegt wel iets over de waterkwaliteit. Het betekent namelijk dat er per week minder dan één *E. coli* aanwezig is in 160 liter water (4 samplers, 4 dagen lang, 10 l. per dag). Gedurende de reguliere monsternamen rondes is tijdens de duur van het onderzoek totaal 41 keer in het leidingnet bemonsterd, totaal 4,1 liter.

Afgezien van het verschil in monsternamenvolume tussen reguliere monsternamen en het tap sample onderzoek speelt het continu meten een belangrijke rol. Binnen het tijdsbestek van het onderzoek (ca. 3 maanden) is er gedurende het tap sample onderzoek 164 keer een monster geanalyseerd op 4 locaties in een beperkt deel van het distributienet van PS de Bulten, Annen. Deze monsters zijn verzameld gedurende 24 uur monsternamerondes. De reguliere monsternamen zijn over het algemeen een momentopname. In bijlage III is een simulatieberekening uitgevoerd voor de situatie in het distributienet van Annen. Uit de berekeningen blijkt dat met de tap sample aanpak de kans op detectie van een verontreiniging met een factor 65 toeneemt.

De 40 monsters die onderzocht zijn op de aanwezigheid van pathogenen hebben geen positief resultaat opgeleverd. Dit betekent in ieder geval dat pathogenen niet zijn voorgekomen in afwezigheid van *E. coli*. Het relateren van concentraties van pathogenen aan het indicatororganisme *E. coli* is daarmee niet mogelijk.

Gedurende het tapsampler meetprogramma zijn elders in het distributienet van pompstation de Bulten 41 monsters genomen van ieder 100 ml. Er zijn daarin geen indicatoren voor fecale verontreiniging aangetroffen. In enkele van de monsters zijn *Aeromonas* aangetroffen en enkele keren het koloniegetal bij 22 ° verhoogd aangetroffen. Ten tijde van deze waarnemingen is in de tapsamplemonsters geen *E. coli* en/of pathogeen aangetroffen.

5 Ingrepen

5.1 Methode

Ten tijde van de plaatsing van de tapsamplers in de omgeving van Annen werden in het distributiegebied eveneens reparatiewerkzaamheden verricht aan het distributienet. De reparaties werden uitgevoerd op één tot enkele kilometers vanaf de monstername locaties (zie figuur 5.1). Rondom de werkzaamheden werd gewerkt volgens de huidige protocollen zoals die opgenomen zijn in de Hygiëncode distributie. Desondanks is een ingreep altijd een risico op verontreiniging. Vandaar dat het nuttig is om onderzoeksgegevens rondom de reparaties en in de tapsampler units naast elkaar te leggen.



Figuur 5.1. Locaties in de omgeving Annen waar tijdens de uitvoering van het onderzoek reparaties uitgevoerd zijn.

Locaties

De meeste locaties waar de werkzaamheden plaatsvonden zijn in de omgeving van het monsternamepunt Ritmeesterlaan in Zuid Laren. De aard van de werkzaamheden en de datum waarop deze plaatsvonden is weergegeven in tabel 5.1.

Tabel 5.1. Overzicht van locaties waar reparaties uitgevoerd zijn ten tijde van het tap sample onderzoek.

Datum	Adres	Plaats	Type ingreep	Type leiding
22-3-2012	Havenstraat	Zuidlaren	1 = nieuwe leiding	Hoofdleiding
26-3-2012	Oude Zeegserweg BRKR 735	Zuidlaren	3 = reparatie	Hoofdleiding
27-3-2012	Schapendrift 19	Zeegse	1 = nieuwe leiding	Hoofdleiding
2-4-2012	Schapendrift 19 BRKR 358	Zeegse	1 = nieuwe leiding	Hoofdleiding
12-4-2012	Kerkbrink	Zuidlaren	2 = inbouw	Hoofdleiding
17-4-2012	Groningerstraat	Zuidlaren	4 = wijziging	Hoofdleiding
19-4-2012	Telefoonstraat BRKR 789	Zuidlaren	2 = inbouw	Hoofdleiding

Analyses op locatie

Rondom deze werkzaamheden zijn analyses uitgevoerd in water dat ter plaatse afgetapt is. Het water is geanalyseerd op:

- de aanwezigheid van bacteriën v/d coligroep,
- verdachte kolonies 37 C,
- *E. coli* m.b.v. LSA,
- enterokokken m.b.v. S&B methode
- verdachte kolonies met MF

Modelberekening

Om te beoordelen of water dat verontreinigd zou zijn tijdens de werkzaamheden in een van de tap sampler meetlocaties terecht kan komen is een aanvullende modelstudie uitgevoerd met behulp van het rekenpakket Infoworks. In de modelstudie is per reparatielocatie gesimuleerd dat er op de reparatielocatie een verontreiniging heeft plaatsgevonden. Aansluitend is bekeken of zo'n theoretische verontreiniging op een van de tapsampler-locaties terecht zou kunnen komen.

Met behulp van de tapsamplers is er in het voorzieningsgebied van pompstation de Bulten op drie vaste meetlocaties met de tap sampler (semi-)continu bemonsterd. De drie monsterlocaties met bijbehorende modelknopen zijn:

- Locatie 1, Annen (AN_3157)
- Locatie 2, Zeegse (AN_2203)
- Locatie 3, Zuidlaren (AN_1557)

Er zijn in totaal zeven locaties van reparatie bekend die aan de dichtstbijzijnde modelknoop zijn gekoppeld; zie tabel 5.2. Op één locatie heeft twee maal een reparatie plaatsgevonden zodat er zes unieke locaties overblijven. Vanuit deze zes locaties is een fictieve verontreiniging van 10 liter per uur gesimuleerd gedurende 16 uur (van 1 feb 2011 van 0:00 tot 16:00 u).

Tabel 5.2. Reparatielocaties; potentiële bronlocaties van verontreiniging

Datum	Locatie	x-coord	y-coord	knoop	bron
22-3-2012	Havenstraat 16, Zuidlaren	242441	568731	AN_1140	_b60
26-3-2012	Oude Zeegserweg 8, Zuidlaren	240897	566965	AN_1875	_b61
27-3-2012	Schapendrift 19, Zeegse	241799	566981	AN_2307	_b62
2-4-2012	Schapendrift 19, Zeegse	241799	566981	AN_2307	_b62
12-4-2012	Kerkbrink 42, Zuidlaren	242126	568555	AN_1163	_b63
17-4-2012	Groningerstraat 34-D, Zuidlaren	241957	569330	AN_4429	_b64
19-4-2012	Telefoonstraat 35, Zuidlaren	241737	568403	AN_1275	_b65

5.2 Analyse resultaten

Op locatie

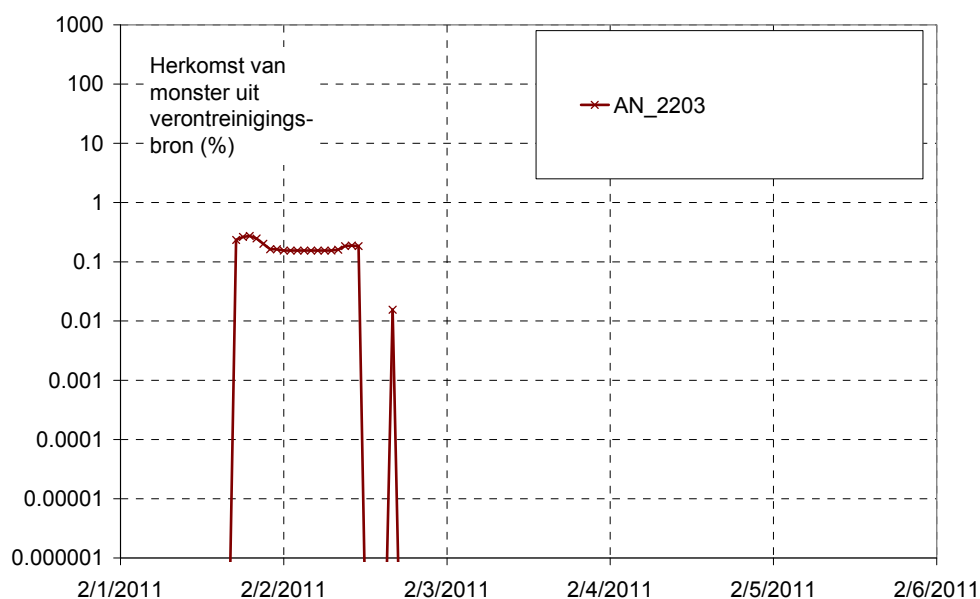
Op geen van de reparatielocaties zijn bij controle na de werkzaamheden positieve kweekresultaten aangetroffen (tabel 5.3).

Tabel 5.3. Analyseresultaten op de locaties van de ingrepen, alle parameters zijn uitgedrukt in kve/100ml.

Datum	Plaats	Adres	Verd. kol. Coli 37 C	Verd. kol. enterokok., MF	E.coli m.b.v. ISA	Bact. van de coligr 37 C	enterokok. m.b.v. S&B
22-3-2012	Zuidlaren	Havenstraat	0	0	0	0	0
26-3-2012	Zuidlaren	Oude Zeegserweg BRKR 735	0	0	0	0	0
27-3-2012	Zeegse	Schapendrift 19	0	0	0	0	0
2-4-2012	Zeegse	Schapendrift 19 BRKR 358	0	0	0	0	0
12-4-2012	Zuidlaren	Kerkbrink	0	0	0	0	0
17-4-2012	Zuidlaren	Groningerstraat	0	0	0	0	0
19-4-2012	Zuidlaren	Telefoonstraat BRKR 789	0	0	0	0	0

Tapsampler

Uit berekeningen met behulp van het programma Infoworks bleek dat water dat de Schapendrift in Zeegse passeert mogelijk terecht komt bij de tapsampler zoals die gestationeerd was op locatie 2 (zie figuur 5.2). Een eventuele verontreiniging op de reparatielocatie zou circa 16 uur later voor een positief resultaat op locatie 2 kunnen zorgen. Zowel voorafgaand als tijdens de reparatie zijn op locatie 2 monsters genomen met behulp van de tapsampler. Analyseresultaten van deze locatie van zowel tijdens als na de reparatiewerkzaamheden laten geen positief *E. coli* resultaat zien (tabel 5.4). Er zijn op locatie 2 ten tijde van de werkzaamheden ook geen pathogenen aangetroffen. De reparaties hebben niet bijgedragen aan een aantoonbare vervuiling van het distributienetwerk.



Figuur 5.2. Een theoretische verontreiniging op de Schapendrift (Zeegse) zorgt voor doorbraakkrommes op de monsternamelocatie 2, Zeegse (AN2203).

Tabel 5.4. Resultaten van de tap sampler op locatie 2 ten tijde en na reparatiewerkzaamheden op de Schapendrift, Zeegse.

monstername locatie	datum start	start tijd	eind tijd (volg. dag)	<i>E. coli</i> (kve / 100ml)	pathogenen (DNA kopieën / ml)
Locatie 2, Zeegse	27-3-2012	9:50	9:50	0	ND*
Locatie 2, Zeegse	28-3-2012	9:55	9:35	0	ND*
Locatie 2, Zeegse	29-3-2012	9:43	9:20	0	ND*
Locatie 2, Zeegse	2-4-2012	9:50	9:45	0	ND*
Locatie 2, Zeegse	3-4-2012	9:50	9:20	0	ND*
Locatie 2, Zeegse	4-4-2012	9:30	9:50	0	ND*

ND = niet gedetecteerd

Ingrepen en reguliere monstername

Op het moment dat in het voorzieningsgebied van pompstation de Bulten werkzaamheden uitgevoerd werden zijn op diverse locaties ook monsternames uitgevoerd ten behoeve van het reguliere monsternameprogramma. Zoals in tabel 5.5 getoond wordt is er op geen van de reguliere monstername locaties sprake van enige verhoging van de onderzochte parameters. In de tabel zijn alleen de resultaten opgenomen van die monsternamelocaties die maximaal op ca. 5 km afstand van de ingrepen gelegen zijn.

In Midlaren is wel een kleine verhoogde concentratie *Aeromonas* aangetroffen. Deze is echter niet indicatief voor fecale verontreiniging.

Tabel 5.5. Resultaten van reguliere monsternames ten tijd van de ingrepen in het distributienetwerk van pompstation de Bulten. De reguliere monsternamepunten bevinden zich in een straal van ca. 5 km vanaf de ingreeplocatie.

Werkzaamheden			Reguliere monstername			Verd.kol. Coli 37 C	Aeromonas	Aeromonas 37 graden C	Koloniegetal bij 22 C	Verd.kol. Enterokok., MF	E.coli mbv LSA	Bact. van de coligr. 37 C	Enterokok. mbv S&B	ondergrens
Adres	Plaats	Datum	Adres	Plaats	Datum	kve/100ml							kve/l	
Havenstraat	Zuidlaren	22-3-2012	Ydermade	De Punt	22-3-2012	0	0	0	0	0	0	0	0	10
			Linthorst Homanweg	Oudemolen	22-3-2012	0	0	0	0	0	0	0	0	10
			Holle Drift	Schipborg	22-3-2012	0	0	0	0	0	0	0	0	10
Kerkbrink	Zuidlaren	12-4-2012	Kanaaldijk	De Punt	11-4-2012	0	0	0	0	0	0	0	10	
			Tolhuisweg	Midlaren	12-4-2012	0	60	0	0	0	0	0	0	10
			Meerzicht	Zuidlaren	12-4-2012	0	0	0	0	0	0	0	0	10
Groningerstraat	Zuidlaren	17-4-2012	De Bulten	Annen	17-4-2012	0	0	0	0	0	0	0	10	

6 Discussie

In dit rapport is de ontwikkeling gerapporteerd van een meetstrategie en bemonsteringsmethode (de tap sampler) voor een meetprogramma met een zo hoog mogelijke pakkans voor fecale verontreiniging van het drinkwater distributienet. Deze strategie en methode zijn getest in het laboratorium en verder ontwikkeld in veldonderzoek van een tweetal pompstations: PS Hogeweg in Amersfoort en PS de Bulten in Annen (Drenthe). Doel van het veldonderzoek was het bestuderen van de frequentie en mate van verontreiniging van het drinkwater distributie netwerk aan de hand van metingen van kweekbare *E. coli* en van de gezondheidskundige betekenis aan de hand van metingen van referentiepathogenen.

Meetstrategie en methode

Uit vooronderzoek kwam naar voren dat vanwege het kortdurende en plaatselijke karakter van verontreinigingen niet vergroting van het monstervolume maar vergroting van de meetfrequentie de geëigende aanpak is voor het vergroten van de pakkans. Er is voor dit onderzoek een nieuwe bemonsteringsopstelling ontwikkeld om continu water uit het distributienet te kunnen bemonsteren, de tap sampler. Deze opstelling is aan te sluiten op een (buiten)kraan en bevatte twee filterhouders die tegelijkertijd monsters nemen voor (kweekbare) *E. coli* en voor de referentiepathogenen (*Campylobacter*, *EHEC*, Adenovirus 40/41, *Cryptosporidium*, *Giardia*). De tap sampler is eerst in het laboratorium getest op betrouwbaarheid en op recovery van de micro-organismen. De opbrengst was hoog (gemiddeld 91%). Bij inzet van de tap sampler in het veldonderzoek bleek de opbrengst in het veld lager (ca 30%). De recovery van de tap sample methode is mede afhankelijk van het achterliggende (binnen)leidingmateriaal. Per monsternamelocatie is de recovery bepaald, die bleek uiteenlopend.

Voor het efficiënt inzetten van de tap sampler is een goede locatiekeuze belangrijk. In deze onderzoeksfase was de logistiek van het onderzoek daarbij een belangrijke afweging, en zijn de meetlocaties bepaald door de woningen van medewerkers van KWR in het voorzieningsgebied van PS Hogeweg en door medewerkers van WLN in het voorzieningsgebied van PS de Bulten. Maar voor een goede locatiekeuze is vooral belangrijk of de gekozen locaties een meetnet opleveren met een zo groot mogelijke pakkans voor verontreinigingen die ergens in het net kunnen ontstaan. Voorafgaand aan het onderzoek in Annen zijn met behulp van Infoworks berekeningen uitgevoerd van de pakkans van verontreinigingen van de tap samplers op de gekozen locaties. De berekeningen lieten zien dat in geval van verontreiniging in de "invloedssfeer" van de tap samplers de kans op detectie door het tap sampler meetprogramma veel groter (44%) was dan het wettelijke meetnet (0,67%). De resultaten (geen *E. coli* met zowel de tap sampler als in de reguliere 100 ml monsters) maken echte verificatie van deze berekeningen of een werkelijke kwantitatieve vergelijking tussen reguliere en tap sampler meetprogramma niet mogelijk. Blijft wel de conclusie dat met de tap sampler veel gevoeliger is gemeten en ook daarmee geen sporen van fecale verontreiniging zijn gevonden.

Voor nieuw te ontwerpen meetprogramma's met de tap sampler kan de aanpak met Infoworks gevolgd worden om het optimale aantal en locaties voor de tap sampler te bepalen. Het plaatsen van tap samplers op dergelijke locaties doet de kans op opsporen van verontreinigingen sterk toenemen (zie bijlage III). Met behulp van Infoworks kunnen de meest belangrijke knooppunten in beeld gebracht worden en proactief naar geschikte locaties gezocht worden waar het beste de samplers geplaatst kunnen worden.

De tap sampler heeft ook toegevoegde waarde tijdens fecale verontreinigingen van het net, of deze nu geconstateerd zijn door het aantreffen van *E. coli* of enterococci in het net of als een verontreiniging verwacht kan worden zoals bij wegvallen van de waterdruk, bij leidingbreuk, bij reparaties of andere situaties waarbij de hydraulische en/of structurele integriteit van het net aangetast worden. In dergelijke situaties kan met de tap sampler gevoelig vastgesteld worden of de fecale verontreiniging (nog) aanwezig is en of er al dan niet daadwerkelijk pathogene micro-organismen in het net worden aangetroffen. Ook helpt dit bij de bronopsporing: onderzoek naar de humane Adenovirussen geeft aan of de verontreiniging van menselijke oorsprong is. Plaatsing van de tap sampler bij de getroffen locatie in het net en het naliggende voorzieningsgebied geeft dus gevoelige en extra informatie over de aanwezigheid van een gezondheidsrisico en de verontreinigingsbron.

Risico fecale verontreiniging distributienet

In beide veldonderzoeken zijn geen *E. coli* bacteriën gedetecteerd. Wel zijn er in een aantal gevallen bacteriën aangetroffen die geen *E. coli* bleken te zijn. Deze bevinding toont aan dat de tap sampler in staat is om bacteriën uit het netwerk te detecteren. Ook bij de reguliere monsternamen in hetzelfde distributie gebied zijn geen sporen van fecale verontreiniging aangetroffen. Ook ten tijde van werkzaamheden zijn geen fecale verontreinigingen aangetroffen met behulp van de tapsampler en met behulp van de reguliere controlemonsters. Onderzoek van de pathogeenfilters met PCR heeft geen pathogenen aangetoond. Dit betekent dat ook met een veel gevoeliger meetprogramma dat (semi-) continu de waterkwaliteit in het distributienet bewaakt geen sporen van fecale verontreiniging zijn aangetroffen. Ook de reparaties in de “invloedsfeer” van de meetlocaties gaven geen verontreiniging te zien. Datzelfde geldt voor de beide pompstations; ook in het water af pompstation werden geen sporen van een fecale verontreiniging aangetroffen. Hier is de normale meetfrequentie eens per maand en was dit onderzoek dus een veel gevoeliger meetprogramma.

Hoe verhoudt het resultaat van dit onderzoek zich nu tot het wettelijk meetprogramma? Met beide is in de onderzoeksperiode in beide veldonderzoeken geen aanwijzing voor een fecale verontreiniging gevonden. In de eerdere inventarisatie van meerjaren *E. coli* meetgegevens uit veel Nederlandse distributienetten bleek dat ca 1 op de 300 monsters van 100 ml drinkwater uit woningen thermotolerante bacteriën van de coligroep bevatte. Hoewel uit zo'n gemiddelde geen specifieke verwachting kan worden opgesteld voor een specifiek distributienet, lijken de processen die kunnen leiden tot verontreiniging van het net in Annen en Amersfoort en ook de netten zelf niet wezenlijk anders dan andere netten. Het niet aantreffen van sporen van fecale verontreiniging met dit veel gevoeliger tap sampler meetprogramma is in ieder geval een duidelijke aanwijzing dat er in de twee onderzochte distributienetten niet frequent verontreinigingen optreden die door het ongevoelige wettelijke meetprogramma niet worden gezien. En hoewel het maar twee (delen van) distributienetten betreft, levert dit onderzoek een sterkere onderbouwing van de veiligheid van distributie van drinkwater in Nederland.

Het vergelijken van het beeld uit de landelijke inventarisatie van de resultaten van het wettelijk meetprogramma (1 op de 300 drinkwatermonsters uit woningen toont sporen van fecale verontreiniging) met het beeld uit dit onderzoek (een gevoelig meetnet met hoge pakkans voor fecale verontreinigingen toont geen sporen van fecale verontreiniging in een periode van 3 maanden in twee distributienetten) is lastig. Maar de vergelijking levert wel de suggestie dat het wettelijke meetprogramma, met zijn lage pakkans, verhoudingsgewijs vaak sporen van fecale verontreiniging tegenkomt. In veel van de reguliere bemonsteringen waar een positief analyse resultaat aangetroffen is, is sprake van een enkele kolonievormende eenheid. Er valt niet uit te sluiten dat dergelijke waarnemingen het gevolg zijn van contaminaties tijdens de bemonstering en/of de laboratoriumanalyse. Vandaar de praktijk van het nemen van herhalingsmonsters, die overigens wel meer op basis van de kennis van de hydraulica van het net genomen zouden mogen worden (waar in het net bevindt zich het water dat gisteren verontreinigd was?) .

Het niet aantreffen van die indicatororganismen betekent dat met grotere zekerheid gesteld kan worden dat verontreinigingen minder frequent voorkomen dan verwacht mag worden op basis van de reguliere monsternames zoals beschreven in Lieverloo *et al.* (2006; 2007). Dit houdt in dat het infectierisico als gevolg van distributie in deze studies mogelijk overschat is.

Pathogenenonderzoek met PCR

In dit onderzoek is op 76 monsters een qPCR analyse uitgevoerd waarin gescreend is naar de aanwezigheid van de organismen enterohemorragische *E. coli*, *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *Giardia* en Adenovirus 40/41. Een aantal monsters zoals die verzameld zijn in Amersfoort reageerden positief op de qPCR analyse van *Cryptosporidium*. Na heranalyse zijn geen positieve resultaten meer gevonden. Ook in een aantal monsters afkomstig uit Annen werden enkele DNA kopieën van *Cryptosporidium* aangetroffen en één positief resultaat voor *E. coli* O157:H7. Ook de heranalyse van deze monsters leverde geen nieuw positief resultaat op. Bij deze positieve resultaten dienen een aantal kanttekeningen geplaatst te worden:

1. slechts 1 analyse van de duplo's bleek positief;
2. alle positieve resultaten gaven een laag aantal DNA kopieën/1.;

3. de toegepaste PCR analyse is betrekkelijk nieuw; de bredere toepassing op drinkwatermonsters is voor het eerst binnen dit project uitgevoerd;
4. er zijn wel PCR blanco's ingezet maar er zijn niet bij elke serie blanco monsters meegenomen;
5. het valt niet uit te sluiten dat de enkelvoudig positieve resultaten het gevolg zijn van laboratoriumbesmettingen.

Voor de inzet van qPCR in dergelijke situaties wordt aanbevolen:

1. test bij positieve monsters of dit reproduceerbaar is (opnieuw testen zelfde monster);
2. neem bij elke serie blanco monsters mee;
3. beoordeel welke hoeveelheid DNA kopieën men nog daadwerkelijk relateert aan de aanwezigheid van pathogene micro-organismen.

Vanwege het niet aangetoond hebben van pathogene organismen en het uitblijven van positieve *E. coli* kweekresultaten kan er in dit onderzoek geen relatie gelegd worden tussen de aanwezigheid van indicatororganismen en pathogenen in drinkwater. Dergelijke verhoudingen zijn eerder wel vastgesteld voor afval- en oppervlaktewater (van Lieverloo *et al.*, 2007). Voor het duiden van de gezondheidskundige betekenis van verontreinigingen in het distributienet is deze kennis wel van belang. Als *E. coli* wordt aangetroffen in het net kan de verontreiniging van verschillende oorsprong zijn (rioolwater, dierlijke mest, oppervlaktewater e.d.) met een verschillend gehalte aan pathogenen en dus gezondheidsrisico. Het nader onderzoeken van een dergelijke verhouding zou op twee manieren uitgevoerd kunnen worden:

1. Gerichte monsternamen in geval van een positieve *E. coli* kweek. In geval van een positieve *E. coli* test in het reguliere monsternamenprogramma zou bij herbemonstering eveneens een extra monster genomen kunnen worden om te testen op de aanwezigheid van pathogenen.
2. Tijdens reguliere monsternamen zou gedurende een periode van enkele maanden per locatie een tweetal monsters genomen kunnen worden, waarvan één monster bewaard wordt tot na de uitslag van het *E. coli* onderzoek. Indien de *E. coli* analyse positief is zou direct het extra monster in behandeling genomen moeten worden en met behulp van DNA analyse gescreend moeten worden op de aanwezigheid van pathogene organismen.

In de onderzoeksprogramma's van het BTO 2013 zal in ieder geval aandacht bestaan voor dergelijke verhoudingen in grondwater en water dat tijdens ingrepen mogelijk in het distributienet terecht kan komen.

7 Implementatie en aanbevelingen

1. De ontwikkelde meetstrategie en bemonsteringsmethode zijn geschikt voor toepassing in het veld. Drinkwaterbedrijven en -laboratoria kunnen de tap sampler inzetten voor onderzoek van de veiligheid van hun distributienet.
2. De tap sampler is direct inzetbaar. Bij het inrichten van monsternamelocaties dient inzicht in de recovery van de methode op de locatie verkregen te worden.
3. Voor de keuze van de meetlocaties kan de aanpak zoals in dit project verder is ontwikkeld met het modelleren van de pakkans van verontreinigingen met behulp van het modelleerprogramma Infoworks (TEVAspot) worden toegepast.
4. Gezien het niet aantreffen van sporen van fecale verontreiniging in het distributienet van Amersfoort en Annen lijkt reproduceren van dit onderzoek op meer locaties niet efficiënt.
5. De tap sampler leent zich beter voor gericht onderzoek naar de veiligheid van distributie van drinkwater, zoals bij verontreinigingen, calamiteiten of ingrepen. De tap sampler zou ingezet kunnen worden op strategische locaties na het aantreffen van *E. coli* in het reguliere monsternameprogramma, calamiteiten en ingrepen. Gevoelige herbemonstering met de tap sampler op een geselecteerd aantal locaties geeft snel een beeld van de mate en verspreiding van een verontreiniging en faciliteert het analyseren van de aanwezigheid van pathogenen en het opsporen van de verontreinigingsbron. Dergelijk onderzoek zou uitgevoerd kunnen worden bij de drinkwaterlaboratoria.
6. In geval van ingrepen aan het distributienet kan de tap sampler benedenstrooms van de werkzaamheden ingezet worden om het hygiënisch werken te verifiëren.
7. Met betrekking tot de detectie van pathogenen met qPCR zal door zorgvuldige kwaliteitsborging nader beoordeeld moeten worden wat de betekenis van positieve resultaten is.

Referenties

- Anonymus (2001) Waterleidingbesluit. Staatsblad van het Koninkrijk der Nederlanden 2001, nr. 31.
- Anonymus (2010) Kraantjeswater Hemiksem en Schelle voldoet niet aan norm. Gazet van Antwerpen 09/12/'10
- Anonymus (2010) Vervuiling kraantjeswater mogelijk te wijten aan brandweermateriaal. NIEUWSBLAD.BE 17 / 12 / '10.
- Anonymus (2011) Drinkwaterbesluit. Staatsblad van het Koninkrijk der Nederlanden 2011, nr. 293.
- Besner, M.C., Prevost, M. Regli, S. (2011) Assessing the public health risk of microbial intrusion events in distribution systems: conceptual model, available data and challenges. *Water Research*, 45:961-979.
- Beuken, R., Lavooij, K., Bosch, A., Schaap, P. (2006) Low leakage in the Netherlands confirmed. Water Distribution System Analysis conference, Cincinnati, USA.
- Blokker, E.J.M., Vogelaar, A., Medema, G.J. (2009) Optimalisatie meetprogramma *Escherichia coli* in distributienet. Report BTO 2009.008, KWR, Nieuwegein, Netherlands (in Dutch).
- Craun, G.F., Calderon, R.L. (2001) Waterborne disease outbreaks caused by distribution system deficiencies. *Journal of the American Water Works Association*, 93, 9, 64-75.
- Fernandes, T.M., Schout C., De Roda Husman A.M., Eilander A., Vennema H., van Duynhoven Y.T. (2007) Gastroenteritis associated with accidental contamination of drinking water with partially treated water. *Epidemiology and Infection*, 135, 5, 818-826.
- Fricker C. R., Warden P.S., DeSarno M., Eldred, B.J. (2010) Significance of methods and sample volumes for *E. coli* ant total coliforms Measurements. Report Water research Foundation ISBN 978-1-60573-119-3.
- Hamsch, B., Böckle K., Van Lieveloo H.M. (2007) Incidence of faecal contamination in chlorinated and non-chlorinated distribution systems of neighbouring European countries. *Journal of Water and Health* 5:119-130.
- Heijnen, L. (2011) Virusverwijdering door drinkwaterzuiveringsprocessen; de waarde van somatische fagen, F-specifieke fagen en adenovirussen. BTO rapport 2011.010.
- Heijnen, L. (2013) Kwantitatieve PCR methode voor detectie van menspathogene *Cryptosporidium* en *Giardia*. BTO rapport 2013.XX, in prep.
- Heijnen, L., Medema, G. (2006) Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *Journal of Water and Health* 4:487-498.
- Heijnen, L., Medema, G. (2009) Method for rapid detection of viable *Escherichia coli* in water using real-time NASBA. *Water Research.*, 43(12):3124-32.
- Hrudey, S.E., Hrudey, E.J. (2004). Safe drinking water; lessons from recent outbreaks in affluent nations. IWA Publishing, London.
- Hunter, P.R., Chalmers, R.M., Hughes, S., Syed, Q. (2005) Self-reported diarrhea in a control group: strong association with reporting of low-pressure events in tap water. *Clinical Infectious Diseases*, 40(4):32-34.
- Juhna, T., Birzniece, D., Larsson, S., Zulenkovs, D., Sharipo, A., Azevedo, N.F., Karim, M.R., Abbaszadegan, M., LeChevalier, M. (2003) Potential for pathogen intrusion during pressure transients. *Journal of the American Water Works Association*, 95(5):134-146.
- LeChevallier, M.W., Xu, M., Yang, J., Tuenis, P., Fleming, K.K. (2011). Managing distribution system low transient pressures for water quality. Water Research Foundation report, Denver, USA.
- Lepeuple, S., Delabre, K., Giloupe, S., Intertaglia, L., de Roubin, M.R. (2003) Laser scanning detection of FISH-labelled *Escherichia coli* from water samples. *Water Science & Technology* 47(3):123-9.
- Medema, G.J., Smeets, P., Blokker, M., van Lieverloo, L. (2013) Safe distribution without a disinfectant residual. In: van der Kooij, D & van der Wielen P (eds). Microbial Growth in Drinking Water Supplies. Problems, Causes, Control and Research Needs. IWA Publishing, 300pp.
- Meerkerk, M.A., Kroesbergen, J. (2010). Hygiëencode drinkwater; opslag, transport en distributie. BTO report 2001.175.
- Ménard-Szczebara, F., Castagnet, S., Féliers, C., Keevil, C.W. (2007) Detection of *Escherichia coli* in biofilms from pipe samples and coupons in drinking water distribution networks. *Applied & Environmental Microbiology* 73(22):7456-64.

- Nobel, P.J. (2001). Bewaking van de microbiologische kwaliteit van het drinkwater in het distributienet na aanleg en ingrepen. BTO report 2001.113, Kiwa, The Netherlands. (in Dutch).
- Nobel, P., Oosterholt F. (2005) Onderzoek naar achtergrondniveau van *E. coli* en enterococci in drinkwater in het distributienet – Onderzoek grote volumes. BTO rapport 2004.071.
- Nygaard, K., Wahl, E., Krogh, T., Tveit, O.A., Bohleng, E., Tverdal, A., Aavitsland, P. (2007) Breaks and maintenance work in the water distribution systems and gastrointestinal illness: a cohort study. *International Journal of Epidemiology*, 36(4):873-880.
- Payment, P., Richardson, L., Siemiatycki, J., Dewar, R., Edwardes, M., Franco, E. (1991) A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to consumption of drinking water meeting current microbiological standards. *American Journal of Public Health*, 81(6):703-708.
- Payment, P., Siemiatycki, J., Richardson, L., Renaud, G., Franco, E., Prevost, M. (1997) A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *International Journal of Environmental Health Research*, 7(1):5-31.
- Schellart, J. (1986) Disinfection and bacterial regrowth: some experiences of the Amsterdam water works before and after stopping the safety chlorination. *Water Supply* 4:217-225.
- Smeets, P.W.M.H., Medema, G.J., van Dijk, J.C. (2009) The Dutch secret: how to provide safe drinking water without chlorine in the Netherlands. *Drinking Water Engineering and Science*, 2:1-14.
- Teunis, P.F.M., Xu, M., Fleming, K.K., Yang, J., Moe, C.L., LeChevallier, M.W. (2010) Enteric virus infection risk from intrusion of sewage into a drinking water distribution network. *Environmental Science and Technology*, 44:8561-8566.
- Van der Kooij, D., Van Lieverloo, J.H.M.L., Gale, P., Stanfield, G. (2002) Distributing drinking water with a low or zero disinfectant residual. Operational and biological aspects. Kiwa report 127, Nieuwegein, The Netherlands.
- Van Lieverloo, J. H. M., Blokker, E.J. M., Medema, G., Hambsch, B., Pitchers, R., Stanfield, G., Stanger, M., Agutter, P., Lake, R., Loret, J. F., Soyeux, E. (2006a) Contamination during distribution, Microrisk report.
- Van Lieverloo, J.H.M., Blokker, E.J.M., Medema, G. (2007b) Quantitative microbial risk assessment of distributed drinking water using faecal indicator incidence and concentrations. *Journal of Water and Health* 5:131-149.
- Van Lieverloo, J.H.M., Mesman, G.A.M., Bakker, G.L., Blokker, E.J.M., Baggelaar, P.K., Hamed, A., Medema, G.J. (2007a) Probability of detecting and quantifying faecal contaminations of drinking water by periodically sampling for *E. coli*: A simulation model study. *Water Research* 41:4299-4308.
- Van Lieverloo, J.H.M., Medema, G., van der Kooij, D. (2006b) Risk assessment and risk management of faecal contamination in drinking water distributed without a disinfectant residual. *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua* 55:25-31.
- VEWIN (2009). Reflections on performance. VEWIN, Rijswijk, The Netherlands.

I Recovery testen E. coli

Recovery van *E. coli* op laboratorium

Doel

De opzet van de tapsampler kan leiden tot een verminderde opbrengst van *E. coli*. Wanneer *E. coli* in het bemonsterde drinkwater zit wordt deze op het filter afgevangen. Vervolgens wordt de bacterie tot 24 uur blootgesteld aan filtratie, wat de levensvatbaarheid of kweekbaarheid van de bacterie kan beïnvloeden. Toenemende fysieke stress door vervuiling van het filter of concentratie van deeltjes op het filter kan hieraan bijdragen. Daarnaast raken de filters, afhankelijk van de waterkwaliteit, bruiner gekleurd dan gebruikelijk doordat zoveel water over een klein oppervlak wordt gefiltreerd. Hierdoor zou het tellen van gele kolonies kunnen worden bemoeilijkt.

Doel van dit onderzoek was te bepalen of het gedurende 24 uur filtreren van 10 liter water over een standaard bacteriologisch filter haalbaar is, welke recovery daarbij wordt bereikt en welke invloed de duur van filtratie heeft op de recovery.

Proefopzet

De recovery van de Tap Sampler methode voor het bepalen van *E. coli* concentratie met een kweekmethode werd bepaald door het voedingswater van de tap sampler filters te enten met *E. coli*. De *E. coli* concentratie van de entoplossing van *E. coli* werd in meervoud bepaald. Dit wordt de 'directe' bepaling genoemd. De tap sampler filters werden op verschillende manieren geënt om zo de invloed van verschillende aspecten van de methode te kunnen meenemen:

- De entoplossing op het filter spuiten en vervolgens water filtreren
- De entoplossing vermengen met water en dit water filtreren met de tap sampler.

De recovery volgt uit het verschil tussen de directe bepaling en de bepaling met de tap sampler.

Materialen en methoden

Tap sampler

De tap sampler is een appendage die aan een waterkraan wordt aangesloten. Hij is voorzien van twee uitstromen waaraan een filterhouder kan worden bevestigd en een extra uitstroom met slangtule om voldoende doorstroming van het net te creëren indien nodig. Alle uitstromen zijn voorzien van afsluiters om de waterstroom te regelen. Whatman FP 050/0 filterhouders zijn gebruikt zowel aan de tap sampler als aan doseervaten. Het doseren van *E. coli* aan de tap sampler voor het bepalen van de recovery zou kunnen leiden tot verontreiniging van het drinkwater, daarom is bij de recoverybepaling een opstelling gebruikt met doseervaten.



Figuur 1 Foto tap sampler in meetopstelling op het laboratorium

Proefopstelling doseervaten

De situatie in het leidingnet van bacteriën vrij in oplossing is gesimuleerd door een vat op circa 1,8 m hoogte te plaatsen, en via een slang met een filterhouder op vloerniveau te verbinden. De vaten werden gevuld met circa 10 L steriel water en vervolgens werd een hoeveelheid ent hierin gepipetteerd. De inhoud werd geroerd, waarna het water in circa 24 uur onder vrij verval door de filterhouder stroomde. Vervolgens werd overtollig water uit de filterhouder weggezogen met een injectiespuit die werd aangesloten aan de filtraatzijde van de filterhouder. Het filter in de filterhouder werd geanalyseerd op *E. coli*.

E. coli bepaling

Watermonsters werden gefiltreerd over standaard 0,45 µm membraanfilters van Millipore, die regulier op het laboratorium worden gebruikt voor *E. coli* analyse, met filterbekers of met de tap sampler. Het filter werd overgebracht op een LSA plaat. De platen werden 5 ± 1 uur bij 25°C geïncubeerd, gevolgd door 14 uur ± 2 uur incubatie bij 44°C. Na incubatie werden de gele kolonies op de plaat geteld.

E. coli entoplossing

Een diepvriescupje met *E. coli* WR1 werd ontdooid in een oplossing met pepton glycerol. Dosering uit deze entvloeistof vond plaats door middel van pipetteren. Het aantal *E. coli* bacteriën in de gebruikte hoeveelheid ent werd bepaald door dezelfde hoeveelheid ent direct op een kweekplaat aan te brengen. Deze bepaling werd in vijfvoud uitgevoerd om de spreiding van de concentratie in de ent te bepalen.

Water

Kraanwater van het tappunt in de koude kamer van het microbiologisch laboratorium op KWR werd gebruikt voor de experimenten. Dit tappunt is rechtstreeks aangesloten op het drinkwaternet, zonder tussenkomst van een breektank en zonder koperen leidingen. In een aantal experimenten is het water, dat veel deeltjes bevat, voorbehandeld door filtratie over een 0,2 µm filter.

Uitvoering

De volgende experimenten zijn uitgevoerd om inzicht te krijgen in de recovery van de tap sampler bemonstering en de invloed van de tijd van blootstelling aan filtratie.

- 1 Eerst werd 10 liter drinkwater gefiltreerd over het filter, waarna circa 0,2 ml ent (vanuit de entvloeistof) op het filter werd aangebracht
- 2 Eerst werd circa 0,2 ml ent (vanuit de entvloeistof) in een vat met 5-10 liter drinkwater gemengd. Vervolgens werd door middel van zwaartekracht het geënte drinkwater gefiltreerd over het filter.

Uitgevoerde proeven

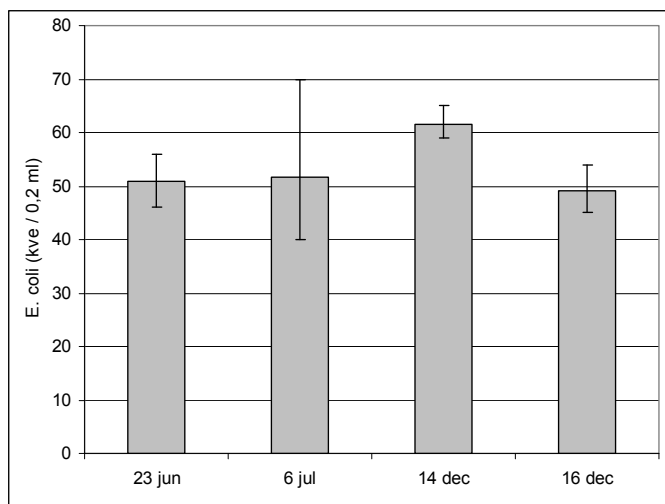
De recovery van de methode is in een aantal afzonderlijke proeven bepaald. In Tabel 1 staat een overzicht van de uitgevoerde proeven en de resultaten. De recovery per experiment (Rec. Exp.) is bepaald door de telling per filtratie te delen door de gemiddelde telling in de ent van die dag (5 tellingen). De gemiddelde recovery is bepaald door de telling per filtratie te delen door de gemiddelde telling van alle enten (20 tellingen).

Tabel 1 Uitgevoerde experimenten en resultaten *E. coli* recovery op het laboratorium met ent uit diepvriescupjes

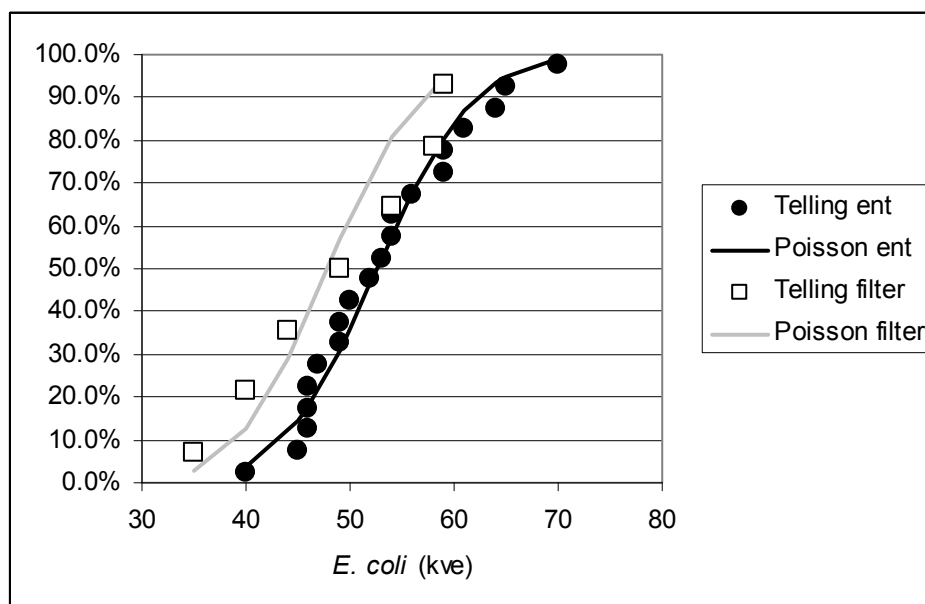
Datum	Type	Ent (ml)	Water (l)		Rec. Exp.	Rec. Gem.	Opmerkingen
23-6-09	ent	0.1	-	25.4	-		23/23/26/27/28
	1	0.2	10	54	106%	101%	
	2	0.2	10	44	87%	83%	
	2	0.2	10	59	116%	111%	
	2	0.2	10	ntb	-		filter slecht afleesbaar, onvoldoende droog
7-6-09	ent	0.2	-	51.6	-		40/46/49/53/70
	2	0.2	10	49	95%	92%	
	2	0.2	10	-	-		filter slecht afleesbaar, onvoldoende droog
	2	0.2	10	-	-		filter slecht afleesbaar, onvoldoende droog
14-12-09	ent	0.2	-	61.6	-		59/59/61/64/65
	2	0.2	5	58	94.2%	109%	
	2	0.2	5	54	87.6%	101%	
16-12-09	ent	0.2	-	49.0	-		45/47/49/50/54
	2	0.2	5	35	71.4%	66%	Water voorgefiltreerd over 0.2 µm filter
	2	0.2	5	40	81.6%	75%	

Resultaten

In Figuur 2 zijn de gemeten concentraties *E. coli* in de entvloei stof weergegeven. Daarbij lijken er verschillen te zijn tussen de gebruikte cupjes. Op 6 juli werd één opvallend hoge concentratie waargenomen (70 kve in 0,2 ml) en de gemiddelde concentratie in het diepvriescupje van 14 december was hoger dan in de andere cupjes. In principe is de concentratie in ieder cupje gelijk en kunnen de waargenomen verschillen het gevolg zijn van toevallige monstervariatie. Monstervariatie zou leiden tot een poissonverdeling van de getelde aantallen in hetzelfde volume. In Figuur 3 zijn alle tellingen van de ent samengevoegd in een cumulatieve verdeling weergegeven en vergeleken met de poissonverdeling met als parameter het gemiddelde van de telling. Hieruit blijkt dat de waargenomen variatie vrijwel overeenstemt met de poissonverdeling. Voor de bepaling van de recovery wordt daarom aangenomen dat de gemiddelde concentratie in de ent 53,3 kve/0,2 ml bedroeg en poissonverdeeld was.



Figuur 2 Concentratie *E. coli* per entcupje in kve/0,2 ml met maximale en minimale concentratie



Figuur 3 Cumulatieve verdeling van alle *E. coli* tellingen in de ent en tellingen op de filters (methode 2) in kve.

In Figuur 3 zijn tevens de tellingen op de filters ná de recoveryexperimenten type 2 (eerst enten, dan filteren) weergegeven, waarbij ook de poissonverdeling is weergegeven. De tellingen zijn niet duidelijk poissonverdeeld, maar dat kan een gevolg zijn van het geringe aantal monsters. De experimenten wijken onderling alleen af voor wat betreft het gefiltreerde volume. Uit Tabel 1 blijkt geen trend in de recovery in relatie tot het gefiltreerd volume. De experimenten worden daarom beschouwd als herhalingen van hetzelfde experiment. De gemiddelde concentratie na filtratie bedroeg 48,4 kve / 0,2 ml. De gemiddelde recovery bedroeg 91%. De waargenomen recovery varieert van 66% tot 111%.

Discussie

De recovery is bepaald met een lage concentratie bacteriën om zo de werkelijkheid te benaderen en omdat slechts een beperkt aantal koloniën betrouwbaar kan worden geteld op een filter. Een nadeel daarvan is dat variaties als gevolg van de verdeling van bacteriën over de vloeistof een relatief grote invloed kunnen hebben op het resultaat. Het exacte aantal bacteriën dat per experiment aan het water is toegevoegd is immers niet bekend. Zo bestaat bij de gemiddelde recovery van 91% een kans van 2,7% op

het waarnemen van 66% recovery of lager. Deze laagst waargenomen waarde valt zo nog juist binnen het 95% betrouwbaarheidsinterval. De recovery kan in theorie niet groter zijn dan 100%, maar door de variatie bestaat er 6% kans dat de waargenomen recovery 111% of hoger is. De laagste en hoogste waargenomen waarden vallen dus binnen het 95% betrouwbaarheidsinterval.

Bij de experimenten is getracht de werkelijke situatie te reproduceren. De proefopzet kan echter leiden tot een lagere recovery dan in de werkelijkheid. Bacteriën kunnen door de proefopzet verloren gaan zonder dat dit aan de tap sampler methode ligt, bijvoorbeeld door bezinking in of hechting aan het doseervat en slangen. Uit de resultaten blijkt in ieder geval geen sterke invloed, aangezien gemiddeld vijf bacteriën verloren gaan.

Er is eenmalig een experiment type 1 uitgevoerd, waarbij *E. coli* op het filter is aangebracht nadat 10 liter water was gefiltreerd. Het bleek mogelijk om kolonies te tellen op een dergelijk vervuild filter en de recovery was hoog (101%) zoals verwacht. Aangezien de experimenten type 2 ook een hoge recovery gaven zijn er daarna geen experimenten type 1 meer uitgevoerd.

Conclusie

Het is mogelijk om 10 liter kraanwater over een standaard membraanfilter te filtreren. Het is vervolgens ook mogelijk om op dit filter *E. coli* kolonies te tellen, ook wanneer het filter (donker-) bruin is gekleurd door (waarschijnlijk ijzer- en mangaan-) deeltjes in het water. Circa 91% van de *E. coli* bacteriën in het water kon zo worden aangetoond. De tap sampler methode heeft dus niet tot nauwelijks invloed op de gevoeligheid van de *E. coli* analyse. De vastgestelde recovery is voldoende hoog voor toepassing in het onderzoek naar *E. coli* in het distributienet. Op basis van de meetresultaten kon niet de variatie van de recovery niet worden bepaald, deze is kleiner dan de onzekerheid die ontstaat door de verdeling van organismen in het water. Bij kwantitatieve interpretatie van meetresultaten zal worden uitgegaan van een gemiddelde recovery van 91% en de onzekerheid die volgt uit de (poisson)verdeling van organismen in het water (deze is afhankelijk van de gevonden aantallen).

Recovery van *E. coli* op locatie

Doel

Op het laboratorium werd met de tap sampler methode een hoge recovery gehaald. Op de monsterlocatie zou de recovery lager kunnen zijn door omgevingsfactoren. Het onderzochte water op locatie kan een andere samenstelling hebben dan op het laboratorium. Enerzijds speelt de oorsprong van het water een rol (winning en zuivering), deze was voor alle monsterpunten in het net gelijk. Wel konden verschillen ontstaan door de verschillende afstand tot het pompstation. Het bemonsterde water op het pompstation en de monsterpunten was op verschillende momenten geproduceerd. Distributie in het net beïnvloedt de watersamenstelling en eventueel ook de verblijftijd van *E. coli* in het water. Uiteindelijk kan ook de binneninstallatie invloed hebben op de waterkwaliteit. Daarnaast werd de tap sampler op locatie blootgesteld aan wisselende temperaturen en licht. Ook tijdens het transport van monsters wisselde de temperatuur en was het filter onderhevig aan beweging of schokken.

De recovery moest daarom ook op locatie worden bepaald, als kwaliteitsborging en om resultaten van het meetprogramma kwantitatief te kunnen interpreteren. De recoverybepaling met vaten zoals die op het laboratorium was uitgevoerd was niet handig in de praktijk. Daarom is een alternatieve methode voor recoverybepaling op locatie ontwikkeld waarbij in het laboratorium een ent met *E. coli* bacteriën op een filter wordt aangebracht. Dit filter wordt op locatie doorstroomd met hetzelfde water als de tap sampler. Door het aantal bacteriën op het filter te vergelijken met het aantal in de ent, kan de recovery op locatie worden bepaald.

Het doel van dit onderzoek was de recoverybepaling te testen, de recovery van te tap sampler op locatie te bepalen en eventueel de recovery verbeteren.

Daarvoor moest een aantal vragen worden beantwoord:

- Geeft deze methode van recoverybepaling dezelfde resultaten als de recoverybepaling met vaten?
- Geeft de recoverybepaling op locatie dezelfde recovery als op het lab?
- Gaan bacteriën dood door een andere waterkwaliteit?
- Gaan bacteriën dood door blootstelling aan omgevingsfactoren?
- Gaan ent-bacteriën dood als gevolg van het aanbrengen en bewaren op het filter voorafgaand aan een recoverybepaling?

Proefopzet

Er werd gestart met alleen een recoverybepaling op locatie door een filter te enten met *E. coli* uit een diepvriescupje en dit bloot te stellen aan filtratie op locatie. Daaruit bleek dat de recovery op locatie erg laag was. Daarom is de proef uitgebreid door gelijktijdig de diverse elementen van de recoverybepaling te meten.

De recovery van de tap sampler methode op locatie werd bepaald door een filter te beënten met een bekende hoeveelheid *E. coli*. Dit filter onderging vervolgens dezelfde stappen als een *E. coli* filter van de tap sampler. Daarnaast werden aanvullende metingen uitgevoerd om meer inzicht te krijgen in de factoren die invloed hebben op de recovery:

- afsterving van bacteriën in water van de locatie
- recovery met deze methode in het laboratorium
- overleving van bacteriën op een filter in het laboratorium
- overleving van bacteriën in de envloeistof op locatie en het laboratorium

Alle metingen vonden gelijktijdig plaats op locatie en op het laboratorium, respectievelijk met het water van beide punten.

Materialen en methoden

Tap Sampler op locatie

De tap sampler is op vier locaties in Amersfoort geplaatst. Een bij PS Hogeweg, en drie verspreid bij woningen. De tap samplers zijn allemaal aangesloten op de buitenkranen in verband met de bereikbaarheid en om schade bij eventuele lekkage te voorkomen. Doorstroming werd gemeten met regenmeters. Het geheel werd afgeschermd met een plastic krat als bescherming tegen opspattend vuil en om te voorkomen dat regen in de regenmeters kwam. De foto's in Figuur 4 geven een beeld van de opstelling.



Figuur 4 Foto's tap sampler meetopstelling op locatie

Ent-bacteriën

Voor het bepalen van de recovery zijn *E. coli* WR1 gekweekt in een entfles op een laag substraat. Bij enkele proeven zijn *E. coli* WR1 uit diepvriescupjes gebruikt. Bij het ontdooien wordt pepton glycerol toegevoegd om de levensvatbaarheid te vergroten. Nadat uit experimenten bleek dat bij deze ent groei kon optreden is overgestapt op de ent uit de entflessen. Tenzij anders vermeld is voor de experimenten steeds beent vanuit dezelfde entfles (nummer 78). Deze entfles werd bewaard in de koeling bij 4°C.

Procedure enten

Voor iedere dag waarop experimenten plaatsvonden werd de volgende procedure opnieuw doorlopen. Met behulp van een pipet werd 0,5 ml uit de entfles in 100 ml steriel water gepipetteerd. Deze entvloeistof vormde de basis voor alle experimenten op die dag. Buizen werden gevuld met circa 15 ml van deze entvloeistof, waarvan er één direct in de koeling werd bewaard voor bepaling van de concentratie in de ent, en een tweede buis werd meegenomen naar de locatie als controle. Filterhouders werden beënt door eerst een filter aan de brengen in de houder. Vervolgens werd een kleine hoeveelheid steriel water via de opening in de bovenkant gepipetteerd totdat het filter nat was. Visueel werd vastgesteld dat water boven het filter stond. In dit water werd 1 ml van de entvloeistof gepipetteerd. Door te draaien met het filter werden de cellen verdeeld over het filter. Vervolgens werd het filter afgepompt totdat het waterniveau voldoende was gedaald tot net boven het filter. Daarbij werd gestreefd naar een nat filter.

Procedure analyse filters

De filters werden verzameld op het laboratorium. De filters werden daar uit de steriele zakken gehaald, en de afdichtingen van parafilm werden verwijderd. De filterhouders werden aan de uitstroomzijde aangesloten op de slangenpomp en de pomp werd ingeschakeld. Het voldoende droog trekken van het filter werd gecontroleerd door de bovenzijde van de filterhouder te verwijderen tijdens het droogtrekken. Vervolgens werd het filter met een steriel pincet opgepakt en op een LSA voedingsbodem geplaatst. Incubatie 5 ± 1 uur bij 25 °C, gevolgd door 14 uur ± 1 uur bij 44 °C.

Procedure analyse buizen

Een filterbekeropstelling werd voorzien van filters. Vervolgens werd circa 10 ml water op het filter gebracht. Daarin werd 1 ml entvloeistof uit de buis gepipetteerd. Vervolgens werd de pomp ingeschakeld en het filter drooggetrokken. De filters werden vervolgens op een LSA voedingsbodem geplaatst. Incubatie vond plaats in 5 ± 1 uur bij 25°C , gevolgd door 14 uur ± 1 uur bij 44°C .

Bij een recovery experiment werden een of meerdere van onderstaande metingen uitgevoerd.

A Bepaling entconcentratie

Een buisje met circa 50 ml van de aangemaakte entvloeistof werd circa 24 uur in de koeling bij 4°C bewaard. Vervolgens werd het aantal *E. coli* in 1 ml van de entvloeistof bepaald, gelijktijdig met de andere concentratiebepalingen. Deze bepaling vormde de referentie concentratie voor de recoverybepaling.

B Filter met ent in het laboratorium

Een beënt filter werd gedurende de metingen circa 24 uur in de koeling bij 4°C bewaard. Vervolgens werd het aantal *E. coli* op het filter bepaald. Hiermee werd bepaald of het aanbrengen van *E. coli* op een filter een nadelige invloed had op de overleving van *E. coli* en opzichte van A.

C Recovery op het laboratorium

Een filterhouder met een beënt filter werd achter een ander filter aan de tap sampler in de koude kamer gehangen. In 24 uur ongeveer 10 L water over de beide filters gefiltreerd. Vervolgens werd het aantal *E. coli* op het filter bepaald. Hiermee werd de aangepaste methode voor recoverybepaling vergeleken met de eerdere recoverybepalingen.

D Effect waterkwaliteit laboratoium

In een steriele fles werd een 1000 ml monster van kraanwater genomen. In deze fles werd ent gedoseerd en goed gemengd. Een deelmonster van 250 ml werd na 1 uur gefiltreerd en geanalyseerd op *E. coli*. Twee deelmonsters van 250 ml werden 24 h in de koeling (4°C) respectievelijk bij kamertemperatuur ($15^\circ\text{-}20^\circ\text{C}$) bewaard en vervolgens gefiltreerd en geanalyseerd op *E. coli*. Hiermee werd bepaald of de waterkwaliteit op het laboratorium een nadelige invloed had op de overleving van *E. coli*.

E Overleving in entvloeistof op locatie

Een buisje met circa 50 ml entvloeistof werd in een koelbox op ijs naar de locatie getransporteerd. Daar werd het buisje gedurende de metingen (circa 14 uur) direct naast het monsterpunt bewaard. Vervolgens werd het filter in een koelbox met koelelementen naar het laboratorium getransporteerd. Daar werd het aantal *E. coli* in 1 ml van de entvloeistof bepaald, gelijktijdig met de andere concentratiebepalingen. Zo werd bepaald of transport en omgevingsfactoren op locatie invloed hadden op de overleving van *E. coli*.

F Filter met ent op locatie

Een beënt filter werd in een koelbox op ijs naar de locatie getransporteerd. Daar werd het filter gedurende de metingen (circa 14 uur) direct naast het monsterpunt bewaard. Vervolgens werd het filter in een koelbox met koelelementen naar het laboratorium getransporteerd. Daar werd het aantal *E. coli* op het filter bepaald. Hiermee werd bepaald of onder de condities op locatie het aanbrengen van *E. coli* op een filter een nadelige invloed had op de overleving van *E. coli* en opzichte van E. Daarnaast kon uit een vergelijking met B volgen welke invloed omgevingsfactoren hadden.

G Recovery op locatie

Een filterhouder met een beënt filter werd in een koelbox op ijs naar de locatie getransporteerd. Daar werd het filter gedurende de metingen (circa 14 uur) achter het reguliere *E. coli* filter aan de tap sampler gehangen. In circa 14 uur werd ongeveer 10 L water over de beide filters gefiltreerd. Vervolgens werd het filter in een koelbox met koelelementen naar het laboratorium getransporteerd. Daar werd het aantal *E. coli* op het filter bepaald. In vergelijking met A kon zo de recovery op locatie worden bepaald.

H Effect waterkwaliteit locatie

Op locatie werd een 500 ml monster van kraanwater genomen in een steriele fles. Het monster werd langzaam, gedurende enkele minuten, getapt uit de tap sampler. Op het laboratorium werd in deze fles ent gedoseerd en goed gemengd. Aan een deelmonster van 250 ml werd NTA toegevoegd, aan het andere deelmonster niet. NTA bindt zware metalen in het water die *E. coli* kunnen inactiveren zoals koper. Beide monsters werden na 1 uur gefiltreerd en geanalyseerd op *E. coli*. Hiermee werd bepaald of de waterkwaliteit op locatie een nadelige invloed had op de overleving van *E. coli* en of dit verband hield met de aanwezigheid van zware metalen.

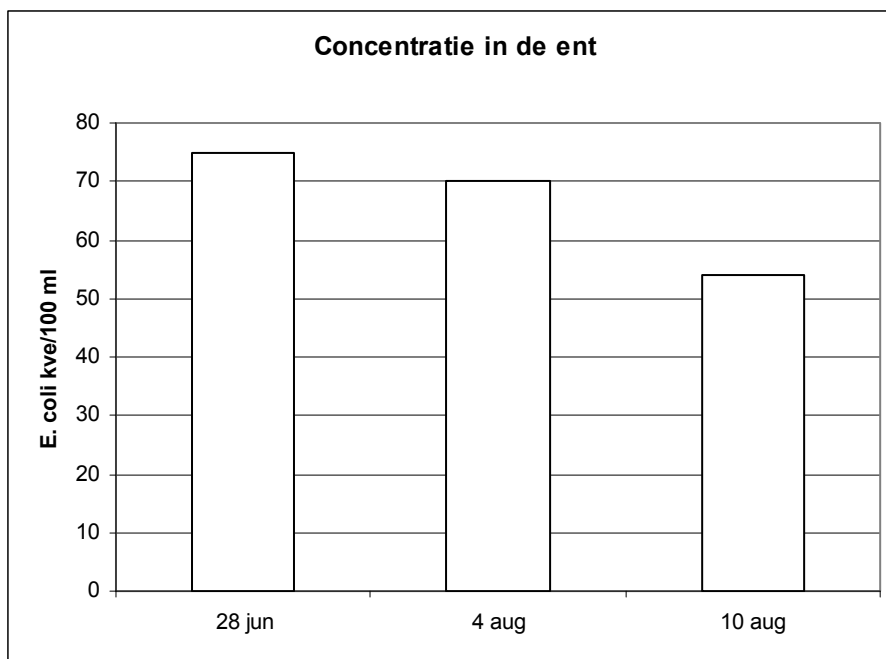
Koperbepaling

Koperbepaling in water vond plaats volgens KWRvoorschrift.

Resultaten

Concentratie *E. coli* in de entvloeistof

Entfles 78 is steeds gebruikt om entvloeistof te maken waarmee de recovery van de tap sampler methode werd bepaald. In de entfles werd over de periode van de experimenten geen afsterving of groei van *E. coli* verwacht. Voor iedere aangemaakte entvloeistof werd daarom een gelijke concentratie verwacht. Het gemiddelde aantal *E. coli* in 1 ml entvloeistof was 66 kve. Figuur 5 laat zien dat de gemeten concentratie per monster afnam van 75 naar 54 kve/ml. Deze spreiding komt overeen met een variatiecoëfficiënt (VC) van 14%, wat binnen de VC van de binnenlabreproduceerbaarheid van 27,5% van de methode valt. Voor dit onderzoek is daarom aangenomen dat de verschillen het gevolg zijn van variaties in de methode (verdeling organismen over het water) en dat de concentratie per ent even sterk varieerde.



Figuur 5 Gemeten concentraties *E. coli* in de entvloeistof

Batch experiment invloed waterkwaliteit

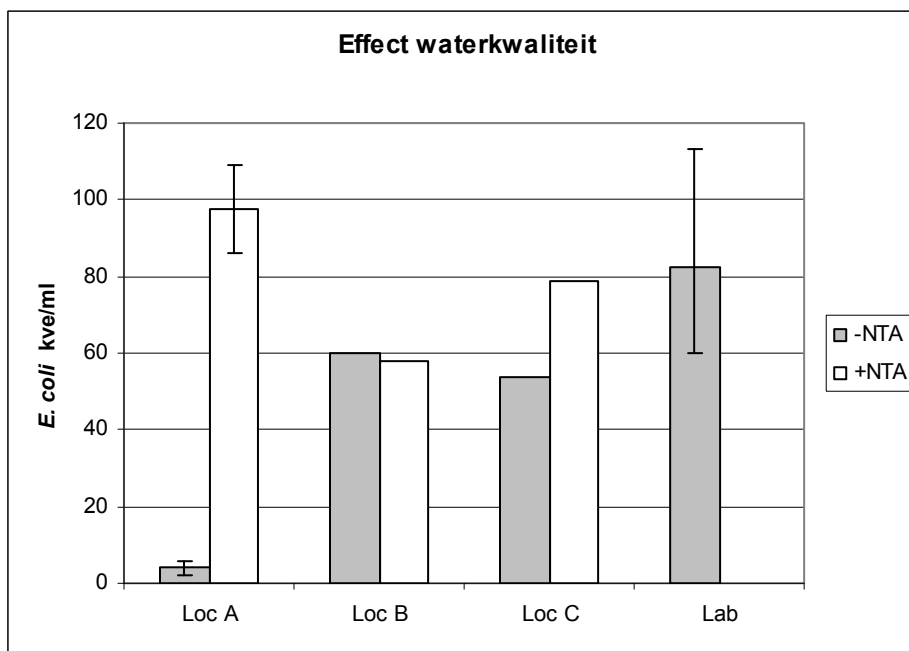
In Figuur 6 zijn de resultaten van de batch experimenten naar de invloed van de waterkwaliteit op de recovery van *E. coli* weergegeven. Op locatie A werd zonder toevoeging van NTA slechts 2% tot 6% van de gedoseerde bacteriën teruggevonden. Bij locatie B werden zonder NTA evenveel bacteriën teruggevonden als met NTA. Op locatie C was het aantal *E. coli* in het deelmonster zonder NTA 68% van het aantal gevonden in het deelmonster met NTA. Dit kan een gevolg zijn van de variatie in de methode. Deze variatie blijkt ook uit de resultaten op het laboratorium. Daarbij zijn in de drie deelmonsters 60 tot 113 kve gevonden, waarbij de hogere waarden na 24 uur stilstand optraden. Op

basis van deze resultaten kan voor locatie C niet worden vastgesteld of werkelijk inactivatie van *E. coli* heeft plaatsgevonden.

NTA wordt bij reguliere distributiemonsters gebruikt om zware metalen in het water te binden, omdat zware metalen bacteriën kunnen inactiveren. In Tabel 1 staan de resultaten van de kopermetingen in het water van de locaties. De koperconcentratie op locatie A is veel hoger dan op beide andere locaties, wat waarschijnlijk wordt veroorzaakt door de recent aangelegde binnenleiding. De aanwezigheid van koper in het water van locatie A kan de lage recovery op die locatie verklaren. De aanwezigheid van koper op locatie C heeft een minder sterk effect op de recovery, terwijl de aanwezigheid van 12 mg/l koper in het water van locatie B helemaal geen invloed op de recovery lijkt te hebben. Het kopergehalte op locatie A voldoet aan de wettelijke norm van 2000 µg/l, maar is relatief hoog (de mediaan van het kopergehalte in Nederland is 48 µg/l, het 95 percentiel is 652 µg/l). Uit deze proef blijkt dat de waterkwaliteit ter plaatse van het monsterpunt grote invloed kan hebben op de recovery. Het is daarom raadzaam om vooraf deze invloed te bepalen.

Tabel 2 Koperconcentraties bij monsterlocaties

Locatie	Cu (µg/l)	Binnenleidingen op locatie
A	420	Aanbouw met circa 8 m koperen binnenleiding, 1 jaar oud
B	12	Nieuwbouw met waarschijnlijk kunststof binnenleiding
C	60	Gebouw 1890, aanleg koperen leiding ca. 1980



Figuur 6 Het effect van de waterkwaliteit op de monsterlocaties op de overleving van *E. coli*.

Gebruik diepvriescupje als ent

De recovery experimenten op locatie A werden in eerste instantie uitgevoerd met *E. coli* uit diepvriescupjes, net als bij de recoverybepaling op het laboratorium. De concentratie *E. coli* in een diepvriescupje was circa 250 kve/ml waarvan 0,2 ml werd geënt. Er werden daarom tellingen van circa 50 kve verwacht. Tabel 3 geeft de resultaten van de experimenten met diepvriescupjes weer. Hieruit blijkt dat de gevonden concentraties in de buizen op locatie veel hoger waren dan die in de koeling. Het verschil is groter dan op basis van variatie wordt verwacht. Door de hogere temperatuur op locatie in combinatie met aanwezigheid van pepton glycerol (als substraat) kan groei van *E. coli* zijn opgetreden. De buizen in de koeling waren bedoeld om de concentratie in de entvloei stof te bepalen. De gemeten

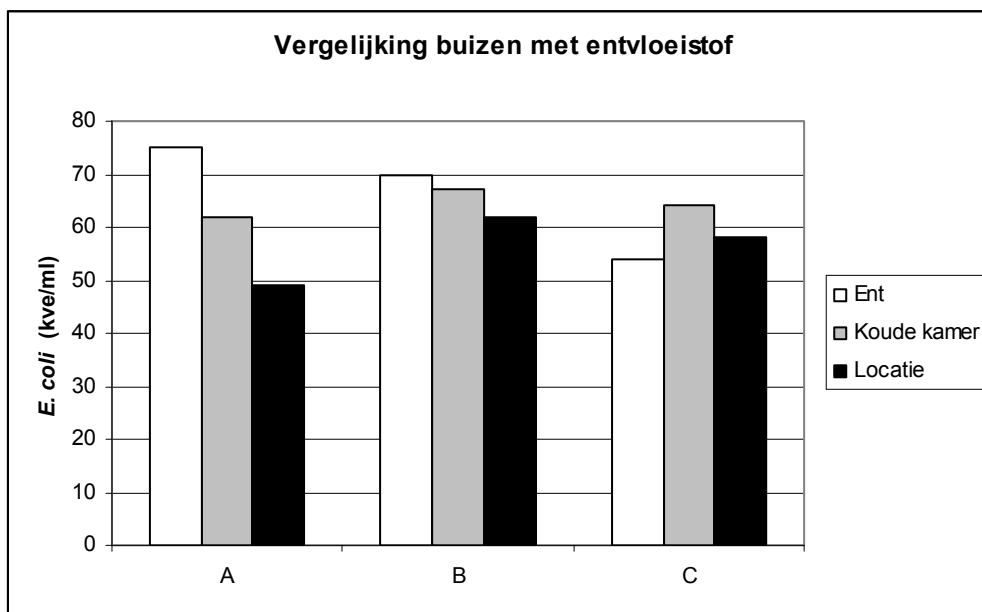
concentraties zijn hoger dan eerder in de diepvriescupjes is aangetroffen (zie Figuur 2). Dit duidt erop dat mogelijk ook in de koeling bij 4°C groei van *E. coli* is opgetreden. Naar aanleiding van deze resultaten zijn de latere recoverybepalingen uitgevoerd met *E. coli* uit entflessen waarbij geen nagroei wordt verwacht omdat er geen pepton glycerol wordt toegevoegd.

Tabel 3 Resultaten met ent uit diepvriescupjes

Meting	26-5-2010	31-5-2010	7-6-2010
A: Entvloeistof in koeling	40	154	81
E: Entvloeistof naast tap sampler	-	198	302
Min-max temperatuur	-	9-16°C	12-26°C

Inactivatie in entvloeistof

Voor de bepaling van de concentratie in de entvloeistof is bij iedere recoverybepaling een buis met entvloeistof circa 24 uur bewaard in de koelcel. Identieke buizen met entvloeistof zijn ook naast de tap samplers neergelegd om te bepalen of omgevingsfactoren als temperatuur of licht effect zouden hebben op de recovery. Op KWR lagen deze buizen in de "koude kamer" bij circa 15°C. Op locaties A, B en C vonden de experimenten plaats van de namiddag tot de volgende ochtend. Bij locatie A was de temperatuur overdag 30°C, bij locatie B en C circa 20°C, terwijl bij alle locaties de temperatuur 's nachts tot 13°C daalde. Op de meetdag van locatie A is de hoogste concentratie in de ent gevonden. Zoals eerder aangegeven is dit waarschijnlijk het gevolg van variatie. Daarom wordt voor de ent het gemiddelde aantal van 63,3 aangehouden. Dit komt vrijwel overeen met aantal in de koude kamer van 62 kve. In de buis op locatie A werden 49 kve gevonden, wat overeenkomt met 74% van de gemiddelde entconcentratie. Bij de bepaling op locatie B is een afname tot 93,5% waargenomen en op locatie C tot 87,5%. De resultaten kunnen worden verklaard door spreiding van de concentratie in de entvloeistof en de analysemethode. Anderzijds is het mogelijk dat op locatie A inactivatie plaats heeft gevonden door de hoge omgevingstemperatuur. In dat opzicht kan de waarneming bij locatie A als 'worst case' worden beschouwd, aangezien een temperatuur van 30° zelden voor komt. Bovendien speelt bij monstername met de tap sampler de buitentemperatuur een minder grote rol en is de temperatuur van het leidingwater bepalend. Het filter wordt immers continu doorstroomd en daardoor gekoeld door leidingwater. Conclusie is dat het transport en de omgevingsfactoren tijdens monstername een beperkte tot geen invloed hebben op de overleving van *E. coli* in de entoplossing.



Figuur 7 *E. coli* concentratie in beente buis met steriel water na 24 uur.

Effect van filtratie met tap sampler

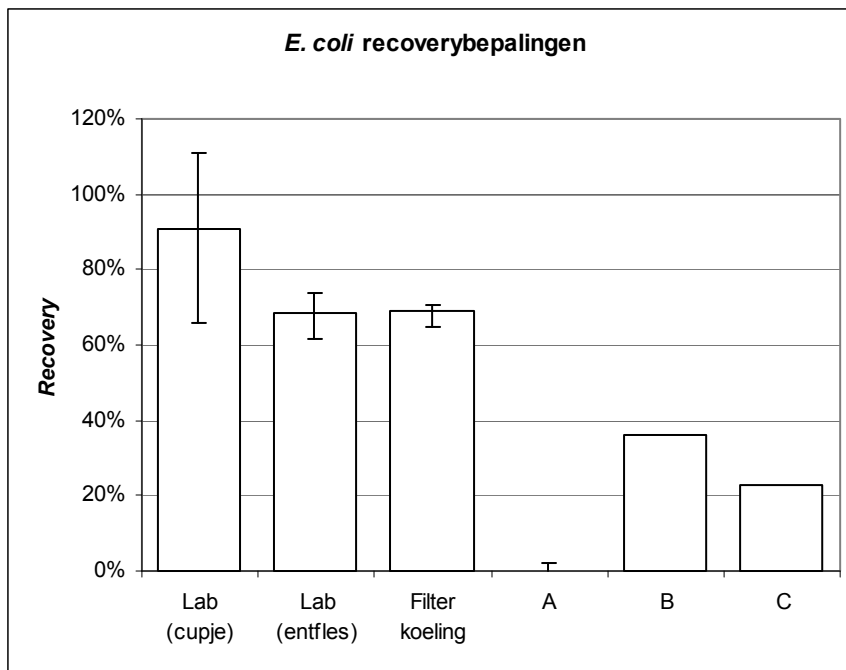
De recovery van de tap sampler op het laboratorium is bepaald door meting C (recovery op het laboratorium) te vergelijken met meting A (concentratie entvloeistof). In Figuur 8 zijn de resultaten vergeleken van de eerdere recoverybepalingen met vaten (met diepvriescupjes), aan de kraan (met entvloeistof) en een niet doorstroomd beënt filter in de koeling. Met de vaten werd 92% recovery bereikt, aan de kraan 68% en met een niet doorstroomd filter 69%.

De nieuw ontwikkelde recoverymethode voor op locatie geeft een lagere gemiddelde recovery dan de eerder toegepaste methode met vaten. Bij de recoverybepaling met vaten werden de organismen verdeeld in het water en vervolgens gefiltreerd, waardoor een deel van de organismen korter blootstond aan stress door filtratie. Dit kan de hogere recovery van de eerdere experimenten verklaren. Een andere mogelijkheid is dat de *E. coli* uit diepvriescupjes anders reageren op de condities dan die uit entflessen.

Het is opvallend dat de niet doorstroomde filters dezelfde recovery geven als de doorstroomde filters en duidelijk lagere tellingen geven dan de buizen met entvloeistof die onder verschillende condities zijn bewaard (zie Figuur 7). Blijkbaar heeft het aanbrengen en verblijf van *E. coli* op het filter een nadelige invloed op de overleving van *E. coli*, zelfs wanneer deze op het laboratorium in de koeling worden bewaard. Het doorstromen van het filter aan de tap sampler blijkt op het laboratorium geen nadelig effect te hebben op de recovery. Het filtreren met de filterhouder lijkt wel invloed te hebben op de recovery ten opzichte van filtratie in een filterbeker. Hiervoor zijn verschillende verklaringen mogelijk:

- filters drogen gedeeltelijk uit, wat de overleving van *E. coli* negatief beïnvloed
- bacteriën hechten zich aan het materiaal van de filterhouder bij het aanbrengen van de ent
- bacteriën worden dichter bij elkaar gebracht door de filterhouder en zo als één kolonie geteld
- bacteriën worden sneller geïnactiveerd in de filterhouder door toxische stoffen in het filter of de houder
- bacteriën adheren aan elkaar door stress
- het verschil is het gevolg van variatie en een gering aantal waarnemingen

Conclusie is dat een recovery van 68% haalbaar is met de tap sampler methode. Onduidelijk is of de tap sampler methode aan de kraan een nadelige invloed heeft op de recovery of dat de methode van recoverybepaling leidt tot een lage waargenomen recovery.



Figuur 8 Recovery van filtratie met de tap sampler

Effect filtratie met tap sampler op locatie

De recovery van de tap sampler op de locaties is bepaald door meting G (recovery op locatie) te vergelijken met meting A (concentratie entvloeistof). In Figuur 8 zijn de resultaten op locaties A, B en C vergeleken met de eerdere recoverybepalingen op het laboratorium met vaten (met diepvriescupjes), aan de kraan (met entvloeistof) en een niet doorstroomd beënt filter in de koeling. Op locatie A werd geen *E. coli* teruggevonden, wat overeen komt met <2% recovery. Bij locatie B en C werden respectievelijk 36% en 23% van de ent teruggevonden. Dit is eenderde tot de helft van de recovery met dezelfde methode op het laboratorium.

De aanwezigheid van veel koper in het water op locatie A en de inactivatie van *E. coli* als gevolg daarvan zijn aangetoond (zie Tabel 2 en Figuur 6). Dit zal ook inactivatie van bacteriën op het filter veroorzaken wat resulteert in de lage recovery. De waterkwaliteit op locatie B resulteerde niet in inactivatie van *E. coli* (zie Figuur 6) en op locatie C was deze beperkt. Hierbij was de blootstelling echter beperkt tot circa 1 uur. Bij een langere blootstelling van circa 24 uur vindt mogelijk wel inactivatie plaats als gevolg van de waterkwaliteit.

Op basis van Figuur 7 werd geconcludeerd dat omgevingsfactoren geen verklaring vormen voor hogere inactivatie van *E. coli* op locatie als deze in de entvloeistof zitten. Uit Figuur 8 blijkt echter dat *E. coli* op een filter sneller inactieveert. Wanneer *E. coli* op het filter is aangebracht, is deze mogelijk gevoeliger voor omgevingsfactoren. De filters op locatie ondervinden omstandigheden die de recovery kunnen verstoren. Er treden temperatuurwisselingen op bij het vervoeren van het filter op ijs, op locatie bij de tap sampler en bij het vervoer terug. Daarnaast is het filter onderhevig aan bewegingen en mogelijk schokken, waarbij opwerveling en bezinking van bacteriën in de filterhouder kan hebben plaatsgevonden. Vervolgens kunnen bij het droogtrekken van de filterhouder bacteriën zijn achtergebleven in de filterhouder. Naspoelen van de filterhouder met water, eventueel met zoutoplossing of een medium, zou de recovery kunnen verbeteren.

Samengevat zijn de volgende oorzaken mogelijk voor de lagere recovery op locatie:

- Water op locatie B en C inactieveert *E. coli* wel bij een langere blootstelling
- Omgevingsfactoren hebben meer invloed op overleving van *E. coli* wanneer deze op een filter zijn aangebracht

Conclusie is dat de aantoonbare recovery op locatie lager is dan gewenst (23% tot 36%). Blijkbaar zijn de omstandigheden op locatie minder gunstig dan in het laboratorium. Nader onderzoek is nodig om de oorzaken te achterhalen en de aantoonbare recovery te verbeteren. De waterkwaliteit op locatie kan daarbij een rol spelen.

Discussie

De experimenten zijn uitgevoerd om de gevoeligheid en de recovery van de tap sampler methode op locatie te bepalen, en de factoren die de recovery bepalen te identificeren. Op het laboratorium werd een recovery van circa 70% gehaald. Een dergelijk hoge recovery is acceptabel voor het distributieonderzoek. De recovery op locatie bedroeg circa 30%, wat lager is dan gewenst. Deze recovery kan worden gezien als de "worst case" recovery, omdat bij de recoverymeting de bacteriën vanaf de start op het filter aanwezig zijn. In de praktijk zullen de *E. coli* bacteriën ook korter op het filter kunnen zitten en daardoor minder worden blootgesteld aan factoren die de recovery nadelig beïnvloeden.

Daarnaast kan de methode van recoverybepaling een nadelige invloed hebben op de waargenomen recovery. De in entflessen gekweekte bacteriën kunnen gevoeliger zijn voor de condities tijdens monsternamen dan bacteriën die in het drinkwater zitten. Ook kan reeds inactivatie plaatsvinden in het traject voordat het beënte filter aan de tap sampler wordt aangebracht, zodat de recoverybepaling een onderschatting geeft. De omgevingscondities bij transport naar en van monsterlocatie kan worden verbeterd op de punten temperatuurschommelingen, wel/niet schudden en blootstelling aan licht.

Conclusies

De conclusies kunnen als volgt worden samengevat:

- De recovery op locatie (23-30%) is lager dan op het laboratorium (70%)
- De hoge koperconcentratie op locatie A veroorzaakte inactivatie en daarmee een lage recovery (<2%)
- De waterkwaliteit op locatie B geeft geen inactivatie binnen 1 uur, het effect van langere blootstelling moet worden onderzocht
- De waterkwaliteit op locatie C geeft mogelijk beperkte inactivatie na 1 uur, het effect van langere blootstelling moet worden onderzocht
- De behandeling van bacteriën in water naar de locatie geeft geen duidelijke inactivatie
- Het beënten van filters en 24 uur bij 4°C bewaren reduceert de recovery tot 70%
- Filters wel of niet doorstromen met water van KWR heeft geen effect op de recovery
- Op locatie (Amersfoort) kan met de huidige methode 23% tot 36% recovery worden aangetoond
- De ontwikkelde recoverymethode resulteert in een lagere recovery dan de eerdere methode, de methodes verschillen op de punten:
 - Ent vanuit entflessen versus diepvriescupjes
 - Beënten van filters versus beënten van water
 - Voeding uit de kraan versus voeding uit doseervat

II Tapsampler gebruikersprotocol

PROJECT TAP SAMPLER ANNEN



Gebruikershandleiding

Patrick Smeets & Edwin Kardinaal
Oktober 2011

Monstername met tap sampler in Annen

Introductie

In het kader van het BTO onderzoek “Veilige Distributie” zullen extra metingen plaatsvinden in het distributienet. Doel van deze metingen is om beter te bepalen

- hoe vaak en in welke concentraties *E. coli* in het drinkwater aanwezig is
- of er pathogene micro-organismen kunnen worden aangetoond in drinkwater.

Hiertoe wordt een nieuwe manier van monstername aan de kraan gebruikt; de “Tap Sampler”. De tap sampler filtreert het monster aan de kraan met behulp van de waterleidingdruk. Door een zeer lage monsterstroom toe te passen wordt in 24 uur 10 tot 50 liter water gefiltreerd. De filters worden dagelijks verwisseld en geanalyseerd. De verwachting is dat hierdoor beter kan worden bepaald of- en hoe vaak *E. coli* kan worden aangetroffen in gedistribueerd drinkwater. Dit in vergelijking met reguliere monsters van 100 ml die momentaan door het waterbedrijf worden genomen. In Annen wordt de monstername uitgevoerd door medewerkers van WLN die zo voor het dagelijks transport kunnen zorg dragen. De monsters worden bij WLN geanalyseerd op *E. coli*. De aanwezigheid van pathogene micro-organismen wordt later op KWR onderzocht. Monsters worden door WLN geconserveerd. Deze memo omschrijft het onderzoek voor de monsternemers.

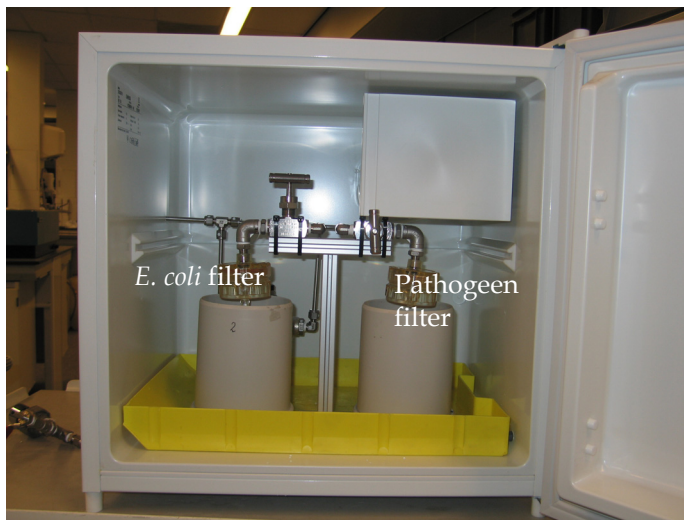


Foto tap sampler in meetopstelling

Werkzaamheden

Een medewerker van KWR komt de tap sampler bij u installeren en verzorgt de eerste instelling. Vervolgens voert u de werkzaamheden uit volgens het monsternameprotocol. Het monsternameprotocol is als bijlage bij deze memo opgenomen. De werkzaamheden bestaan uit het dagelijks 's ochtends:

- vervangen van de filterhouders aan de tap sampler;
- het noteren van gegevens;
- inleveren van monsters op WLN;
- ophalen van nieuwe geprepareerde filterhouders.

Het watergebruik in uw huishouden kan normaal doorgang vinden. De tap sampler is voorzien van een aansluiting voor eigen gebruik. Wij vragen u wel om 'schoon' te werken met deze aansluiting. Belangrijk is dat bijvoorbeeld bij het aansluiten van een tuinslang er geen druk wordt opgebouwd in de tuinslang.

Een aangesloten tuinslang moet altijd vrij kunnen uitstromen. Anders bestaat het risico dat water uit de slang terugstroomt in de tap sampler en het monster verontreinigt. Wilt u op het monsteretiket vermelden wanneer een aansluiting wordt gemaakt op dit punt? Voor gebruik met vrije uitstroom is dit niet nodig.

Materialen

Per monsterpunt zijn de volgende materialen nodig

- 1 Tap sampler unit + eventueel pasmaterialen

- 6 Filterhouders (waarvan 2 geplaatst)
- 2 Regenmeters met afleesunit
- 1 kleine koelbox
- 2 koelelementen
- Monsteretiketten
- Steriele zakken
- Parafilm
- Handschoenen
- 4 Luerlock dopjes (dichtgesmolten)

Codering filterhouders

De filterhouders zijn voorzien van een nummer. De filters worden aangeleverd in een steriel zakje met daarop een code:

- (E): *E. coli* filter (0,45 µm)
- (P): Pathogeen filter (0,04 µm)
- 3 cijfers voor het volgnummer van het filter. Alle filterhouders krijgen een uniek nummer

Monsteretiket

Ieder monster wordt voorzien van een etiket waarop door de monsternemer wordt genoteerd:

- Datum start
- Tijd start
- Tijd einde
- Afgelezen hoeveelheid gefiltreerd water in mm
- Code filterhouder
- Nummer regenmeter

Monsterdata

Monstername wordt wekelijks gestart op maandagochtend, zodat monsters van dinsdag tot en met vrijdag op het laboratorium kunnen worden verwerkt. Wanneer monstername of transport van monsters naar WLN niet mogelijk is, b.v. door vakantie of afspraken buiten de deur, zoekt de monsternemer zelf een oplossing. Bijvoorbeeld door een monster bij een collega te brengen voor transport, of door een buurman de monstername te laten starten. Indien geen oplossing wordt gevonden overleggen met Gerhard Wubbels. Wanneer het een langere periode betreft, kan in overleg met Gerhard worden overwogen het monsterpunt te verplaatsen zodat monstername doorgang kan vinden. Met het laboratorium zijn de volgende data afgesproken waarop de monsters van de Tap Sampler kunnen worden aangeleverd:

	di	wo	do	vrij	Opmerkingen
maart		7	8	9	
	13	14	15	16	
	20	21	22	23	
	27	28	29	30	
april	3	4	5	6	
	10	11	12	13	
	17	18	19	20	
	24	25	26	27	
mei	1	2	3	4	
	8	9	10	11	
	15	16	17	18	
	22	23	24	25	

De monsters kunnen in de ochtend worden aangeleverd. Bij inleveren kunnen gelijk nieuwe filterhouders meegenomen worden.

Startdebiet instellen

De hoeveelheid water die in 24 uur wordt gefiltreerd wordt geregeld door de drukregelaar en de regelafsluiters op de tap sampler in te stellen. Deze regeling is een benadering omdat de vervuiling van het filter, drukschommelingen en verschillen tussen individuele filters allemaal invloed hebben op de filtratiesnelheid. In principe zal filtratie over het pathogeenfilter met een hoge snelheid starten (circa 5 L/h) en vervolgens afnemen (tot circa 2 L/h). Bij het *E. coli* filter zal het verloop minder groot zijn. In onderstaande tabel staan de streefwaarden en de geschatte instellingen voor monsternamen in Annen. Het *E. coli* filter is voorzien van een drukregelaar. Eerst wordt de afsluiter volledig geopend en het debiet gereduceerd door de drukmeter in te stellen: Zwarte dop verwijderen en met een inbussleutel "los" draaien tot het debiet afneemt. Indien het debiet toch te hoog blijft, kan met de regelafsluiter verder worden "geknepen" tot het gewenste debiet.

	<i>E. coli</i>	Pathogeen
L/24 uur	10	50
mm/24 uur	900 mm	4500
Start tikken/min	2 a 3	25
Indien nodig bijstellen!		

Regenmeter bedienen

De regenmeters worden gebruikt om het totale volume gefiltreerd water te meten. Het aantal mm wordt omgerekend naar het totale volume. Omdat deze omrekening per regenmeter kan verschillen vindt deze omrekening plaats door KWR. De meetunits staan direct onder de tap sampler. Het gefiltreerde water drupt direct in de regenmeter. Iedere regenmeter heeft een uniek nummer. Zet de regenmeter met het laagste nummer onder de *E. coli* filterhouder, en de andere onder de pathogeenfilterhouder. Water stroomt 'vrij' onder uit de regenmeters. De regenmeters werken radiografisch, dus de afleesunits kunnen op een geschikte plaats (in huis) worden geplaatst. Het signaal is hierdoor iets vertraagd, zodat het enkele minuten kan duren voordat een gemeten volume (tik van de regenmeter) wordt geregistreerd. De afleesunits zijn voorzien van een uniek nummer dat overeenkomt met het nummer van de meetunit. Druk een aantal malen op de knop [Rain setting] totdat 'RAINFALL TOTAL' zichtbaar is op het afleesscherm. Vervolgens de knop [Rain setting] ingedrukt houden totdat de afgelezen hoeveelheid weer op 0 mm staat. De regenmeter is nu klaar om te meten. Na iedere meting van 24 uur stelt u weer de totale hoeveelheid in op 0 mm.

De tap samplers zijn in een koelkast geplaatst. Op deze wijze blijven de filters en de eventuele organismen tijdens monsternamen gekoeld. De koelkasten zijn bij aanlevering ingesteld op ca. 4-6 ° C. Als op de afleesunit de buitentemperatuur lager wordt dan 2 ° C dan de koelkast iets bijstellen (hoe hoger het getal hoe kouder!). Mocht het buiten vriezen, dan de sampler volledig leeg laten lopen en de monsternamen stopzetten. De regenmeter kan tijdelijk verwijderd worden, dit voorkomt schade aan de apparatuur.

Af te lezen
buitentemperatuur

Af te lezen hoeveelheid
water in mm

Toets [RAIN SETTING]



Protocol Tap Sampler 29 september 2011

Aanbrengen tap sampler

De tap sampler wordt eenmalig geplaatst (door een lab medewerker) volgens onderstaande procedure. Vervolgens blijft de tap sampler 3 maanden in gebruik

1. Plaats de tap sampler onder de kraan
2. Sluit aan de kraan aan (gebruik handschoenen)
3. Open alle afvoeren van de tap sampler (filter aansluitingen en bleed) en laat dit gedurende 1 minuut doorstromen met een sterke straal
4. Sluit alle afsluiters van de tap sampler, maar laat de leidingkraan open
5. Plaats filterhouders volgens onderstaande procedure (eventueel tot die tijd afdekken met dopje)
6. Steek de stekker van de koelkast in het stop contact en stel de koelkast in.

Aanbrengen nieuwe filterhouder

1. Haal de filterhouder met lettercode eindigend op 'E' (Bacteriologische membraan van 0.45 µm) uit de steriele zak
2. Let op dat de openingen niet met de handen worden aangeraakt!
3. Draai de filterhouder aan filteraansluiting 1 van de tap sampler
4. Plaats de filterhouder met lettercode eindigend op 'P' (pathogeen membraan van 0,04 µm) op dezelfde wijze aan filteraansluiting 2.
5. Regel indien nodig de doorstroming van de filters in op het gewenste debiet met de afsluiter zoals in de tabel voor uw distributieregio aangegeven.
6. Noteer de datum en starttijd op het monstername etiket
7. Laat het filter op locatie circa 24 h doorstromen

Vervangen filterhouders

1. Werk met handschoenen!
2. Lees de regenmeters af, noteer het totale aantal mm op het monstername etiket
3. Reset de regenmeters door knop 'Rain setting' ingedrukt te houden.
4. Noteer de eindtijd op het monstername etiket.
5. Sluit de leidingkraan, en laat de tap sampler kranen in hun stand staan.
6. Draai de filterhouder in zijn geheel los van de tap sampler
7. Dicht de bovenafsluiting van de filterhouder af met een dopje.
8. Dicht de onderkant af met parafilm.
9. Stop de filterhouder in een steriele zak, rol het open einde dicht
10. Controleer of alle gegevens op het etiket zijn ingevuld
11. Plak het betreffende monsteretiket op de zak en bewaar het filter in de koelbox met koelelement
12. Plaats nieuwe filters (zie hierboven)
13. Breng de gebruikte filters dezelfde dag gekoeld, in de koelbox met koelelement, naar het laboratorium voor analyse en neem direct geprepareerde filterhouders mee.

Contactpersonen:

Edwin Kardinaal: edwin.kardinaal@kwrwater.nl; 030-6069711; 06-54290049

Gerhard Wubbels: G.Wubbels@wln.nl; 050-4022121

III Detectiekans verontreiniging in voorzieningsgebied Annen

Auteurs

Ad Vogelaar en Mirjam Blokker

Inhoud

Inhoud		1
1	Methode en modelsysteem	3
1.1	Inleiding	3
1.2	Opbouw van hydraulisch model	3
1.3	Methode voor het doorrekenen van scenario's	4
1.4	Locaties van gesimuleerde verontreinigingen	5
2	Resultaten	7
2.1	Detectiekans en effectiviteit	7
2.2	Toelichting en onderbouwing	8
3	Literatuur	11

1 Methode en modelsysteem

1.1 Inleiding

De kans op detectie van een (fecale) verontreiniging wordt bepaald door de periode waarin de concentratie van de verontreiniging hoger is dan de detectiegrens en de kans dat er in de periode een monster genomen wordt. Door verontreiniging en detectie in een hydraulisch netwerkmodel na te bootsen en de resultaten te analyseren wordt een antwoord op de onderzoeksvragen gevonden:

1. Wat is de pakkans van een willekeurige besmetting bij een specifieke bulkbemonstering?
2. Wat is de pakkans van dezelfde willekeurige besmetting bij een reguliere Rewab-bemonstering?
3. Wat is de winst van de eerste methode ten opzichte van de tweede methode?

1.2 Opbouw van hydraulisch model

Relevante kenmerken van modelgebied Annen zijn:

- geen reservoirs buiten de pompstations aanwezig;
- circa 335 km leiding;
- 4 monsterpunten;
- transport naar naburige verbruiksgebieden vindt hoofdzakelijk via de transportleiding plaats.

Van voorzieningsgebied Annen is een leidingnetmodel gebouwd met de volgende kenmerken:

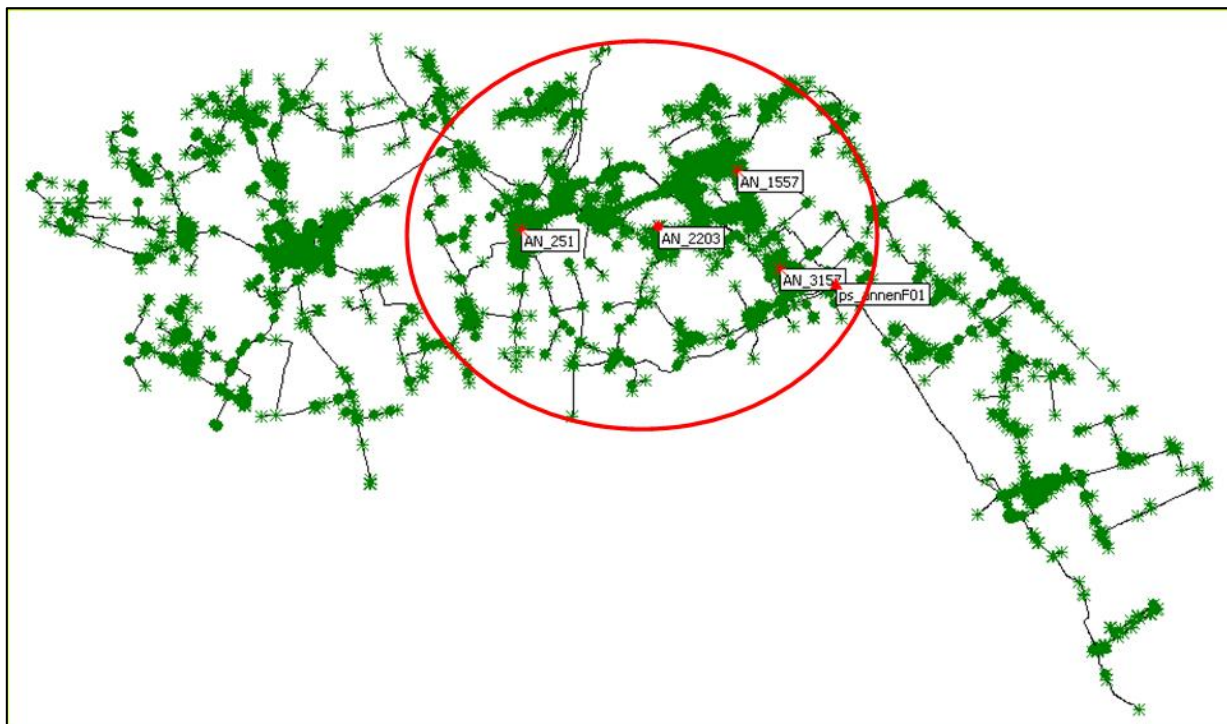
- standaard verbruikspatroon voor huishoudelijk verbruik van een gemiddelde dag
- de transportleiding (diameter 500mm) van af PS Annen door het voorzieningsgebied levert continu 171 m³/h aan PS De Punt

Van de vier monsterpunten zijn de dichtstbijzijnde modelknopen bepaald. De vier monsterlocaties met bijbehorende modelknopen zijn:

- Tipkampen, 9481 EV Vries (AN_251)
- Kampweg, 9483 TG Zeegse (AN_2203)
- Ritmeesterlaan, 9471 MT Zuidlaren (AN_1557)
- Ronkelskamp, 9468 EP Annen (AN_3157)

Om rekentijd te sparen is van het oorspronkelijke Infoworks netwerkmodel een uitsnede 'modelgebied' gemaakt rond de vier monsterpunten met behoud van de hydraulische kenmerken; zie Figuur 1-1. Dit rekenmodel bevat circa 3200 knopen en 335 km leiding. Deze leidinglengte wordt representatief geacht voor het 'detectiegebied' van de vier monsterpunten.

KWR bedankt Rishi Soekhai en Nico van der Moot van WMD voor het beschikbaar stellen van het basisgegevens en het netwerkmodel van Annen.



Figuur 1-1 Oorspronkelijk netwerk van verbruiksgebied Annen met binnen de rode markering het voor dit project 'representatieve' modelgebied met de vier monsterlocaties en PS Annen

1.3 Methode voor het doorrekenen van scenario's

Uitgangspunten/aannamen:

- De bulkbemonstering bestaat uit 7 dagen/week 24 uur per dag continu bemonsteren; per dag wordt 10 liter mengmonster genomen per meetpunt.
- De Rewab-bemonstering bestaat uit 0,1 liter monster op een meetpunt tussen 9 en 17 uur (meetfrequentie eens per kwartaal).
- Conservatief stofgedrag, dus geen groei en geen afname.
- Concentratie wordt alleen bepaald door diffusie en transport in het net.
- Tijdens de simulatie vindt op de monsterpunten geen extra onttrekking plaats bovenop het normale (huishoudelijk) verbruik.

Opzet rekenscenario's:

- één simulatie-rekenrun bestaat uit het toedienen van 10 standaard verontreinigingen op willekeurige plaatsen in het leidingnet (Infoworks kan in één run maximaal 10 verschillende verontreinigingen simuleren);
- op de verontreinigingslocaties wordt van 0:00 tot 16:00 uur met een volumestroom van 10 liter/uur een fictieve verontreiniging toegediend;
- vervolgens wordt op vier knopen het kwaliteitsverloop berekend gedurende 5 dagen. Het hydraulisch interval is 1 uur. Het interval van de tussenstappen voor de waterkwaliteitsberekeningen is voor de gewenste nauwkeurigheid gekozen als 2 minuten.
- het kwaliteitsverloop wordt bepaald aan de hand van de parameter herkomstpercentage in InfoWorks (vanuit de 10 verontreinigingen middels weergave van het percentage van de verschillende verontreinigingsbronnen). Hiermee is de detectiegrens herleid wanneer de verstoring met een bepaalde concentratie en dosering zou plaatsvinden; zie Tabel 1-1.
- deze simulatierun wordt vijf maal herhaald, dus in totaal dus voor 50 willekeurige verontreinigingslocaties;
- via statistische analyse wordt voor beide monsterstrategieën een kansberekening gemaakt;
- op basis van de 50 verontreinigingen in het gebied en de pakkans per knoop wordt een totaalbeeld van de twee bemonsteringstrategieën gepresenteerd.

Tabel 1-1 Herleiding van de detectiegrens op basis van dosering en concentratie van verontreiniging en simulatieparameters

onderdeel	omschrijving	eenheid	waarde	opmerking
verstoring	dosering	l/u	10	a
	concentratie	KVD/l	1.00E+08	b
simulatie	'detectiegrens' herkomst	%	1.00E-06	c
	dosering	l/u	10	d
	detectiegrens berekend	KVD/l	1	=a/d*b*c/100

Bij de opzet van de rekenscenario's is gebruik gemaakt van de ervaring met berekeningen van het distributienet van Almelo (Blokker en Vogelaar, 2009; Lieverloo e.a., 2004). Vanuit het doel en beschikbare middelen voor dit project zijn er ten opzichte van de eerdere berekeningen een aantal wijzigingen in de opzet doorgevoerd:

- gekozen is voor het rekenpakket Infoworks vanwege de beschikbaarheid van het netwerkmodel en de verwachte efficiëntie in simulatie en uitvoer van resultaten
- binnen de optie waterkwaliteitsberekeningen in Infoworks is de parameter *herkomst* gebruikt omdat hiermee per run 10 verontreinigingsbronnen tegelijkertijd kunnen worden gesimuleerd
- er is 10 liter per uur 'verontreiniging' gedoseerd per verontreinigingsbron vanwege de ondergrens van te simuleren volumestromen van 0,01 m³/u in Infoworks
- de concentratie van 1.10⁸ KVD/l E.coli is gekozen omdat dit overeenkomt met de gemiddelde concentratie in het onbehandelde verzameld rioolwater van twee grote rioolwaterzuiveringsinstallaties in Amsterdam en Rotterdam in 13 vierwelijkse metingen in 1997-1998 (Medema e.a., 2001); deze waarde is ook in de studies van Almelo gebruikt
- de herleiding van de detectiegrens is gerelateerd aan de concentratie van de verstoring in combinatie met deze dosering; zie Tabel 1-1. De waarden in deze tabel zijn een vereenvoudiging van de situatie. De monstergrootte bedraagt voor het steek- en bulkmonster respectievelijk 0,1 en 10 liter. Er is hiervoor geen differentiatie van de detectiegrens voor deze twee manieren van monstername doorgevoerd. We verwachten echter dat door de steilheid van de doorbraakkrommes de effecten van een differentiatie gering zijn.

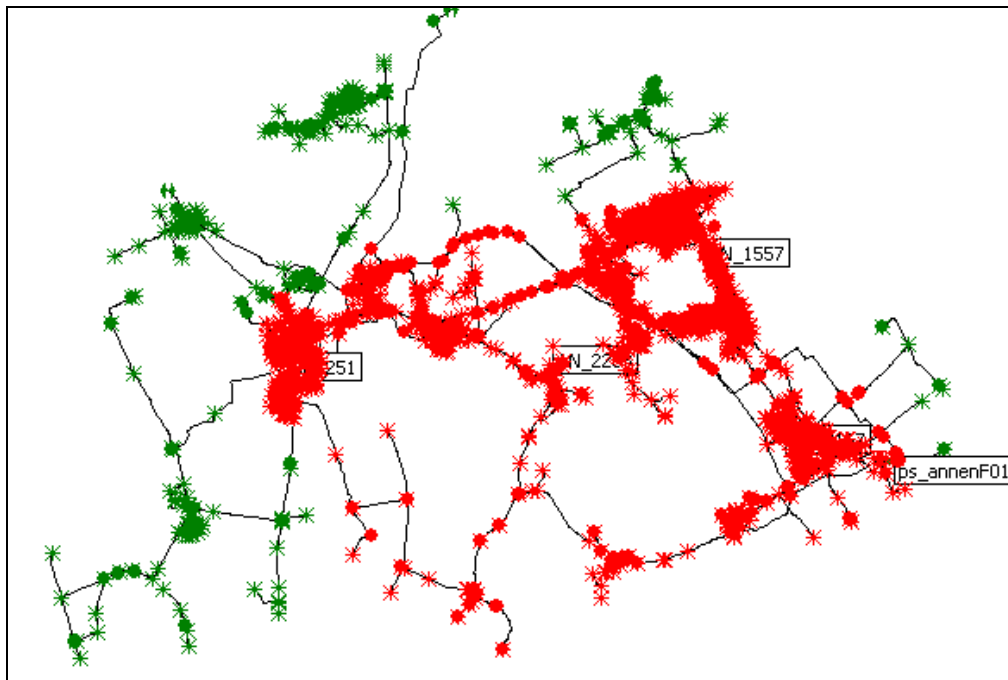
1.4 Locaties van gesimuleerde verontreinigingen

De verontreiniginglocaties zijn alleen in de invloedzone van de meetlocaties gekozen.

- Bij de toewijzing aan leidingen zijn eerst de leeglopende leidingsegmenten (vertakte netten) eruit gefilterd. Deze verontreinigingen hebben immers maar een heel klein verspreidingsgebied.
- Verder is op basis van een berekening van de overwegende stromingsrichting, een significant deel van het net buiten het verontreinigingsgebied gehouden. Met het rekenmodel is de overwegende stromingsrichting bepaald en vervolgens de uitsnede 'verontreinigingsgebied' van het rekenmodel geselecteerd. Het buitengebied en uitlopers waarvan een eventuele verontreiniging niet naar één van de vier monsterpunten kan stromen zijn op deze wijze uit het model gefilterd.

Om rekentijd te sparen is van het modelgebied een uitsnede 'verontreinigingsgebied' gemaakt rond de vier monsterpunten met behoud van de hydraulische kenmerken; zie Figuur 1-2. Bij het berekenen van de detectiekansen is een omrekenfactor voor de gebiedselectie bepaald; zie Tabel 1-2.

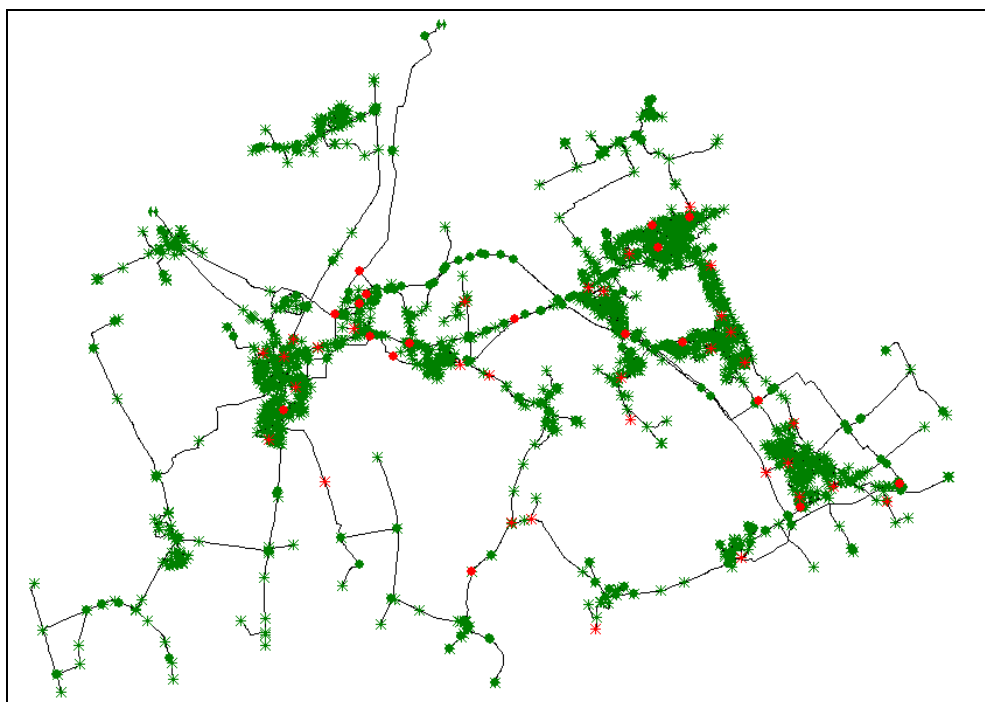
Het 'verontreinigingsgebied' omvat circa 1900 knopen en 225 km leiding. De verontreiniginglocaties zijn random gekozen over de totale (resterende) lengte van de leidingen. De kans is voor alle leidingen gelijk. Er is dus geen onderscheid gemaakt naar ligging, diameters, materiaal of jaartal. Figuur 1-3 geeft een beeld van de 50 verontreinigingslocaties.



Figuur 1-2 Modelgebied Annen (groen) en verontreinigingsgebied (rood) met weergave van de knoopcode van de vier monsterlocaties

Tabel 1-2 Correctie van het aantal verontreinigingslocaties voor berekening van de detectiekans

gebiedselectie	totale leidinglengte (m)	omrekenfactor gebiedselectie	aantal verontreinigingslocaties
verontreinigingsgebied (simulatie verontreiniging)	224565	1	50
modelgebied (representatief voor berekening detectiekans)	334669	1.49	74.5



Figuur 1-3 Modelgebied Annen met 50 'random gekozen' verontreinigingslocaties

2 Resultaten

2.1 Detectiekans en effectiviteit

De effectiviteit van continue bulkbemonstering is circa 65 maal zo groot als van een reguliere steekproefbemonstering.

In Tabel 2-1 en Tabel 2-2 zijn de relevante parameters voor berekening van de detectiekans voor beide monsterwijzen weergegeven. De dicht gedrukte getallen zijn verkregen uit analyse van de berekeningsresultaten. De berekende detectiekansen gelden voor de combinatie van de vier monsterpunten in gebied Annen. De gecorrigeerde gemiddelde detectiekans per monsterlocatie voor de steekproefbemonstering bedraagt circa $(0,45\%/4=)$ 0,11%.

Bij de simulatie en berekening van detectiekans in Tabel 2-2 is uitgegaan van 7 dagen per week gedurende 24 uur bulkbemonstering per dag. Bij 3 dagen per week monsteren gedurende 24 uur per dag schatten we een halvering van het aantal gedetecteerde verontreinigingen in; dus van 22 naar 11. De gecorrigeerde detectiekans zal dan circa 15% bedragen. De effectiviteit is in dat geval circa 32 maal groter dan de steekproefbemonstering.

Tabel 2-1 Berekening van de detectiekans voor reguliere steekproefbemonstering

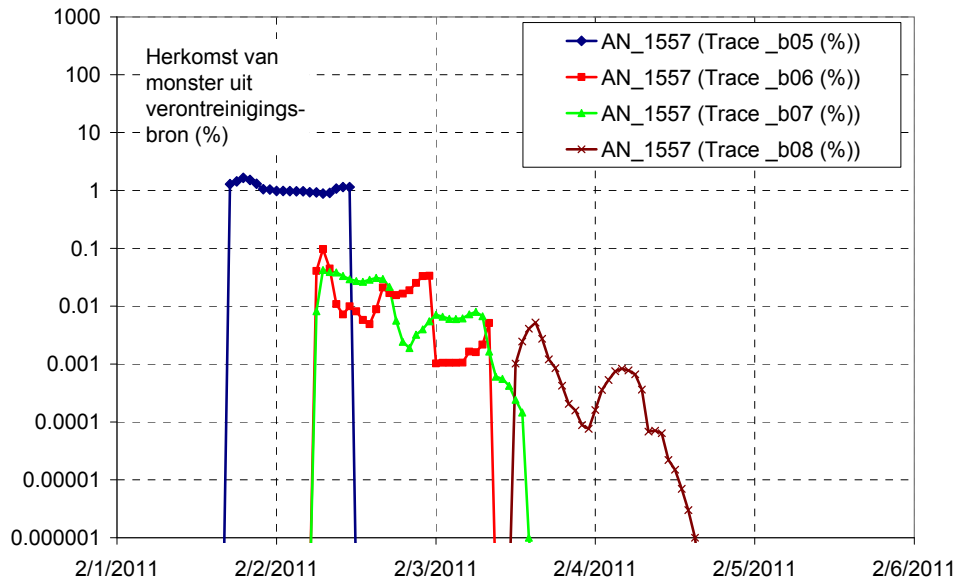
<i>simulatie steekproefbemonstering</i>	<i>totaal aantal monsters boven de detectiegrens met 4 monsterpunten</i>	<i>aantal verontreinigingen</i>	<i>detectiekans met 4 monsterpunten</i>	<i>gecorrigeerde detectiekans i.v.m. gebiedselectie</i>
bij 24 monsters per dag per monsterpunt	733			
1 steekproef per kwartaal	0.33562 =733/(24*91)	50	0.67%	0.45%

Tabel 2-2 Berekening van de detectiekans voor continue bemonstering

<i>simulatie bulkbemonstering</i>	<i>aantal verontreinigingen die minimaal 1 maal gedetecteerd worden met behulp van 4 monsterlocaties</i>	<i>aantal verontreinigingen</i>	<i>detectiekans met 4 monsterpunten</i>	<i>gecorrigeerde detectiekans i.v.m. gebiedselectie</i>
continu; 7dagen per week, 24 uur per dag	22	50	44.0%	29.5%

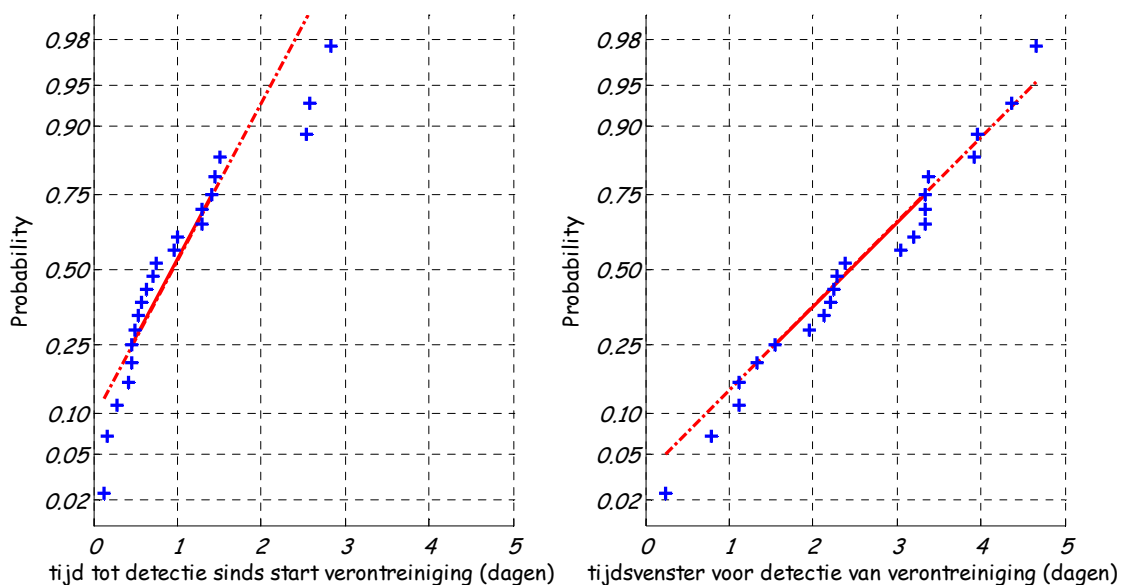
2.2 Toelichting en onderbouwing

In deze paragraaf worden aan de hand van een aantal figuren en tabellen de berekende resultaten toegelicht. Figuur 2-1 geeft als voorbeeld de simulatieresultaten van vier doorbraakkrommes op monsterpunt AN_1557 en laat onder andere de variatie zien van het herkomstpercentage vanuit een verontreinigingsbron. Uit deze grafiek blijkt dat het toepassen van een detectiegrens van een factor 100 hoger maar een zeer beperkt effect heeft op de pakkans.



Figuur 2-1 Voorbeeld van doorbraakkrommes van met herkomstpercentages op monsterpunt AN_1557 vanuit vier verontreinigingslocaties

Daarnaast is er per combinatie van monsterlocatie en verontreinigingsbron ook een zekere variatie in de tijd tot detectie sinds de start van de verontreiniging en het tijdsvenster voor detectie; zie Figuur 2-2. De tijd tot eerste detectie (van de 22 van de 50 verontreinigingsbronnen die worden gedetecteerd op ten minste een van de vier monsterlocaties) is gemiddeld 1 dag, maximaal 3 dagen (linkergrafiek). Het tijdsvenster waarbinnen verontreinigingen gedetecteerd kunnen worden is gemiddeld iets minder dan 2,5 dag, maximaal 5 dagen (rechtergrafiek).

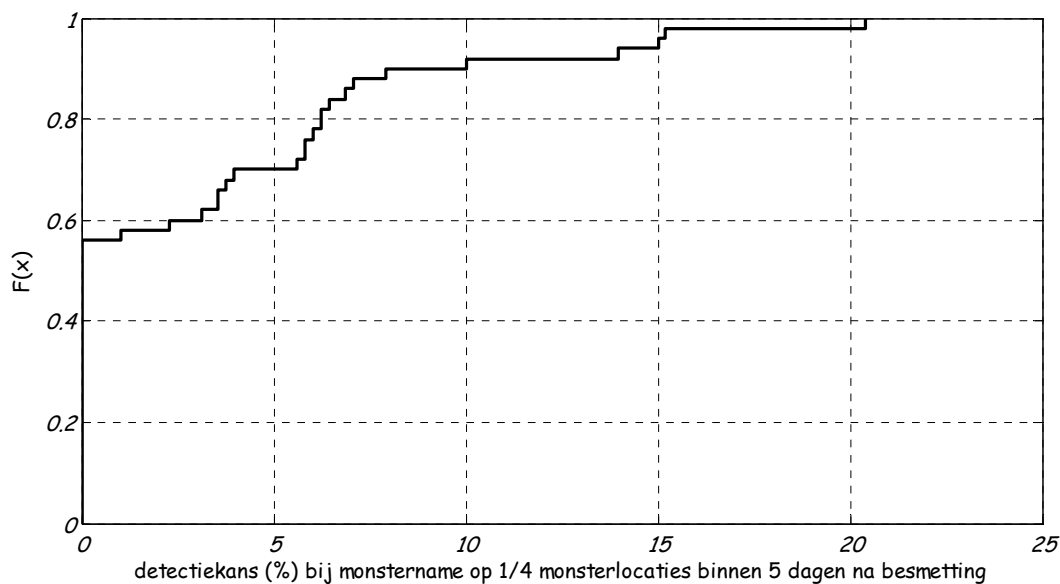


Figuur 2-2 Kansverdeling van tijd tot detectie (links) en tijdsvenster voor detectie (rechts)

Voor continue monsternamen geldt dat 28 van de 50 besmettingen op geen van de 4 locaties gevonden worden. Voor de overige 22 geldt een detectiekans bij Rewab-monsternamen op één van de 4 locaties binnen 5 dagen na de besmetting van 1 tot maximaal 20 %; gemiddeld is dit 3,0% per besmetting (Figuur 2-3).

Aangezien verontreinigingen zelden voorkomen en er eens per kwartaal (1 per 91 dagen) een monster wordt genomen in dit gebied, wordt verondersteld dat de kans op een monsternamen binnen 5 dagen na de besmetting gelijk is aan 5/91. De kans dat een verontreiniging wordt gedetecteerd met reguliere monsternamen met vier monsterpunten is dan gelijk aan $(3\% * 5 / 91 * 4 =)$ 0,67%; gecorrigeerd voor gebiedselectie wordt dit 0,45%.

Voor continue monsters geldt dat 22 van de 50 besmettingen worden gedetecteerd (44% of gecorrigeerd 29,5%). Het continue monsternamen vergroot de kans van detectie van een willekeurige verontreiniging dus met een factor 65.



Figuur 2-3 Detectiekans bij 1 monsternamen per uur op vier monsterpunten gedurende vijf dagen.

Toelichting bij Figuur 2-3:

$F(x)$ op de verticale as is de fractie van het aandeel verontreinigingslocaties met een oplopende detectiekans. Op de horizontale as is detectiekans per verontreiniging weergegeven. De detectiekans is 0% voor 28 van de 50 besmettingslocaties $F(x) = (28/50 =) 0,56$. De hoogste detectiekans, bij $F(x) = (50/50 =) 1$ bedraagt circa 20%. Dat is bij besmetting b31; zie Tabel 2-3. Binnen vijf dagen wordt op 1 van de 4 locaties de besmetting 94 maal gedetecteerd; omgerekend is dit $94 / (4 * 120) = 20\%$

Tot slot een samenvatting van de simulatiesresultaten in Tabel 2-3. Op basis hiervan kan een uitspraak over afzonderlijke monsterlocaties gedaan worden. Bij meting op alleen de twee locaties AN_1557 en AN_251 worden al 21 van de 22 (score bij vier monsterpunten) verontreinigingen gedetecteerd. Meetpunt AN_3157 lijkt bijvoorbeeld nauwelijks toegevoegde waarde te hebben voor de detectiekans ten opzichte van AN_1557. Dit biedt mogelijkheden om via slimme algoritmes te zoeken naar een combinatie van een nader te bepalen monsterlocaties die samen de grootste detectiekans leveren voor een bepaald gebied.

Tabel 2-3 Aantal uren met monster boven detectiegrens en aantal minimaal eenmaal gedetecteerde verontreinigingen

bron	aantal monsters boven de detectiegrens				locatie 1 t/m 4
	AN_1557	AN_2203	AN_251	AN_3157	
b00	0	0	0	0	0
b01	0	0	0	0	0
b02	0	0	0	0	0
b03	0	0	0	0	0
b04	0	0	0	0	0
b05	19	0	0	0	19
b06	27	0	0	0	27
b07	32	0	0	0	32
b08	27	0	0	0	27
b09	0	0	0	0	0
b10	37	0	0	0	37
b11	0	0	0	0	0
b12	0	0	0	0	0
b13	0	0	0	0	0
b14	0	0	0	0	0
b15	0	0	0	0	0
b16	0	3	0	0	3
b17	0	20	8	0	28
b18	0	0	0	0	0
b19	0	0	0	0	0
b20	0	0	0	0	0
b21	0	0	0	0	0
b22	0	0	0	0	0
b23	0	0	0	0	0
b24	0	0	0	0	0
b25	47	0	0	0	47
b26	0	0	0	0	0
b27	48	0	0	17	65
b28	47	0	0	24	71
b29	0	0	0	0	0
b30	46	0	0	24	70
b31	68	0	10	16	94
b32	0	21	8	0	29
b33	0	0	0	0	0
b34	0	0	32	0	32
b35	0	0	30	0	30
b36	0	0	0	0	0
b37	0	0	0	0	0
b38	0	0	14	0	14
b39	0	0	10	0	10
b40	0	0	17	0	17
b41	0	0	14	0	14
b42	0	0	10	0	10
b43	0	0	0	0	0
b44	0	0	28	0	28
b45	0	0	0	0	0
b46	0	0	29	0	29
b47	0	0	0	0	0
b48	0	0	0	0	0
b49	0	0	0	0	0
totaal	aantal monsters boven de detectiegrens				733
totaal	aantal verontreinigingen die minimaal eenmaal gedetecteerd worden				22

3 Literatuur

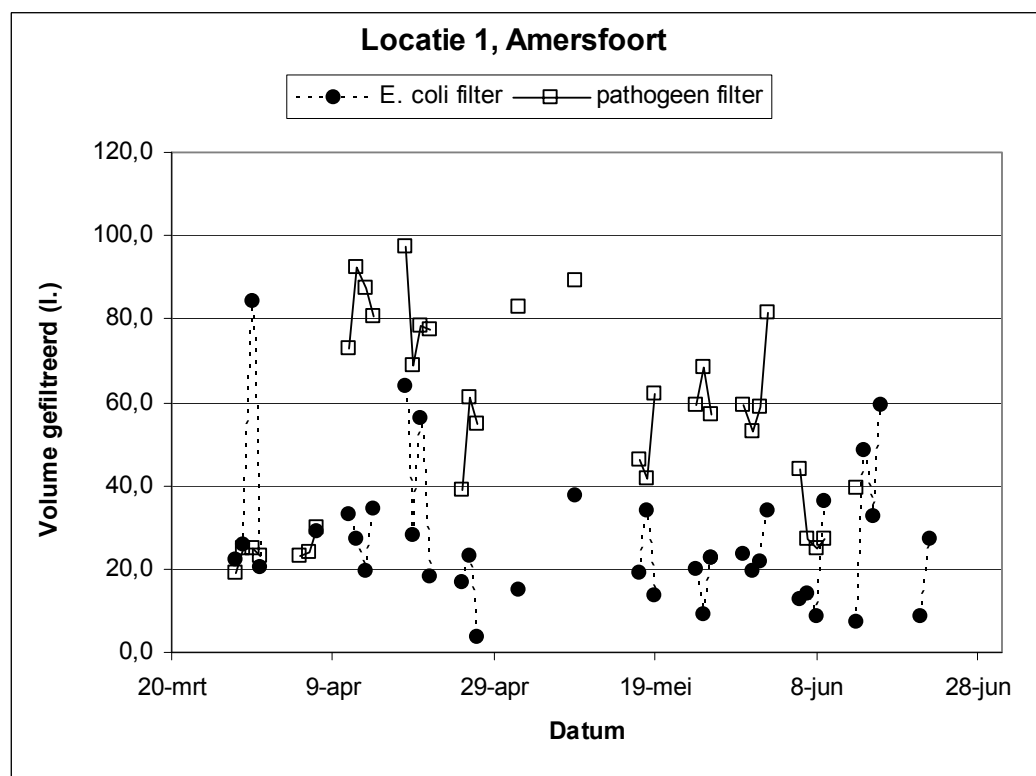
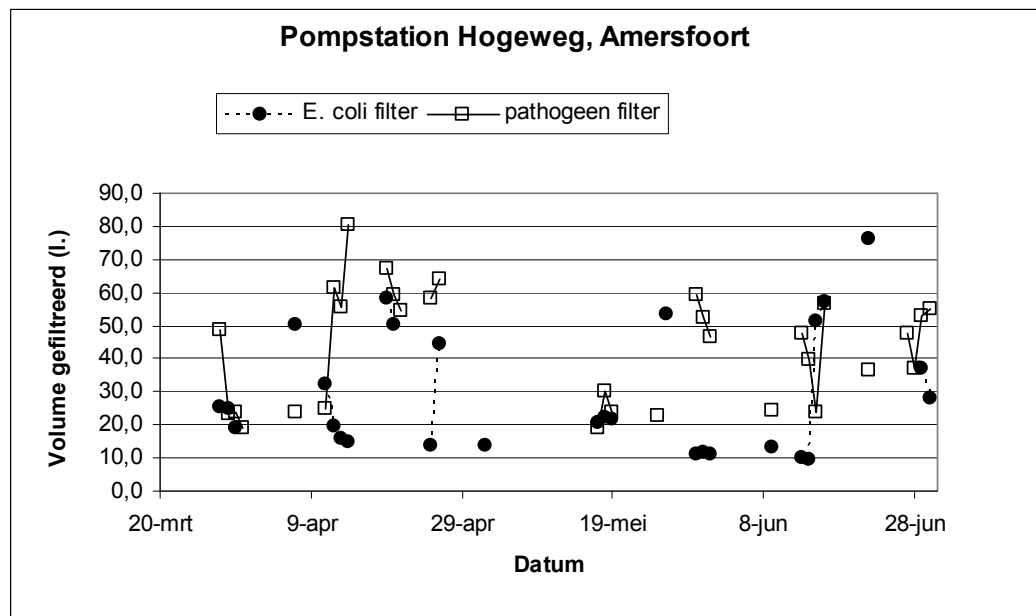
Blokker, E.J.M. en A.J. Vogelaar, 2009. Optimalisatie van meetprogramma E.coli in distributienet. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, BTO 2009.008

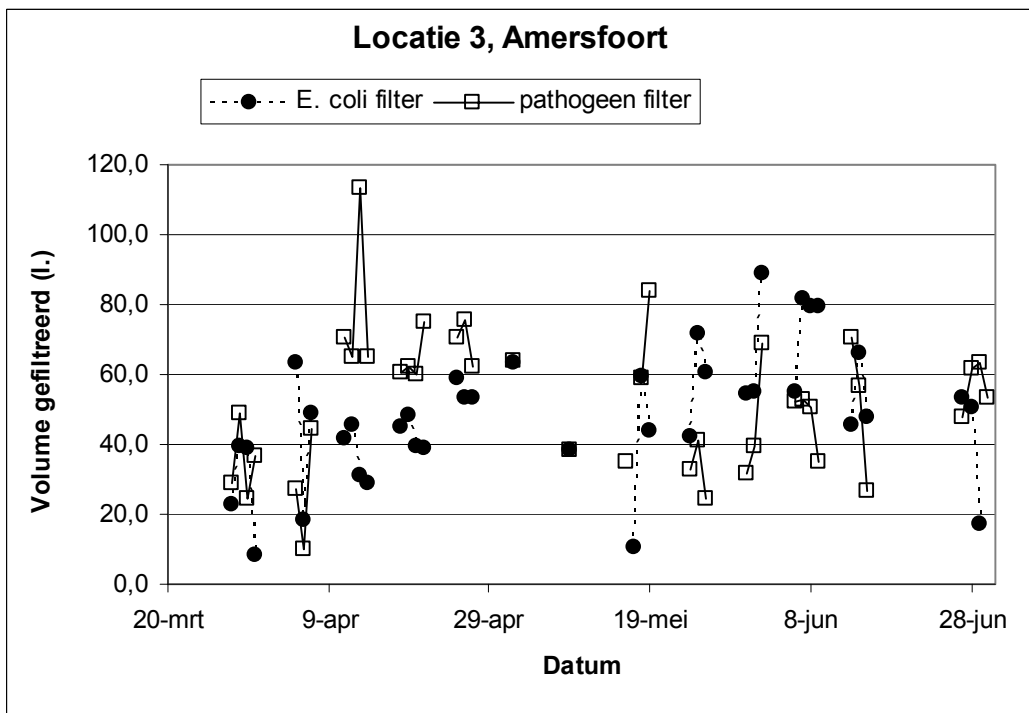
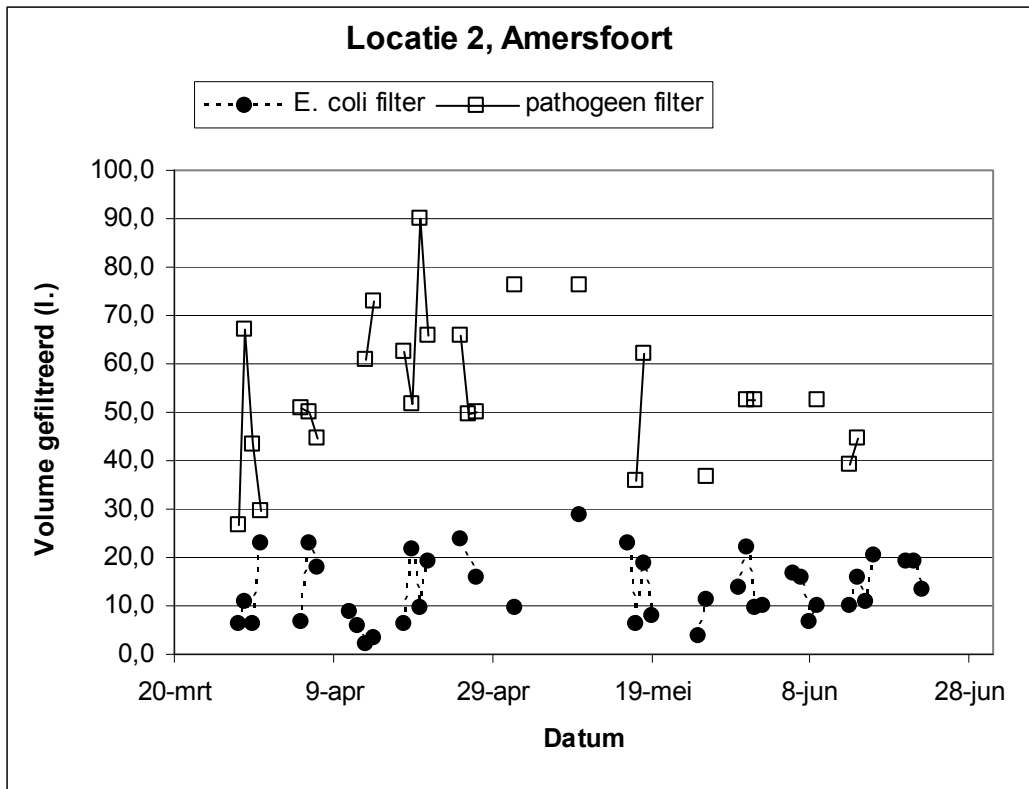
Lieverloo, J.H.M., G.A.M.Mesman, P.K.Baggelaar, A.Hamed en G.L. Bakker, 2004. Detectiekans van fecale verontreinigingen in drinkwaterdistributiesystemen; een oriënterende evaluatie. Kiwa, Nieuwegein, BTO 2004.06

Medema, G.J., H.A.M. Ketelaars en W. Hoogenboezem (red). 2001. Cryptosporidium en Giardia: voorkomen in rioolwater, mest en oppervlaktewater met zwem- en drinkwaterfunctie. RIWA, Amsterdam

IV Volume resultaten

Volumeresultaten voorzieningsgebied pompstation Hogeweg, Amersfoort.





Volumeresultaten voorzieningsgebied pompstation de Bulten, Annen.

