

BTO 2016.076 | September 2016

## **BTO** rapport

DNA merkers voor de  
identificatie van fecale  
verontreinigingsbronnen  
bij ingrepen in het  
leidingnet - eerste  
praktijk ervaringen



# BTO

## DNA merkers voor de identificatie van fecale verontreinigingsbronnen bij ingrepen in het leidingnet - eerste praktijk ervaringen

BTO 2016.076 | September 2016

### Opdrachtnummer

400554/012

### Projectmanager

Dr. L.M. (Luc) Hornstra

### Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Hygiëne en veiligheid

### Kwaliteitsborger(s)

Prof.dr. G.J. (Gertjan) Medema

### Auteur(s)

Dr.ir. M.J.M. (Michiel) Hootsmans en ing. L. (Leo) Heijnen

### Verzonden aan

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

**Jaar van publicatie**  
2016

**Meer informatie**  
ing. Leo Heijnen  
T +31 (0)30 6069743  
E [leo.heijnen@kwrwater.nl](mailto:leo.heijnen@kwrwater.nl)

**Keywords**  
DNA merkers fecale indicatoren  
bronopsporing

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511  
F +31 (0)30 60 61 165  
E [info@kwrwater.nl](mailto:info@kwrwater.nl)  
I [www.kwrwater.nl](http://www.kwrwater.nl)

**KWR** Watercycle  
Research  
Institute

BTO 2016.076 | September 2016 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

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

## BTO Managementsamenvatting

### *Beschouw bodem en grondwater bij werkzaamheden als potentiële fecale verontreinigingsbronnen, vooral van menselijke oorsprong*

**Auteur(s)** dr.ir. M.J.M. (Michiel) Hootsmans en ing. L. (Leo) Heijnen

Fecale verontreiniging van drinkwater is een belangrijk risico bij de watervoorziening. Bij werkzaamheden aan het leidingnet kunnen pathogene micro-organismen een verontreiniging van materialen en drinkwater veroorzaken. De mate waarin bodem en grondwater in de nabijheid van het leidingnet daadwerkelijk verontreinigd zijn met ziekteverwekkers is echter niet goed bekend. Daarnaast is het voor een risico-inschatting nodig om de mogelijke bron van geconstateerde fecale verontreiniging vast te stellen. Dat kan door DNA merkers op te sporen waarmee diverse diergroepen als fecale bron kunnen worden herkend. In dit verkennend onderzoek tijdens geplande werkzaamheden aan het leidingnet bleken fecale indicator organismen in alle onderzochte grondwatermonsters voor te komen, en in de helft van de bodemmonsters. Dit betekent dat bodem en grondwater als potentieel verontreinigd materiaal moeten worden beschouwd. Er kan op basis van deze gegevens echter geen zeker onderscheid worden gemaakt tussen een al dan niet fecale herkomst, omdat coliformen en enterococci óók van nature in de bodem kunnen voorkomen. Daar waar DNA merkers aangetroffen werden, wezen ze in de meeste gevallen op een verontreiniging van humane oorsprong.



*Ingrepen aan het leidingnet: hygiënisch werken in een lastige omgeving*

**Belang:** aard en omvang van risico's op fecale verontreiniging tijdens werkzaamheden

Ingrepen in een drinkwaterleidingnet gaan altijd gepaard met een tijdelijk verhoogde kans op

microbiële verontreinigingen van fecale oorsprong.

In hoeverre grondwater en bodem in de omgeving van een ingreep daadwerkelijk fecaal verontreinigd zijn, is echter niet goed bekend. Ook is de

oorsprong van dergelijke verontreinigingen vaak onduidelijk. Door te onderzoeken in welke mate bodem en grondwater fecaal verontreinigd zijn, wordt meer duidelijk over het risico op verontreiniging van het leidingnet tijdens reparaties. Door te analyseren op DNA merkers die specifiek zijn voor bepaalde diergroepen is het ook mogelijk de bron van fecale verontreiniging te bepalen.

#### Aanpak: gelijktijdige analyse van fecale indicator organismen en DNA merkers

In diverse regio's in Nederland zijn tijdens geplande werkzaamheden aan het drinkwaterleidingnet monsters genomen van water in de sleuf en van de bodem. In het laboratorium zijn hierin vervolgens de hoeveelheden coliforme bacteriën, *E. coli* en enterococci bepaald. Met eerder ontwikkelde DNA merkers is bovendien gezocht naar indicaties voor de mens, hond, herkauwer of vogel als mogelijke fecale verontreinigingsbronnen.

#### Resultaten: Indicator organismen niet altijd te herleiden tot een fecale bron

Alle onderzochte watermonsters en de helft van de bodemonsters bevatten een of meer typen fecale indicator organismen. In 31% van de watermonsters en 10% van de bodemonsters werd ook met DNA merkers een fecale herkomst vastgesteld. In de meeste gevallen was dit een humane oorsprong, in mindere mate werden ook indicatoren voor honden of herkauwers gemeten. Er werden geen vogelindicatoren gevonden.

#### Implementatie: DNA merkers bieden een nieuwe blik op de herkomst van fecale verontreinigingen

Met name het water, maar ook de bodem rond werkzaamheden vormen een duidelijk risico op introductie van fecale verontreinigingen. In hoeverre aangetoonde fecale indicator organismen echter daadwerkelijk een recente fecale verontreiniging van de omgeving aantonen, is minder zeker. Het gelijktijdig bepalen van DNA merkers voor fecale bronnen kan hier meer duidelijkheid over geven.

Omdat fecale indicatoren vaak in grondwater worden aangetroffen, waarbij de concentraties hoog kunnen zijn, en omdat ze daadwerkelijk van fecale oorsprong kunnen zijn, moeten bij reparaties bodem en grondwater altijd als potentieel verontreinigd materiaal worden beschouwd. Dat stelt hoge eisen aan de voorzorgs- en hygiëne maatregelen die tijdens werkzaamheden worden voorgeschreven en moeten worden gehandhaafd. Bij het constateren van binnendringen van bodem of grondwater in het leidingnet wordt extra grondige reiniging na reparatie door spuien en chloren ten zeerste aanbevolen.

#### Rapport

Dit onderzoek is beschreven in rapport *DNA merkers voor de identificatie van fecale verontreinigingsbronnen bij ingrepen in het leidingnet - eerste praktijk ervaringen* (BTO 2016.076).

# Inhoud

<b>Inhoud</b>	<b>2</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>3</b>
1.1 Aanleiding	3
1.2 Doelstellingen	4
<b>2 Methoden</b>	<b>5</b>
2.1 Monsterlocaties	5
2.2 Methode van bemonstering in het veld	8
2.3 Analyse van fecale indicatoren met diergroep-specifieke DNA merkers	9
2.4 Kweek van fecale indicator organismen	10
<b>3 Resultaten</b>	<b>11</b>
3.1 Fecale indicatoren in watermonsters	11
3.2 Fecale indicatoren in bodemonsters	13
<b>4 Discussie en conclusies</b>	<b>17</b>
4.1 Mate van verontreiniging van bodem en grondwater tijdens werkzaamheden	17
4.2 Relatie tussen kweekresultaten en op DNA detectie gebaseerde mogelijke bronnen	17
4.3 Conclusies	19
<b>5 Referenties</b>	<b>20</b>
<b>Bijlage I Gegevens per locatie</b>	<b>21</b>

# 1 Inleiding

## 1.1 Aanleiding

Fecale verontreiniging van het drinkwaternet tijdens werkzaamheden aan het net, als de druk van de leiding is en het net open ligt, is een belangrijk risico bij de watervoorziening. Na reparatie (en spuien) vindt een waterkwaliteitscontrole plaats door de afwezigheid van indicatororganismen (*E. coli* en enterococci) in 100 ml drinkwater aan te tonen. Deze indicatororganismen komen algemeen voor in fecale verontreinigingsbronnen.

Het verontreinigingsrisico van het drinkwaternet tijdens reparaties hangt af van de mate van verontreiniging van bodem en grondwater in de sleuf waar de reparatie plaatsvindt. Er is geen kennis beschikbaar over hoe vaak bodem of grondwater in de sleuf daadwerkelijk fecaal verontreinigd zijn, en in welke mate. Kennis hierover helpt om het risico beter in te schatten (zie Blokker et al., 2016) en om voorzorgs- en hygiëne maatregelen die moeten worden genomen tijdens reparaties en andere werkzaamheden te onderbouwen.

Daarnaast is het voor zowel de inschatting van het gezondheidsrisico als voor mogelijke beheersmaatregelen van belang te weten waar de fecale verontreiniging in bodem en grondwater vandaan komt. Zijn het lekkende riolen, waar ook hoge concentraties ziekteverwekkers voorkomen? Of zijn het de honden- of vogelfaeces die op maaiveld aanwezig zijn? Daarom is het ook van belang om te kunnen achterhalen van welke diergroep(en) een geconstateerde fecale verontreiniging afkomstig is. Op die manier kunnen maatregelen ter voorkoming van dergelijke verontreinigingen cq. verontreinigingen beter worden ingericht. Onderzoek naar aanvullende of alternatieve parameters kan een betere risicoschatting op basis van waterkwaliteitscontrole mogelijk maken.

In eerder BTO onderzoek zijn diverse DNA-merkers ontwikkeld (Heijnen & Learbuch, 2013) en toegepast (Heijnen, 2015a; Heijnen et al., 2014) waarmee het mogelijk is om de herkomst van fecale verontreinigingen te achterhalen. Bij deze methoden wordt een fragment gekwantificeerd van het DNA (DNA-merker) van specifieke bacterietypen (in veel, maar niet alle gevallen, specifieke vertegenwoordigers van de orde van de Bacteroidales bacteriën), die alleen voorkomen in de darmflora van bepaalde diergroepen. Zo zijn er DNA-merkers ontwikkeld waarmee het DNA van fecale bacteriën van herkauwers, mensen, vogels, varkens en runderen specifiek kan worden aangetoond.

In 2013 is het BTO-project 'Pathogenen in verontreinigingsbronnen' gestart. Doel van dit onderzoek is de aanwezigheid van indicatororganismen voor fecale verontreiniging kwantitatief en diergroep specifiek te karakteriseren als nadere onderbouwing van risicoanalyses van verontreinigingsincidenten en voor bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater en infiltratiewater. Daarvoor is allereerst gewerkt aan het verder methodisch beproeven van de eerder ontwikkelde DNA merkers, en aan hun relatie met fecale indicator organismen in feces van bovengenoemde diergroepen. Ook is een extra DNA detectie methode gerealiseerd voor fecale verontreiniging afkomstig van honden. De resultaten hiervan zijn gerapporteerd in Heijnen (2015b) en gaven aanleiding tot het starten van dit onderzoek in het veld naar de volgende aspecten:

1. De frequentie en mate van fecale verontreiniging van bodem en grondwater in de sleuf tijdens werkzaamheden aan het drinkwaternet (gemeten aan de hand van indicatorbacteriën)

2. De toepasbaarheid van het gebruik van deze DNA merkers bij het vaststellen van de herkomst van fecale verontreinigingen in de sleuf tijdens dergelijke werkzaamheden

Hierbij lag de focus op de bemonstering van locaties waar geplande ingrepen in het drinkwaternet werden gepleegd.

### 1.2 Doelstellingen

Door de analyse van water- en bodemmonsters uit de directe omgeving van werkzaamheden aan het leidingnet, meer inzicht te krijgen in:

- de mate van verontreiniging van de omgeving van werkzaamheden aan het leidingnet
- de toepasbaarheid van diergroep specifieke DNA merkers om bronnen van fecale verontreinigingen op te sporen evenals de herkomst van de verontreinigingen in de sleuf tijdens werkzaamheden
- de mogelijkheden om werkprocedures aan te passen, indien de resultaten van het onderzoek hier aanleiding toe geven.



## 2 Methodes

### 2.1 Monsterlocaties

Een eerste bemonsteringsronde is uitgevoerd in november 2014. Op basis van de planning van de diverse werkzaamheden werd bij Waternet de eerste bemonstering uitgevoerd, op 5 november bij het plaatsen van een overbrugging in een gietijzeren leiding over een nieuw aan te leggen riool in een woonwijk in Amsterdam-Nieuw West (zie Fig. 2.1).

Op 19 november werd bemonsterd bij Brabant Water in Breda, bij een drietal locaties waar drinkwaterleidingen werden vervangen, in woonwijken in het noorden en zuiden van de stad (zie Fig. 2.2 en 2.3).

Op 20 november werd in de ochtend bemonsterd bij Dunea in Bergschenhoek, waar een slecht functionerende brandkraan in een woonwijk werd vervangen (zie Fig. 2.4).

Aansluitend werd op 20 november bemonsterd bij Vitens. Allereerst in Tiel bij de aanleg van een nieuwe hoofdwaterleiding bij de uitbreiding van een industriegebied direct ten noorden van de A15 (zie Fig. 2.5). Vervolgens is nog bemonsterd in Nijmegen in de wijk Neerbosch bij de vervanging van een drinkwaternet in een woonwijk (zie Fig. 2.6).

Uiteindelijk zijn in 2014 dus grondwater- en bodemonsters genomen op in totaal zeven locaties, verdeeld over vier waterbedrijven.



FIG. 2.1. WERKZAAMHEDEN BIJ WATERNET, AMSTERDAM.



FIG. 2.2. WERKZAAMHEDEN BIJ BRABANT WATER, BREDA.



FIG. 2.3. WERKZAAMHEDEN BIJ BRABANT WATER, BREDA.



FIG. 2.4. WERKZAAMHEDEN BIJ DUNEA, BERGSCHENHOEK.

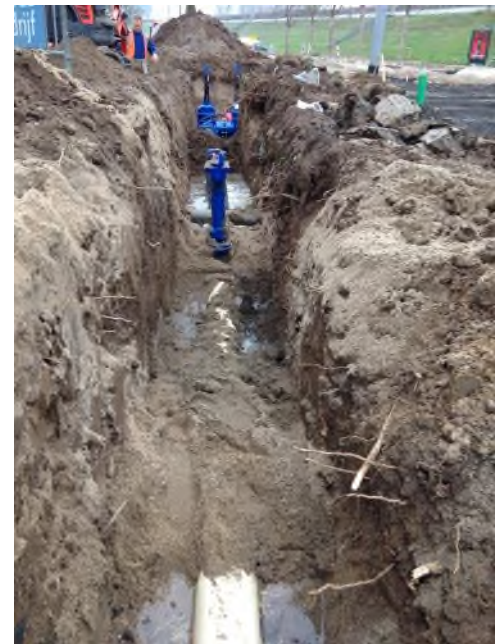


FIG. 2.5. WERKZAAMHEDEN BIJ VITENS, TIEL, INDUSTRIEGEBIED HOOG KELLESEWEG.

In 2015 zijn diverse aanvullende bemonsteringen gedaan. In februari zijn vier locaties bezocht bij Oasen (uitname en vervanging leidingsegmenten te Nieuwveen, Nieuwerbrug, Bodegraven en Nieuwkoop). Op 23 juni werd bij Brabant Water een locatie in Dinteloord bemonsterd. Op 7 juli werd bij Waternet in Amsterdam bemonsterd tijdens de vervanging van een defecte afsluiter en op 17 november volgde nog een tweede locatie in Amsterdam. Tenslotte werd bij Evides op 2 december een locatie in Oostvoorne bemonsterd bij het uithalen van een leidingdeel. In totaal werden in 2015 dus nog eens 8 locaties bezocht bij vier waterbedrijven.



FIG. 2.6. WERKZAAMHEDEN BIJ VITENS, NIJMEGEN.

## 2.2 Methode van bemonstering in het veld

Het verzamelen van monstermateriaal zonder daarbij verontreinigingen van andere externe bronnen te introduceren is een belangrijk aandachtspunt. Hierbij vormt vooral het contamineren van monsters met bacteriën van de monsternemer een potentieel risico. Om de introductie van contaminaties zoveel mogelijk te voorkomen zijn voorzorgsmaatregelen genomen zoals hierna beschreven.

### 2.2.1 Watermonsters

Voor het verzamelen van watermonsters zijn plastic wegwerpflessen van 1000 ml gebruikt. Deze wegwerpflessen worden door het KWR laboratorium standaard gebruikt voor het verzamelen van monsters ten behoeve van diverse analyses (ook DNA analyses). De wegwerpflessen zijn (bij inpakken in een kartonnen doos voor vertrek) aan de buitenkant extra schoongemaakt door de gesloten flessen te bespuiten met DNaseAway (een chloor/zeep oplossing). Vervolgens werden de flessen drooggewreven met tissues. Na het schoonmaken zijn de flessen alleen nog maar vastgepakt met een "gehandschoende" hand. Na het aantrekken van handschoenen zijn deze schoongemaakt door ze vochtig te maken en "te wassen" met DNaseAway en daarna drooggewreven met een tissue.

Tijdens de monsternamedag zijn de flessen alleen met handschoenen aangepakt. De handschoenen zijn regelmatig met DNaseAway uit een spuitfles schoongemaakt (en vervolgens met een tissue drooggewreven). Watermonsters werden genomen door de schone fles onder te dompelen in het water (grondwater uit de sleuf, al dan niet gemengd met water dat vanuit de leiding hierin was gestroomd). Als het waterniveau te laag was om de fles te kunnen onderdompelen zijn wegwerp monsterbuizen van "Greiner" (met een volume van 50 ml) gebruikt als "waterschep" om de monsterfles (zoveel mogelijk) vol te scheppen. Deze Greinerbuizen komen steriel uit een ongeopende zak en kunnen dan direct gebruikt worden. Ook deze buizen werden alleen met handschoenen vastgepakt.

### 2.2.2 Bodemmonsters

Bodemmonsters uit de sleuf werden verzameld in steriele fecespotjes. Deze potjes bevatten aan de binnenkant van de deksel een steriel schepje waarmee monsters kunnen worden opgeschept. Voor het geval de grond steviger was en het schepje uit de fecespotjes niet kon worden gebruikt zijn individueel ingepakte steriele lepels gebruikt. De fecespotjes zijn voor 70-90% gevuld met grond.

### 2.2.3 Conservering en transport van monsters na de monstername

Water- en bodemmonsters werden tijdens de monsternamedag in een koelbox bewaard. De koelbox was gevuld met een flinke laag ijs zodat het niet noodzakelijk was om monsters al tijdens de monsternamedag bij KWR af te leveren, de monsters konden in de auto "overnachten". Inladen van monstermateriaal gebeurde al de middag van tevoren, in verband met een meestal vroege start op de monsterlocatie. Binnen 24 uur na verzamelen van de monsters zijn de benodigde analyses ingezet.

### 2.2.4 Opwerking van monsters na aankomst op het laboratorium

#### 2.2.4.1 Watermonsters

Na aankomst op het laboratorium van KWR is, binnen 16 uur, van elk monster een volume water gefiltreerd voor de isolatie van DNA of analyse met kweek.

#### 2.2.4.2 Grondmonsters

Op de dag van monstername is aan 32 gram van elk grondmonster 200 ml PBS (144 mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 9000 mg/l NaCl, 795 mg/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,4) toegevoegd en vervolgens grondig gemengd, waarbij micro-organismen worden losgemaakt van de vaste deeltjes uit het grondmonster, tot een homogene suspensie. Dit mengsel is gedurende ca. 16 uur geplaatst bij 5°C om de vaste deeltjes te laten bezinken en vervolgens is een deel van de bovenstaande vloeistof gefiltreerd voor isolatie van DNA en analyse met kweek. Deze behandeling is conform KWR methode LMB-005, maar met PBS in plaats van steriel water.

### 2.3 Analyse van fecale indicatoren met diergroep-specifieke DNA merkers

De volgende diergroepen zijn met DNA merkers geanalyseerd in de water- en grondmonsters: mens en herkauwers (met groepspecifieke *Bacteroides*); hond (soort eigen DNA) en vogels (met *Helicobacter*). Voor de analyse van DNA merkers voor diergroep-specifieke fecale verontreinigingen is eerst DNA geïsoleerd uit de water- of bodemmonsters en vervolgens zijn de DNA merkers gekwantificeerd. Als in een monster de humane *Bacteroides* merker werd aangetroffen, is nog getest op de aanwezigheid van humane adenovirussen.

#### 2.3.1 Isolatie van DNA

Voor isolatie van DNA uit watermonsters is een volume van tussen 40 en 250 ml water en voor isolatie van DNA uit grondmonsters is een volume van tussen de 10 en 75 ml bovenstaande vloeistof van de PBS-grond suspensie gefiltreerd over membraanfilters van polycarbonaat met een diameter van 25 mm en een poriegrootte van 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius "Track Etch Membrane"). Voor detectie van adenovirussen is van elk monster ook een filtratie uitgevoerd over membraanfilters met een poriegrootte van 0,04  $\mu\text{m}$ . In dit geval is voor isolatie van DNA uit watermonsters een volume van tussen 20 en 200 ml water gefiltreerd en voor isolatie van DNA uit grondmonsters een volume van tussen de 15 en 30 ml bovenstaande vloeistof van de PBS-grond suspensie. Alle gefilterde volumina waren afhankelijk van de mate waarin de gebruikte filters verstopt raakten. Na filtratie zijn de filters overgebracht naar Beat-beat buisjes van de PowerBiofilm Kit van MoBio waaraan lysis buffer uit de Kit is toegevoegd. De toegepaste methode voor isolatie van DNA is in meer

detail beschreven in Heijnen (2015b). Het rendement van de DNA-isolatie en de eventuele aanwezigheid van remmende stoffen in het DNA van de water- of grondmonsters is bepaald door aan elk monster een bekende hoeveel DNA van een interne controle (IC) toe te voegen en hiervan de opbrengst te bepalen (Heijnen, 2015b).

### 2.3.2 Kwantificering DNA merkers met qPCR

Details over de in dit onderzoek toegepaste diergroep-specifieke DNA merkers voor fecale verontreinigingen afkomstig van mensen, honden, herkauwers en vogels zijn beschreven in Heijnen (2015b). De methode voor detectie van mens-specifieke adenovirussen (type 40 en 41) is beschreven in Heijnen (2011). De opbrengst (Recovery: R) van de isolatie van het, tijdens de DNA-isolatie toegevoegde IC-DNA is gebruikt voor het corrigeren van de meetwaarden van de diergroep-specifieke DNA merkers waarbij kwantitatieve meetwaarden alleen als betrouwbaar te kwantificeren zijn beschouwd bij een opbrengst van tenminste 10%.

### 2.4 Kweek van fecale indicator organismen

De aanwezigheid en concentratie van de volgende fecale indicator organismen is met de volgende KWR standaard kweekmethoden onderzocht: coliformen (LMB-042, gelijkwaardig aan NEN-EN-ISO 9308-1), *E. coli* (LMB-042, gelijkwaardig aan NEN-EN-ISO 9308-1) en intestinale enterococci (conform LMB-044, gelijkwaardig aan NEN-EN-ISO 7899), hierna kortweg aangeduid als enterococci.

## 3 Resultaten

### 3.1 Fecale indicatoren in watermonsters

Een samenvatting van de resultaten van de diverse bacteriekweken en DNA analyses voor alle genomen watermonsters staat in Tabel 3.1. In alle monsters werden fecale indicatororganismen aangetroffen. Coliforme bacteriën en enterococci kwamen het meest frequent voor (respectievelijk 89 en 81% van de monsters). *E. coli* werd in 31% van de monsters aangetroffen. Er kunnen wat dit betreft geen verschillen worden vastgesteld tussen de verschillende waterbedrijven (hierna worden de waterbedrijven geanonimiseerd aangeduid met de term 'regio'). In 31% van alle monsters werd ook DNA van een of meerdere van de onderzochte fecale verontreinigingsbronnen gedetecteerd. Ruim de helft van deze 11 monsters met DNA signalen kwam uit één regio, maar de DNA signalen waren zeker niet alleen tot deze regio beperkt. Meestal ging het om een humane oorsprong (8 van de positieve DNA monsters), in 4 gevallen werd DNA van de hond aangetroffen. Er werden geen signalen van vogels als bron gevonden.

TABEL 3.1 OVERZICHT VAN DE RESULTATEN MET BACTERIEKWEK EN DNA DETECTIE IN DE ONDERZOCHE WATERMONSTERS, VERDEELD OVER DE ZES WATERBEDRIJVEN.

regio	n	DNA	bron				kweek			
		positief	mens	herkauwer	hond	vogel	positief	colif	<i>E. coli</i>	entero
A	10	6	6	1	1	0	10	10	3	7
B	9	2	2	0	0	0	9	7	3	9
C	2	0	0	0	0	0	2	2	2	2
D	5	0	0	0	0	0	5	4	0	5
E	8	2	0	0	2	0	8	7	1	4
F	2	1	0	0	1	0	2	2	2	2
<b>totaal</b>	<b>36</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>36</b>	<b>32</b>	<b>11</b>	<b>29</b>
<b>%</b>		<b>31</b>	<b>22</b>	<b>3</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>89</b>	<b>31</b>	<b>81</b>
mediaan			1,1E+07	9,8E+03	7,5E+03	n.a.	8,0E+01	3,6E+01	6,0E+01	8,0E+01
gemidd.			1,4E+08	9,8E+03	1,5E+04	n.a.	1,1E+04	3,0E+03	7,4E+02	1,1E+04
5% perc			8,2E+04	9,8E+03	5,6E+03	n.a.	2,8E+00	1,6E+00	1,3E+00	2,8E+00
95% perc			5,9E+08	9,8E+03	3,0E+04	n.a.	6,1E+03	1,6E+04	4,5E+03	6,1E+03
max			7,8E+08	9,8E+03	3,2E+04	n.a.	3,2E+05	3,2E+04	7,0E+03	3,2E+05

*Toelichting:* n: totaal aantal monsters; positief: aantal monsters waarin tenminste één van de gebruikte merkers of bacteriekweken positief was; bron: aantal monsters dat positief was voor de betreffende DNA merker; kweek: aantal monsters dat positief was voor een van de gebruikte bacteriekweken (colif: coliforme bacteriën; entero: enterococci); gemidd.=gemiddelde; 5%, 95%: respectievelijk het 5% en 95% percentiel; max=maximum; n.a.: niet beschikbaar; mediaan, gemiddelde en percentielen als DNA kopieën/l of als kve/100 ml. Het vermelde percentage is steeds ten opzichte van het totaal aantal monsters.

In Fig. 3.1 staan de resultaten voor coliformen en enterococci tegen elkaar uitgezet, om te zien of er mogelijk een clustering van monsters binnen of tussen regio's optreedt. Dit is niet

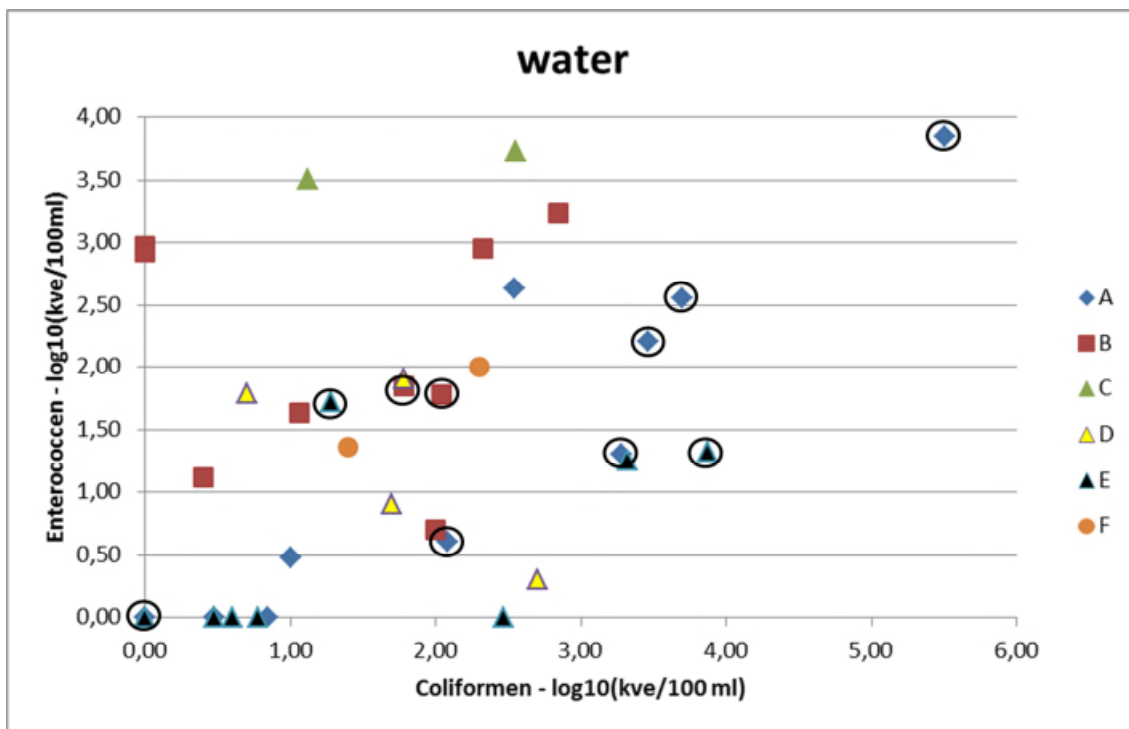


Fig. 3.1. Relatie tussen het aantal kolonies per 100 ml (logeenheden) van coliforme bacteriën en van enterococci voor de watermonsters uit de zes onderzochte regio's. Monsters die ook positief waren voor een of meerdere DNA merkers zijn met een cirkel aangegeven.

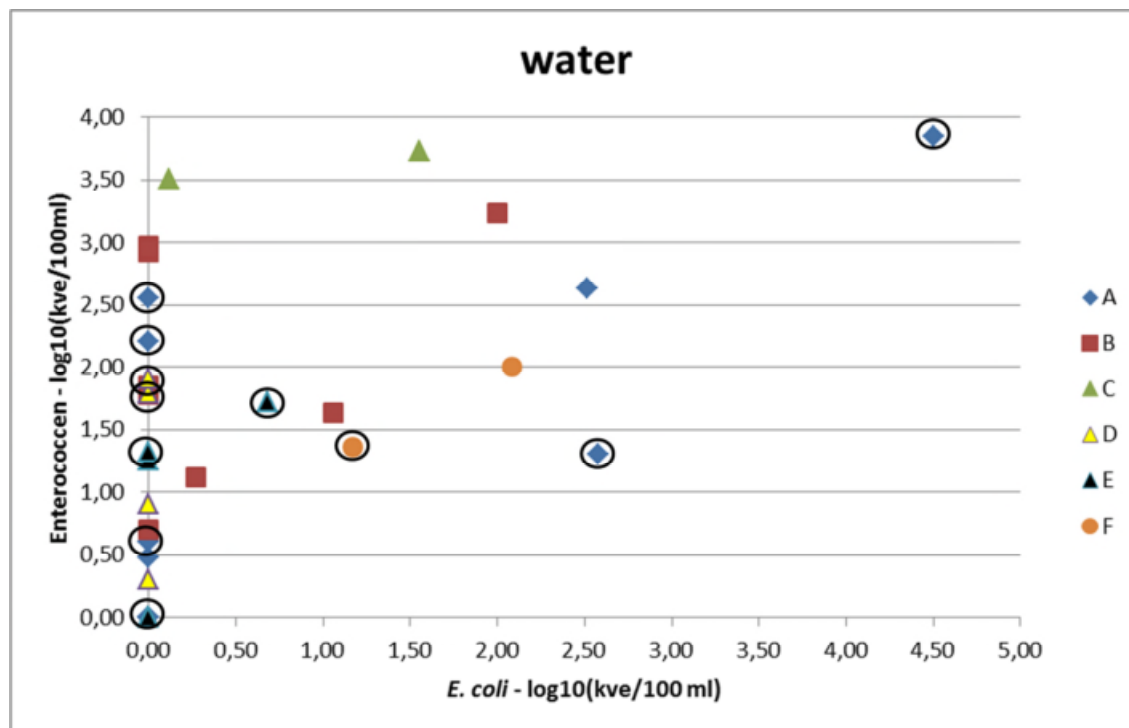


Fig. 3.2. Relatie tussen het aantal kolonies per 100 ml (logeenheden) van E. coli bacteriën en van enterococci voor de watermonsters uit de zes onderzochte regio's. Monsters die ook positief waren voor een of meerdere DNA merkers zijn met een cirkel aangegeven.



het geval, en ook niet wanneer de gegevens voor *E. coli* en enterococcen worden bekeken (Fig.3.2). Er is in beide gevallen voor de totale dataset wel een significant positief verband tussen de beide variabelen, maar de verklaarde variatie is beperkt (20-25%) en wordt vooral veroorzaakt door de gegevens van regio A. Voor alle data geldt dat als *E. coli* is aangetroffen, er ook altijd enterococcen werden gevonden (Fig. 3.2). Omgekeerd is dit zeker niet altijd het geval.

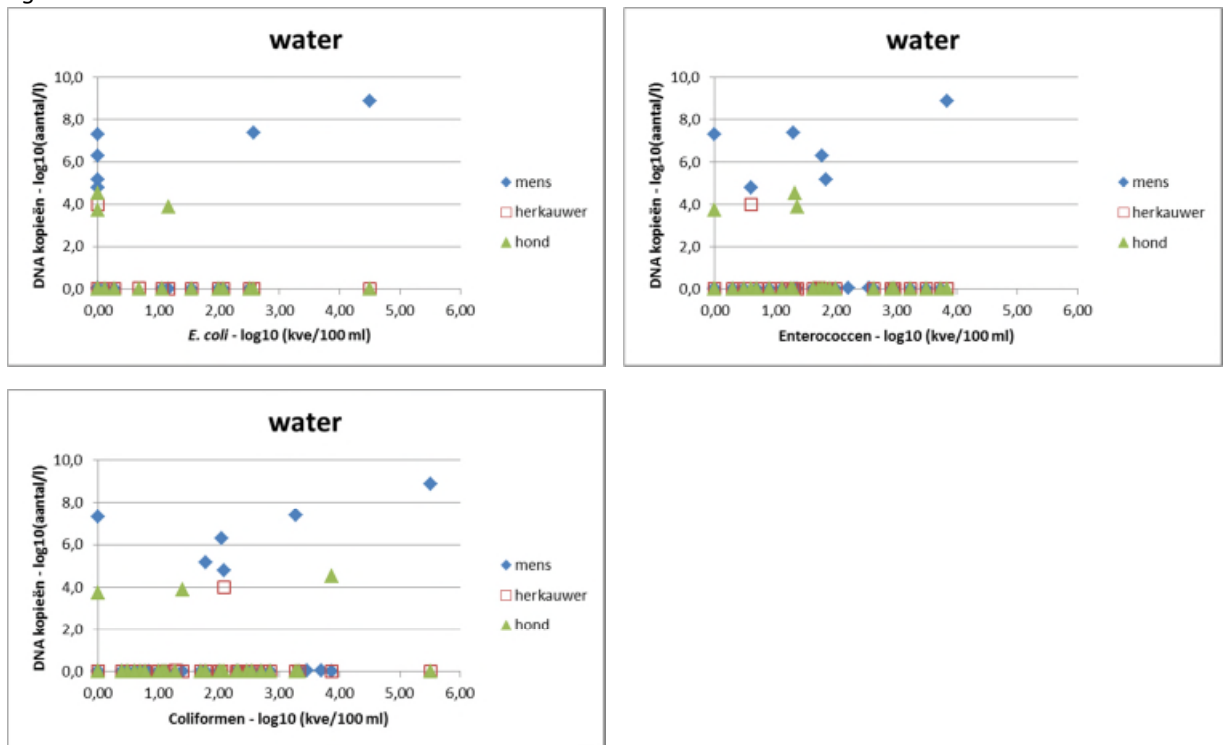


Fig. 3.3. Relatie tussen het aantal DNA merkers (DNA kopieën/l, logeenheden) van drie diergroepen en het aantal kolonies per 100 ml (log eenheden) van *E. coli*, enterococcen en coliforme bacteriën voor de watermonsters uit de onderzochte regio's.

In Fig. 3.3 is voor elk van de drie gebruikte bacteriekweken de relatie weergegeven met het aantal aangetroffen DNA merkers van de onderzochte diergroepen. Duidelijk is te zien dat in een groot aantal gevallen géén DNA merkers zijn gevonden bij aantreffen van fecale indicator bacteriën. Er is geen significante relatie aanwezig tussen het aantal DNA kopieën en het aantal kolonies. Op de watermonsters waarin mens-specifieke DNA merkers zijn gedetecteerd zijn ook nog analyses uitgevoerd waarmee mens-specifieke adenovirussen (type 40 en 41) worden gedetecteerd. In geen van de geanalyseerde monsters is het DNA van deze adenovirussen aangetoond.

### 3.2 Fecale indicatoren in bodemonsters

Een samenvatting van de resultaten van de diverse bacteriekweken en DNA analyses voor alle genomen monsters staat in Tabel 3.2. In 56% van de monsters werden fecale indicatororganismen aangetroffen. Coliforme bacteriën en enterococcen kwamen het meest frequent voor (respectievelijk 50 en 36% van de monsters). *E. coli* werd in 17% van de monsters aangetroffen. Er lijken wat dit betreft geen heel duidelijke verschillen te bestaan tussen de onderzochte regio's. In maar 7 van de 39 monsters met een positief kweekresultaat werd ook DNA van een van de onderzochte fecale verontreinigingsbronnen

TABEL 3.2 OVERZICHT VAN DE RESULTATEN MET BACTERIEKWEK EN DNA DETECTIE IN DE ONDERZOCHE BODEMMONSTERS, VERDEELD OVER DE ZES WATERBEDRIJVEN.

regio	n	DNA	bron				kweek			
		positief	mens	herkauwer	hond	vogel	positief	colif	<i>E. coli</i>	entero
A	17	2	2	0	0	0	9	9	6	7
B	14	2	2	0	0	0	8	8	1	4
C	4	0	0	0	0	0	4	4	0	3
D	6	0	0	0	0	0	4	2	0	2
E	24	1	0	0	1	0	9	7	0	4
F	5	2	0	1	1	0	5	5	5	5
<b>totaal</b>	<b>70</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>39</b>	<b>35</b>	<b>12</b>	<b>25</b>
<b>%</b>		<b>10</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>56</b>	<b>50</b>	<b>17</b>	<b>36</b>
mediaan			4,1E+02	2,0E+02	1,3E+02	n.a.	9,4E+00	1,9E+00	4,4E+00	9,4E+00
gemidd.			5,9E+02	2,0E+02	1,3E+02	n.a.	1,6E+02	8,3E+00	2,3E+01	1,6E+02
5% perc			2,9E+02	2,0E+02	5,3E+01	n.a.	1,3E+00	6,3E-01	6,0E-01	1,3E+00
95% perc			1,1E+03	2,0E+02	2,0E+02	n.a.	2,4E+02	5,0E+01	7,4E+01	2,4E+02
max			1,3E+03	2,0E+02	2,0E+02	n.a.	4,1E+03	5,0E+01	2,5E+02	4,1E+03

*Toelichting:* n: totaal aantal monsters; positief: aantal monsters waarin tenminste één van de gebruikte merkers of bacteriekweken positief was; bron: aantal monsters dat positief was voor de betreffende DNA merker; kweek: aantal monsters dat positief was voor een van de gebruikte bacteriekweken (colif: coliforme bacteriën; entero: enterococci); gemidd.=gemiddelde; 5%, 95%: respectievelijk het 5% en 95% percentiel; max=maximum; n.a.: niet beschikbaar; mediaan, gemiddelde en percentielen als DNA kopieën/l of als kve/100 ml. Het vermelde percentage is steeds ten opzichte van het totaal aantal monsters.

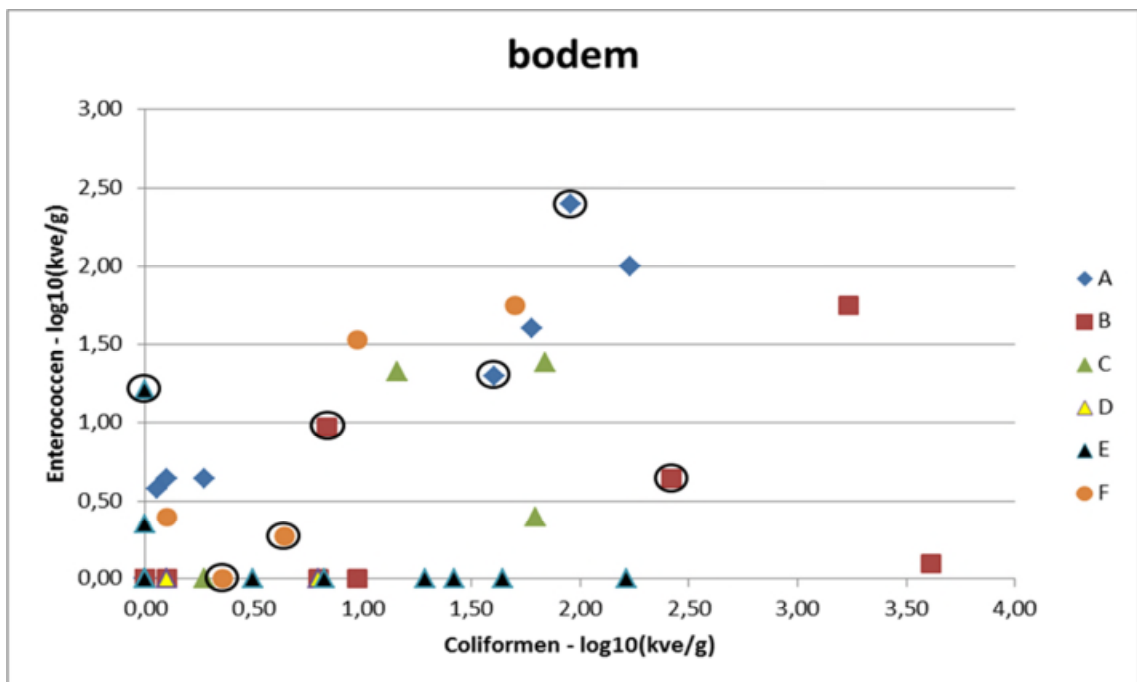


Fig. 3.4. Relatie tussen het aantal kolonies per gram bodem (logeenheden) van coliforme bacteriën en van enterococci voor de bodemmonsters uit de zes onderzochte regio's. Monsters die ook positief waren voor een of meerdere DNA merkers zijn met een cirkel aangegeven.

gedetecteerd; meestal ging het om een humane oorsprong (4 van de positieve monsters). Er werden geen signalen van vogels als bron aangetroffen.

In Fig. 3.4 staan de resultaten voor coliforme kolonies en enterococci tegen elkaar uitgezet, om te zien of er mogelijk een clustering van monsters binnen of tussen regio's optreedt. Dit is niet het geval, en ook niet wanneer de gegevens voor *E. coli* en enterococci worden bekeken (Fig.3.5). Er is ook geen generieke correlatie tussen de verschillende fecale indicatoren waarneembaar. Er is alleen een significant positief verband voor regio F tussen *E. coli* en enterococci. Voor alle data geldt dat als *E. coli* is aangetroffen, er op twee monsters na ook altijd enterococci werden gevonden (Fig. 3.5). Omgekeerd is dit zeker niet altijd het geval.

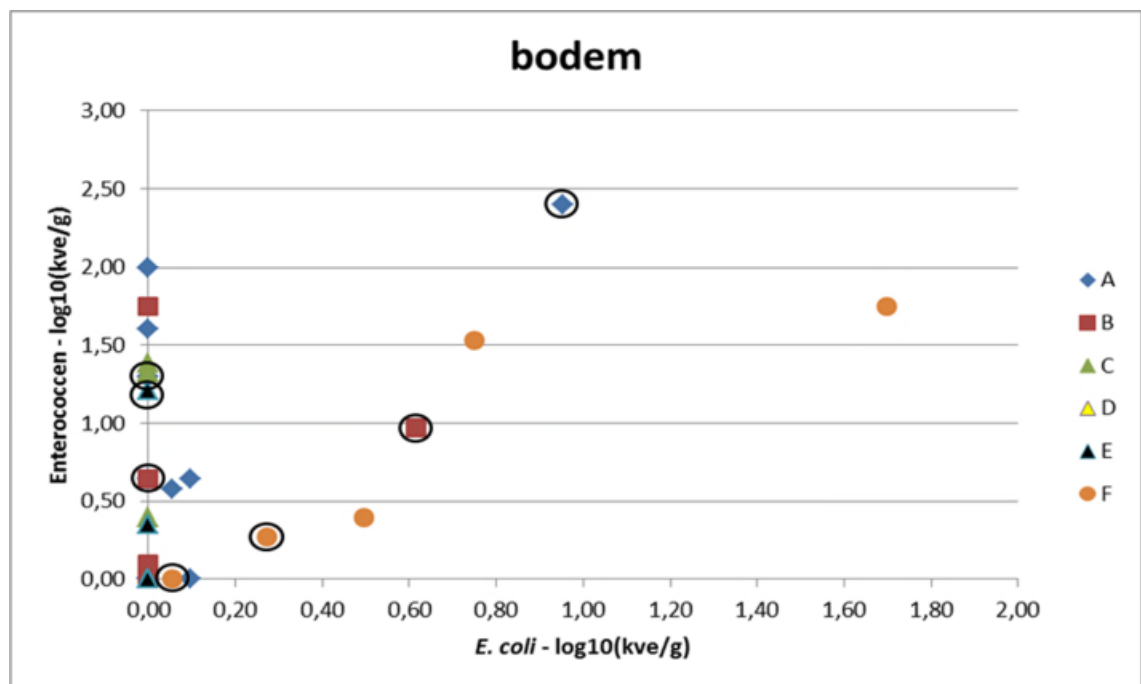


Fig. 3.5. Relatie tussen het aantal kolonies per gram bodem (logeenheden) van *E. coli* bacteriën en van enterococci voor de bodemonsters uit de zes onderzochte regio's. Monsters die ook positief waren voor een of meerdere DNA merkers zijn met een cirkel aangegeven.

In Fig. 3.6 is voor elk van de drie gebruikte bacteriekweken de relatie weergegeven met het aantal aangetroffen DNA merkers van de onderzochte diergroepen. Duidelijk is te zien dat in een groot aantal gevallen géén DNA merkers zijn gevonden bij aantreffen van fecale indicator bacteriën. Er is geen significante relatie aanwezig tussen het aantal DNA kopieën en het aantal kolonies. Op de bodemonsters waarin mens-specifieke DNA merkers zijn gedetecteerd zijn ook analyses uitgevoerd waarmee mens-specifieke adenovirussen (type 40 en 41) worden gedetecteerd. In geen van de geanalyseerde monsters is het DNA van deze adenovirussen aangetoond.

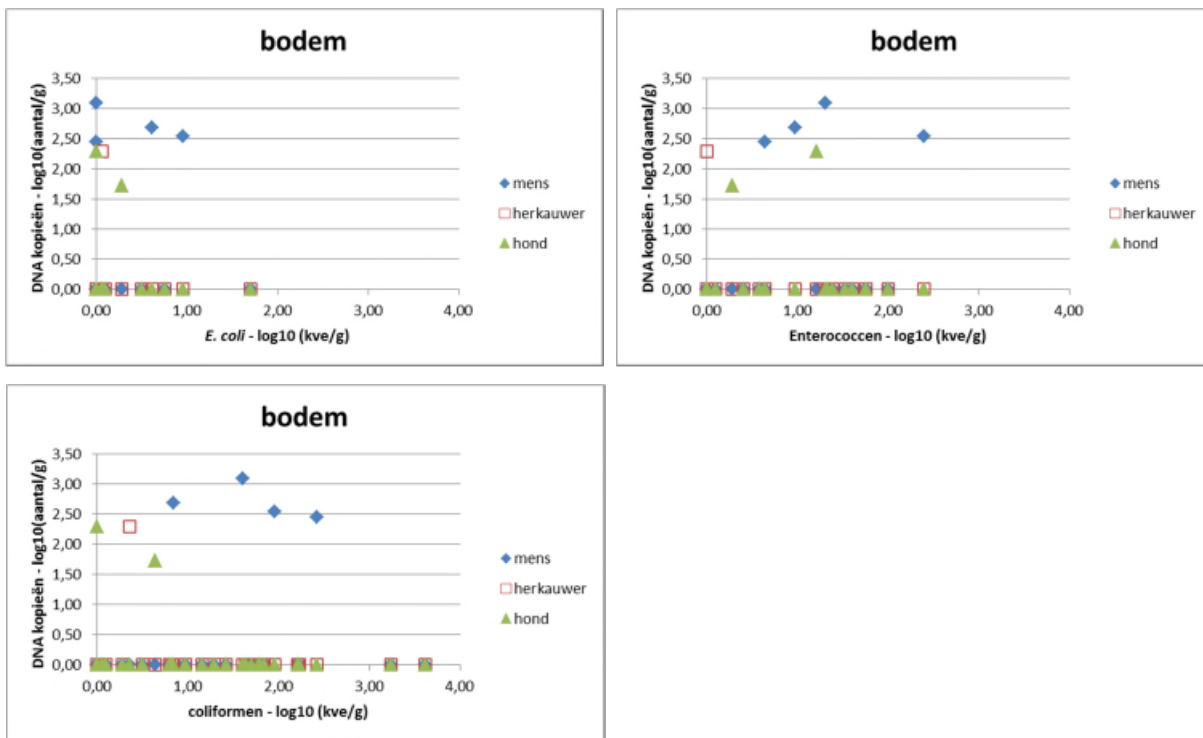


Fig. 3.6. Relatie tussen het aantal DNA merkers (DNA kopieën/g, logeenheden) van drie diergroepen en het aantal kolonies per g bodem (log eenheden) van E. coli, enterococci en coliforme bacteriën voor de bodemmonsters uit de onderzochte regio's.

## 4 Discussie en conclusies

### 4.1 Mate van verontreiniging van bodem en grondwater tijdens werkzaamheden

De metingen aan fecale indicator-bacteriën geven aan dat tijdens werkzaamheden aan het leidingnet het grondwater in de sleuf in veel gevallen meerdere indicator-bacteriën bevat, meestal coliformen en enterococcen (>80%) en in mindere mate *E. coli* (31%). De mate van verontreiniging varieert, van enkele tot soms  $10^4$  per 100 ml. De bodem is ook verontreinigd met fecale indicator-bacteriën, zij het wat minder frequent (17-50% van de monsters zijn positief); de mate van verontreiniging varieert van enkele tot  $10^3$  per gram.

Coliformen en ook enterococcen kunnen van nature in de bodem voorkomen en geen directe indicatie zijn voor een fecale verontreiniging. Beide kunnen groeien op plantenresten en ander organisch materiaal. Dat zou een reden kunnen zijn voor het verschil in de frequentie van aantreffen van coliformen en enterococcen versus het aantreffen van *E. coli*. Aan de andere kant komen coliformen over het algemeen in wat hogere concentraties voor in fecaal materiaal en rioolwater dan *E. coli*. Ook dat zou een reden kunnen zijn voor het vaker aantreffen van coliformen. Enterococcen zouden in grondwater langer kunnen overleven dan *E. coli*, waardoor enterococcen meer indicatief zijn voor een wat oudere fecale verontreiniging. Er is op basis van de gegevens geen onderscheid te maken tussen een al dan niet fecale verontreiniging van bodem en grondwater.

De hoge frequentie van aantreffen, de concentraties die hoog kunnen zijn en de indicatie dat ze van fecale herkomst (kunnen) zijn, betekent dat bij reparaties bodem en grondwater als potentieel verontreinigd materiaal moeten worden beschouwd. Dat stelt hoge eisen aan de voorzorgs- en hygiëne maatregelen die tijdens werkzaamheden worden voorgeschreven door de Hygiëncode Drinkwater (Meerkerk & Kroesbergen, 2010) en moeten worden gehandhaafd. Bij het constateren van binnendringen van bodem of grondwater in het leidingnet wordt extra grondige reiniging na reparatie door spuien en chloren ten zeerste aanbevolen.

### 4.2 Relatie tussen kweekresultaten en op DNA detectie gebaseerde mogelijke bronnen

De DNA gebaseerde detectie van fecale verontreinigingsbronnen gaf in 31% van de met kweek positief bevonden watermonsters een aanwijzing voor de mogelijke herkomst van de aangetroffen fecale bacteriën. In de bodemmonsters was dit percentage lager (7 van de 39 positieve kweekresultaten, dus 18%). Kennelijk is slechts een beperkt deel van de met bacteriekweek vastgestelde fecale verontreinigingen daadwerkelijk te herleiden tot een of meerdere van de fecale bronnen die met de in deze studie gebruikte DNA merkers konden worden aangetoond. Ook in onderzoek in opdracht van de duinwaterbedrijven (DPWE) waarbij de herkomst van sporadische verontreinigingen in watermonsters na duinpassage is onderzocht (Heijnen, 2015a) bleek het in veel gevallen, waarin lage concentraties *E. coli* en/of enterococcen werden aangetoond met kweek, niet mogelijk om met DNA merkers de herkomst van deze verontreinigingen te identificeren.

Het relatief hoge percentage monsters waarbij wel indicatororganismen met kweek worden gedetecteerd maar waarbij, met DNA merkers, geen herkomst van een fecale verontreiniging kan worden geïdentificeerd kan het gevolg zijn van:

- *De aanwezigheid van een alternatieve verontreinigingsbron*

Een van de alternatieve fecale bronnen zouden knaagdieren zoals ratten en muizen kunnen zijn. Hiervoor zijn momenteel nog geen DNA merkers beschikbaar. De DNA merker voor paarden is in dit onderzoek niet gebruikt; het lijkt echter niet erg aannemelijk dat juist mest afkomstig van deze diergroep een belangrijk deel van de nu niet herleidbare fecale bronnen kan verklaren.

- *Detectiegrens van de toegepaste methoden*

In BTO onderzoek van 2015 (Heijnen 2015b) is aangetoond dat de concentratie DNA merkers voor mens- en herkauwer-specifieke fecale verontreinigingen in feces van deze beide groepen gemiddeld aanmerkelijk hoger is dan de concentratie DNA merkers voor de indicatororganismen *E. coli* en enterococci. De detectie van DNA merkers vindt echter plaats in kleine volumes (10x lager dan voor kweek) en kan mede door soms lage rendementen een hogere detectiegrens hebben dan geldt voor kweekresultaten met fecale indicator organismen. In dit onderzoek lag de detectiegrens voor DNA merkers meestal op  $<10^3$  of  $<10^4$  DNA kopieën/l, voor kweek was dit meestal  $<10$  kve/100 ml (zie Bijlage 1). Dat betekent dat de concentratie DNA merker 10-100x hoger moet zijn voordat bij een positief kweekresultaat ook de DNA merker wordt geconstateerd. De concentratie vogel-specifieke DNA merkers is in de feces van vogels lager dan de concentratie DNA merkers voor de indicatororganismen *E. coli* en enterococci. Er kan daarom niet uitgesloten worden dat *E. coli* en enterococci worden gedetecteerd in situaties waarbij vogels een rol spelen bij een verontreiniging terwijl vogel-specifieke DNA niet worden gedetecteerd.

- *Verminderde persistentie van DNA merkers*

Mogelijk zijn DNA merkers van *Bacteroides* in de bodem en in grondwater minder persistent dan kweekbare fecale indicator organismen. Echter, in eerder BTO onderzoek (Heijnen 2015b) is de persistentie van *E. coli* en de hier gebruikte DNA merkers onderzocht in monsters van drinkwater en oppervlaktewater waaraan fecaal materiaal was toegevoegd. Daaruit bleek dat de DNA merkers langer aantoonbaar waren dan de fecale bacteriën (met kweek).

- *Geen recente fecale verontreiniging ondanks aanwezigheid van *E. coli* en enterococci*

Er komt steeds meer kennis beschikbaar waaruit blijkt dat *E. coli* en enterococci zich onder bepaalde omstandigheden langere tijd in water en bodem kunnen handhaven en vermeerderen waardoor de aanwezigheid van deze organismen niet altijd een goede indicatie vormt voor de aanwezigheid van (recente) fecale verontreinigingen (zie reviews: voor enterococci door Byappanahalli et al., 2012 en voor *E. coli* door Ishii & Sadowsky, 2008). Het kan dan ook niet worden uitgesloten dat een deel van de in deze studie met kweek vastgestelde fecale indicator bacteriën feitelijk ook vrij levend voorkomt in de bodem en dan dus geen indicatie geeft van een recente fecale verontreiniging. Wellicht geeft in die gevallen de aan-/afwezigheid van DNA-merkers een betere indicatie van de aan-/afwezigheid van fecale verontreinigingen en daarmee van het infectierisico.

Er zijn maar weinig vergelijkbare studies gedaan naar het voorkomen van fecale indicatoren in de directe omgeving van ingrepen in het drinkwaterleidingnet. In een onderzoek naar het risico van wegvallen van waterdruk tijdens ingrepen in het leidingnet (Karim et al., 2003) werden in een deel van de onderzochte monsters coliformen aangetoond (38% van de water- en 45% van de bodemonster). Besner et al. (2008) en Besner et al (2010) deden een dergelijk onderzoek bij 16 geplande ingrepen in twee stedelijke leidingnetten in Quebec, Canada. In de 17 onderzochte bodemonsters vond men in 60% van de gevallen coliforme bacteriën. In slechts één van deze bodemonsters werd *E. coli* aangetroffen. In geen van de negen op *E. coli* onderzochte watermonsters werd deze bacterie gevonden, maar de drie op

coliforme bacteriën geanalyseerde watermonsters waren wel allemaal positief. De hoeveelheden kolonies per gram grond en per 100 ml water lagen voor deze twee fecale indicatoren in dezelfde grootte orde als de door ons gerapporteerde waarden. Enterococci werden door Besner et al. (2008) en Besner et al. (2010) niet onderzocht. De in onze studie gevonden verontreinigingspercentages liggen wel wat hoger, met name die voor *E. coli*. Ook valt op dat in onze gegevens de watermonsters een hoger verontreinigingspercentage voor *E. coli* hebben dan de bodemonsters; in de Canadese studies is dat omgekeerd.

### 4.3 Conclusies

Uit onze verkennende studie blijkt dat vooral het water uit de omgeving van werkzaamheden een belangrijke oorzaak voor fecale verontreinigingen kan zijn, aangezien alle onderzochte monsters positief waren voor een of meer fecale indicator organismen. De bodem was in de helft van de onderzochte gevallen positief en dus minder vaak verontreinigd.

Het gebruik van DNA merkers lijkt een geschikte methode om onderscheid te kunnen maken tussen fecale verontreinigingsbronnen. De fecale herkomst van de geconstateerde verontreinigingen kon echter maar in een beperkt deel van de monsters worden vastgesteld. Meestal ging het dan om *Bacteroides* van humane herkomst, in een deel om merker-DNA van honden. Mogelijk zijn dus niet alle met kweekmethoden aangetoonde fecale organismen daadwerkelijk een indicatie voor een recente fecale verontreiniging van de omgeving.

De onzekerheid over de fecale origine van met kweekmethoden aangetoonde fecale indicator-bacteriën maakt de interpretatie van de gezondheidsrisico's op grond van het aantreffen van deze indicatoren voor fecale verontreiniging onzeker. Vervolgonderzoek naar additionele, meer specifieke methoden of meer specifieke indicatoren voor fecale verontreiniging kan meer eenduidig interpreteerbare resultaten opleveren.

De hoge frequentie van aantreffen van fecale indicatoren in grondwater, de concentraties die hoog kunnen zijn en de indicatie dat ze van fecale herkomst (kunnen) zijn, betekent dat bij reparaties bodem en grondwater als potentieel verontreinigd materiaal moeten worden beschouwd. Dat stelt hoge eisen aan de voorzorgs- en hygiëne maatregelen die tijdens werkzaamheden worden voorgeschreven door de Hygiëncode Drinkwater (Meerkerk & Kroesbergen, 2010) en moeten worden gehandhaafd. Bij het constateren van binnendringen van bodem of grondwater in het leidingnet wordt extra grondige reiniging na reparatie door spuien en chloren ten zeerste aanbevolen.

## 5 Referenties

- Besner, M.C., Broseus, R., Lavoie, J., Giovanni, G.D., Payment, P., & Prevost, M., 2010. Pressure monitoring and characterization of external sources of contamination at the site of the payment drinking water epidemiological studies. *Environ Sci Technol* 44(1), 269-277.
- Besner, M.-C., Lavoie, J., Morissette, C., Payment, P., & Prevost, M., 2008. Effect of Water Main Repairs on Water Quality. *American Water Works Association* 100(7), 95-109.
- Blokker, E.J.M., Moerman, A., & Smeets, P., 2016. QMRA van het distributienet, een kwantitatieve microbiologische risicoanalyse voor de bijdrage van het distributienet aan het infectierisico. BTO rapport BTO 2016.017.
- Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., & Harwood, V.J., 2012. Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev* 76(4), 685-706.
- Heijnen, L., 2011. Virusverwijdering door drinkwaterzuiveringsprocessen; de waarde van somatische fagen, F-specifieke fagen en adenovirussen. BTO rapport BTO 2011.010.
- Heijnen, L., 2015a. Identificeren van de bron van fecale besmettingen. DPW rapport KWR 2015.036
- Heijnen, L., 2015b. Eigenschappen van DNA-merkers voor fecale verontreiniging. BTO rapport BTO 2015.023
- Heijnen, L., & Learbuch, K., 2013. Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen BTO rapport BTO 2013.014.
- Heijnen, L., Learbuch, K., Kardinaal, E., Rotteveel, S., Ruiter, H. & Leenen, I., 2014. Fecale verontreiniging in zwemwater identificeren met DNA-merkers. H2O April 2014.
- Ishii, S., & Sadowsky, M.J., 2008. *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. *Microbes Environ* 23(2), 101-108.
- Karim, M.R., Abbaszadegan, M., & LeChevallier, M.W., 2003. Potential for pathogen intrusion during pressure transients. *Journal AWWA* 95(5), 134-146.
- Meerkerk, M.A., & Kroesbergen, J., 2010. Hygiëencode Drinkwater; Opslag, transport en distributie. BTO rapport 2001.075, 2e editie.



## Bijlage I Gegevens per locatie

Tabel 1. Resultaten van alle onderzochte watermonsters per regio.

LOCATIE	qPCR resultaten: DNA kopieën/L				Kweek resultaten: Kolonie getallen		
	Bacteroides humaan	Bacteroides herkauwer	hond	Helicobacter vogel	Coliformen kve/100 ml	E-coli kve/100 ml	Enterococci kve/100 ml
A1	Aangetoond	R te laag	R te laag	R te laag	2,9E+03	< 1	160
A2	Aangetoond	R te laag	R te laag	R te laag	5,0E+03	< 1	360
A3	7,8E+08	<4,2E+03	<4,2E+03	<2,1E+04	3,2E+05	3,2E+04	7,0E+03
A4	2,3E+07	<1,1E+03	<1,1E+03	<5,4E+03	1,9E+03	380	20
A5	2,0E+07	<3,3E+03	5,4E+03	<1,6E+04	1	< 1	< 1
A6	<790	<790	<790	<4,0E+03	3	< 1	< 1
A7	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	7	< 1	< 1
A8	6,2E+04	9,8E+03	<2,2E+03	<1,1E+04	120	< 1	4
A9	< 1,0E+03	< 1,0E+03	< 1,0E+03	< 5,2E+03	350	328	430
A10	< 8,8E+02	< 8,8E+02	< 8,8E+02	< 4,4E+03	10	<10	3
B1	<3,9E+03	<3,9E+03	<3,9E+03	<1,9E+03	<1000	<1000	930
B2	<8,8E+03	<8,8E+03	<8,8E+03	<4,4E+04	<1000	<1000	840
B3	1,9E+06	<9,0E+03	<9,0E+03	<2,5E+04	110	<11	60
B4	<9,9E+03	<9,9E+03	<9,9E+03	<5,0E+04	700	100	1,70E+03
B5	1,4E+05	<2,0E+04	<2,0E+04	<9,9E+04	60	<10	70
B6	<1,5E+04	<1,5E+04	<1,5E+04	<7,5E+04	100	<100	5
B7	<9,7E+03	<9,7E+03	<9,7E+03	<4,8E+04	210	<21	900
B8	< 1,1E+04	< 1,1E+04	< 1,1E+04	< 5,7E+04	11	11	43
B9	< 5,3E+03	< 5,3E+03	< 5,3E+03	< 2,7E+04	2	2	13
C1	<4,2E+03	<4,2E+03	<4,2E+03	<2,1E+04	13	1	3200
C2	<1,3E+04	<1,3E+04	<1,3E+04	<6,5E+04	355	36	5400
D1	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<1,4E+04	<1	<1	1
D2	<3,8E+03	<3,8E+03	<3,8E+03	<1,9E+04	50	<5	8
D3	<1,4E+03	<1,4E+03	<1,4E+03	<7,2E+03	5	<1	62
D4	<5,7E+03	<5,7E+03	<5,7E+03	<2,9E+04	500	<100	2
D5	<7,3E+03	<7,3E+03	<7,3E+03	<3,6E+04	60	<10	80
E1	R te laag	R te laag	Aangetoond	R te laag	19	5	52
E2	<2,4E+03	<2,4E+03	<2,4E+03	<1,2E+04	2100	<100	18
E3	<3,5E+03	<3,5E+03	3,2E+04	<1,7E+04	7400	<100	21
E4	<980	<980	<980	<4,9E+03	290	<10	<2
E5	<1,6E+03	<1,6E+03	<1,6E+03	<8,0E+03	<1	<1	1
E6	<1,7E+03	<1,7E+03	<1,7E+03	<8,6E+03	3	<1	<1
E7	<1,1E+03	<1,1E+03	<1,1E+03	<5,6E+03	6	<1	<1
E8	<820	<820	<820	<4,1E+03	4	<1	<1
F1	< 2,8E+03	< 2,8E+03	7,5E+03	< 1,4E+04	25	15	23
F2	< 2,8E+03	< 2,8E+03	< 2,8E+03	< 1,4E+04	200	120	100

Waarden voorafgegaan door een < teken in een rood vak zijn beneden de detectielimiet. Aanvullend geldt voor de DNA resultaten: R te laag: DNA niet aangetoond, maar rendement van de analyse was lager dan 10%.

Aangetoond: DNA is aangetoond, maar rendement was lager dan 10% zodat geen waarde kon worden toegekend.

Verschillen in detectiegrens worden veroorzaakt door verschillen in de hoeveelheid filtreerbaar monstervolume en gebruikte verdunningen.

Tabel 2. Resultaten van alle onderzochte bodemonsters per regio.

LOCATIE	qPCR resultaten: DNA kopieën/g				Kweek resultaten: Kolonie getallen		
	Bacteroides humaan	Bacteroides herkauwer	hond	Helicobacter vogel	Coliformen kve/g	E-coli kve/g	Enterococcen kve/g
A1	<150	<150	<150	<750	<0,3	<0,3	<0,3
A2	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	<0,3	<0,3	<0,3
A3	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	<0,3	<0,3	<0,3
A4	<181	<181	<181	<938	<0,3	<0,3	<0,3
A5	1253	<263	<263	<1313	40	<0,3	20
A6	343	<194	<194	<938	90	9	250
A7	<256	<256	<256	<1250	60	<0,3	40
A8	<144	<144	<144	<688	170	<0,3	100
A9	<125	<125	<125	<619	<1	<1	<1
A10	<69	<69	<69	<338	<1	<1	<1
A11	<94	<94	<94	<475	<1	<1	<1
A12	<39	<39	<39	<194	1	1	4
A13	<24	<24	<24	<119	2	1	4
A14	<53	<53	<53	<263	<1	<1	<1
A15	<34	<34	<34	<169	1	1	4
A16	<34	<34	<34	<169	1	1	<1
A17	<21	<21	<21	<106	1	1	<1
B1	<69	<69	<69	<344	<1	<1	<1
B2	<75	<75	<75	<363	<1	<1	<1
B3	483	<44	<44	<219	7	4	9
B4	<48	<48	<48	<238	4125	<413	1
B5	<52	<52	<52	<263	9	<1	<1
B6	<45	<45	<45	<225	1719	<172	56
B7	279	<63	<63	<313	263	<26	4
B8	<43	<43	<43	<150	1	<1	<1
B9	<43	<43	<43	<213	1	<1	<1
B10	<75	<75	<75	<375	<1	<1	<1
B11	<58	<58	<58	<300	6	<6	<1
B12	<41	<41	<41	<200	<1	<1	<1
B13	<53	<53	<53	<263	<1	<1	<1
B14	<29	<29	<29	<150	<1	<1	<1
C1	<106	<106	<106	<544	69	<7	24
C2	<94	<94	<94	<481	2	<1	<1
C3	<63	<63	<63	<325	14	<1	21
C4	<46	<46	<46	<231	63	<6	3
D1	<119	<119	<119	<606	<1	<1	1
D2	<56	<56	<56	<281	<1	<1	0
D3	<100	<100	<100	<500	1	<1	<1
D4	<94	<94	<94	<475	<1	<1	<1
D5	<75	<75	<75	<375	6	<6	<1
D6	<63	<63	<63	<313	<1	<1	<1
E1	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	<1	<1	<1
E2	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	<1	<1	<1
E3	<125	<125	<125	<625	<1	<1	1
E4	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	<1	<1	<1
E5	<81	<81	<81	<400	<1	<1	<1
E6	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	<1	<1	<1
E7	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	<1	<1	<1
E8	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	<1	<1	<1
E9	<81	<81	<81	<400	<1	<1	<1

Waarden voorafgegaan door een < teken in een rood vak zijn beneden de detectielimiet. Aanvullend geldt voor de DNA resultaten: R te laag: DNA niet aangetoond, maar rendement van de analyse was lager dan 10%.

Aangetoond: DNA is aangetoond, maar rendement was lager dan 10% zodat geen waarde kon worden toegekend.

Verschillen in detectiegrens worden veroorzaakt door verschillen in de hoeveelheid filtreerbaar monstervolume en gebruikte verdunningen.

Tabel 2. Vervolg: resultaten van alle onderzochte bodemonsters per regio.

LOCATIE	qPCR resultaten: DNA kopieën/g				Kweek resultaten: Kolonie getallen		
	Bacteroides humaan	Bacteroides herkauwer	hond	Helicobacter vogel	Coliformen kve/g	E-coli kve/g	Enterococcen kve/g
E10	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	<1	<1	2
E11	<33	<33	<33	<169	19	<1	<1
E12	<31	<31	<31	<156	3	<1	<1
E13	<35	<35	<35	<175	44	<3	<1
E14	<69	<69	<69	<338	26	<1	<1
E15	<39	<39	<39	<194	163	<3	<1
E16	<131	<131	<131	<681	<1	<1	<1
E17	<46	<46	198	<231	aangetoond	Niet aangetoond	16
E18	<23	<23	<23	<113	<1	<1	<1
E19	<24	<24	<24	<119	7	<1	1
E20	<48	<48	<48	<238	<1	<1	<1
E21	<39	<39	<39	<194	<1	<1	<1
E22	<45	<45	<45	<225	<1	<1	<1
E23	<18	<18	<18	<119	<1	<1	<1
E24	<34	<34	<34	<169	<1	<1	<1
F1	<45	<45	<45	<225	9	6	34
F2	<43	<43	53	<213	4	2	2
F3	<131	<131	<131	<625	50	50	56
F4	<61	196	<61	<300	2	1	1
F5	<54	<54	<54	<275	1	3	3

Waarden voorafgegaan door een < teken in een rood vak zijn beneden de detectielimiet. Aanvullend geldt voor de DNA resultaten: R te laag: DNA niet aangetoond, maar rendement van de analyse was lager dan 10%.

Aangetoond: DNA is aangetoond, maar rendement was lager dan 10% zodat geen waarde kon worden toegekend.

Verschillen in detectiegrens worden veroorzaakt door verschillen in de hoeveelheid filtreerbaar monstervolume en gebruikte verdunningen.