



**Datum**

21 oktober 2016

**Projectnummer**

DPWE 2016 22

# CCC - Coli Coccen Combinatie

DWPE - Waterkwaliteit

Dunea	Ed van der Mark
PWN	Herman Smit
Waternet	Leon Kors
Evides	Roland van Asperen / Bas Schaaf / Eveline Sack
Oasen	Jos Dusseldorp
HWL	Eric Penders
KWR	Patrick Smeets





# Inhoud

## Voorwoord

### 1. Notities

- Management samenvatting
- DPWEO-interpretatie coliformen in groot volume-v4
- Projectregistratie CCC
- Project definitie MALDITOF-MS CCC

### 2. Uitnodiging 1<sup>e</sup> workshop

#### Presentaties 1<sup>e</sup> workshop :

- Introductie CCC workshop – Kors
- Coliformen en *Enterococce*n: relevantie van groot volume monsters -  
Smeets
- Coli37, *E-coli*, *Enterococce*nen infectierisico – Van der Mark
- Microbiologische afwijkingen WPK zomer 2014 – Hooft
- Bacteriologische besmetting winning + zuivering ZS De Put - Dusseldorp

#### Verslag 1<sup>e</sup> workshop

### 3. Uitnodiging 2<sup>e</sup> workshop

#### Presentaties 2<sup>e</sup> workshop :

- MALDI-TOF voor de snelle identificatie van bacteriën in water – Taucer,  
Hoogeboezem
- Wanneer zet je een zuivering weer bij? – Dusseldorp , Hooft
- Vergelijken metingen op individueel strang/drain(Evides/U-bak in relatie met  
verzadigde zone, transport afstand en afdoding – Lohmann
- Coliformen* en *Enterococce*n: relevantie van groot volume monsters 2 –  
Smeets
- Identificatie van fecale besmettings bronnen (Source tracking) – Leo Heijnen
- MALDI-TOF-MS analyse ter discriminatie en karakterisering van  
milieustammen van *Enterococce*n/*E.coli* versus enterische  
stammen - Penders

### 4. Notities

- MALDI-TOF-MS analyse ter discriminatie en karakterisering van  
milieustammen van enterococce
- n / *E. coli* versus enterische  
stammen – Penders, Dijkstra
- DPWE enquête resultaten – Kors

### 5. Eindpresentatie mini Workshop 27 juni 2016

# Voorwoord

In het onderzoekjaar 2015 is door de DPWE Begeleidingsgroep Waterkwaliteit het project CCC ter hand genomen: de Coli-Coccen-Combinatie. Dit onderwerp behelsde niet zozeer een diepgaand onderzoeksproject maar een verkenning bij de verschillende DPWE bedrijven en Oasen hoe zij omgaan met de resultaten én de beoordeling van met name parameter Bacteriën van de coligroep oftewel Coli 37 graden.

De microbiologische kwaliteit en veiligheid van ons product is een gevoelig onderwerp en de bedrijven richten al jaren hun onderzoeks aandacht op soortendetectie, -typering, voorspelling van gedrag en duiding van positieve monsters, uiteindelijke ter voorkómen van besmetting van drinkwater. Gebleken is dat bij de duiding van de meetresultaten van met name bacteriën van de coligroep onderling de nodige verschillen bestaan hetgeen een onderlinge inhoudelijke discussie parten kan spelen, bijvoorbeeld wanneer het de kwaliteit van onderlinge leveringen betreft. Daarnaast blijkt ook dat voor de microbiologische basisgegevens in de doorvertaling naar de AMVD verschillen te bestaan. Veel bleek te maken met de wijze van interpretatie.

Het doel van deze verkenning was om ervaringen uit te wisselen, interpretatie van de resultaten van microbiologische eenduidig te beschrijven en om te komen tot één eensluidende notitie hierover.

De gekozen werkvormen zijn: een tweetal workshops, een enquête en het schrijven van een afsluitende discussie notitie.

In deze bundel zijn de verschillende projectonderdelen samengebracht.

Wat zéker is gelukt is om het onderwerp van verschillende kanten te belichten en bespreekbaar te maken. Wat ons ook is gelukt : te komen tot een notitie die de basis kan voren voor een eensluidende aanpak en interpretatie van Bacteriën van de coligroep in grootvolume monsters, een notitie die ons als bedrijfstak kan helpen in onderlinge gesprekken tussen Operationele Teams (OT's) tijdens incidenten of in discussie met ILenT.

Ook is gebleken dat over het onderwerp bacteriën van de coligroep in groot volume monsters het laatst woord nog niet over is gesproken; er zitten nog verschillen rond de vraag waar de feitelijke pijngrens ligt bij een verontreiniging met Coliformen 37graden. Nu is Rome ook niet op een dag gebouwd maar de BG is er van overtuigd dit de discussie ons een heel eind op weg heeft geholpen!

Leon Kors  
Voorzitter Begeleidingsgroep Waterkwaliteit



# Voorwoord

In het onderzoekjaar 2015 is door de DPWE Begeleidingsgroep Waterkwaliteit het project CCC ter hand genomen: de Coli-Coccen-Combinatie. Dit onderwerp behelsde niet zozeer een diepgaand onderzoeksproject maar een verkenning bij de verschillende DPWE bedrijven en Oasen hoe zij omgaan met de resultaten én de beoordeling van met name parameter Bacteriën van de coligroep oftewel Coli 37 graden.

De microbiologische kwaliteit en veiligheid van ons product is een gevoelig onderwerp en de bedrijven richten al jaren hun onderzoeks aandacht op soortendetectie, -typering, voorspelling van gedrag en duiding van positieve monsters, uiteindelijke ter voorkómen van besmetting van drinkwater. Gebleken is dat bij de duiding van de meetresultaten van met name bacteriën van de coligroep onderling de nodige verschillen bestaan hetgeen een onderlinge inhoudelijke discussie parten kan spelen, bijvoorbeeld wanneer het de kwaliteit van onderlinge leveringen betreft. Daarnaast blijkt ook dat voor de microbiologische basisgegevens in de doorvertaling naar de AMVD verschillen te bestaan. Veel bleek te maken met de wijze van interpretatie.

Het doel van deze verkenning was om ervaringen uit te wisselen, interpretatie van de resultaten van microbiologische eenduidig te beschrijven en om te komen tot één eensluidende notitie hierover.

De gekozen werkvormen zijn: een tweetal workshops, een enquête en het schrijven van een afsluitende discussie notitie.

In deze bundel zijn de verschillende projectonderdelen samengebracht.

Wat zéker is gelukt is om het onderwerp van verschillende kanten te belichten en bespreekbaar te maken. Wat ons ook is gelukt : te komen tot een notitie die de basis kan voren voor een eensluidende aanpak en interpretatie van Bacteriën van de coligroep in grootvolume monsters, een notitie die ons als bedrijfstak kan helpen in onderlinge gesprekken tussen Operationele Teams (OT's) tijdens incidenten of in discussie met ILenT.

Ook is gebleken dat over het onderwerp bacteriën van de coligroep in groot volume monsters het laatst woord nog niet over is gesproken; er zitten nog verschillen rond de vraag waar de feitelijke pijngrens ligt bij een verontreiniging met Coliformen 37graden. Nu is Rome ook niet op een dag gebouwd maar de BG is er van overtuigd dit de discussie ons een heel eind op weg heeft geholpen!

Leon Kors  
Voorzitter Begeleidingsgroep Waterkwaliteit



# ***Managementsamenvatting***

## **Project titel:**

Coli-Coccen Combinatie (CCC)

## **Auteur(s):**

H.J.P. Smit L.J. Kors, E.J.M. Penders

## **Datum verschijnen:**

11 Maart 2016

## **Begeleidingsgroep:**

DPWE Waterkwaliteit

## **Rapportnummer:**

KWR nummer

## **Samenvatting:**

In de afgelopen jaren hebben de 4 DPWE-bedrijven in meer of mindere mate te maken met (her)besmetting met bacteriën van de coligroep en/of *Enterococcen* in hun winningen, zuivering of distributiesysteem. Ofschoon de ervaringen qua ongemak nogal uiteen liepen van het aantreffen van aantallen bacteriën in grote volumes (de GROVOLs van ca 100L) tot het niet goed kunnen traceren van de herkomst van getypeerde stammen was er wel een rode graad te vinden: hoe kunnen we meer vat krijgen op onze individuele problematiek en meer halen uit onze wederzijdse ervaringen om vervolgens weer een verdiepingsslag te kunnen maken. Tijdens de voorbereiding is Oasen aangesloten bij het project, hierdoor kwam er ruim 16k€ extra budget beschikbaar.

De problematiek is gebruikt om het CCC project te starten en een tweetal activiteiten te initiëren:

### ***1. Ervaringsuitwisseling in Workshops***

In twee workshops hebben Dunea, PWN, Waternet, Evides, Oasen, HWL en KWR hun ervaringen, problemen en issues ten aanzien van het aantreffen van bacteriën van de coligroep en enterococci, het onderzoek voor het vinden van de besmettingsbron middels typering (source tracking) en het uitwisselen van ervaringen voor het reduceren of elimineren van het besmettingsrisico voor drinkwater. Hierbij is ook ingegaan op de microbiologische en statistische achtergronden en gezocht naar een gemeenschappelijke operationele interpretatie van microbiologische resultaten.

### ***2. Haalbaarheid achterhalen herkomst stammen met MALDI-TOF-MS***

Met MALDI-TOF-MS is het mogelijk allerlei eiwitten in bacteriën te bepalen. In de huidige praktijk wordt met een database van Brüker de bacteriesoorten benoemd van de kolonies op kweekplaten. Met verdere analyse van de eiwitspectra is onderzocht of met MALDI-TOF-MS en met de gebruikelijke enterococ-methode met kweek, er mogelijk onderscheid te maken valt tussen stammen die in het milieu een langere tijd (in)actief zijn of stammen die direct afkomstig zijn van fecaliën. Hiertoe zijn er experimenten uitgevoerd waarbij MALDI-TOF-MS



spectra werden geanalyseerd van *Enterococcus moraviensis* gekweekt in extracten van gras, feces van mens en gans. Vanuit deze eerste kweekfase werd een volume ook op de SBA kweekplaat gezet en werd van de verkregen kolonies de spectra geanalyseerd.

#### *Resultaten workshops*

De eerste workshop was op 10 april 2015 bij KWR te Nieuwegein. Doel van de workshop was vooral om elkaar ieders probleemstelling voor te leggen in het DPWEO verband. Patrick Smeets (KWR) heeft een presentatie gegeven over de relevantie van grootvolume monsters. In de middag zijn er groepjes gevormd om na de workshop met elkaar contact te zoeken over specifieke onderwerpen die spelen op het gebied van coli en enterococci (her)besmettingen in hun bedrijven.

De tweede workshop vond plaats op 2 oktober 2015 bij KWR te Nieuwegein. Doel van deze workshop was te onderzoeken of een gezamenlijk gedragen voorstel kon worden geformuleerd voor: :

- Hoe om te gaan met uitslagen van grootvolumemonsters (lagerhuis discussie format)
- In- en uitbedrijf criteria voor: a) winningen b) zuiveringen c) opslag en distributie in groepsdiscussie met terugkoppeling na afloop.

In de ochtend zijn presentaties gegeven door Leo Heijnen (KWR, over source tracking en PCR vs. kweek en de voor-/nadelen van beide methoden) Maja Taucer (HWL, over MALDI-TOF-MS) Eric Penders (HWL over de voortgang van het onderzoek naar de herkomst van enterococci (nagroeï of feces) met de MALDI-TOF-MS techniek). Naar aanleiding van de ervaringsuitwisseling in deze tweede sessie is een enquête uitgeschreven om de eenduidigheid scherper te formuleren in de bedrijfsspecifieke handelwijzen rond m.n. besmettingen door bacteriën van de coligroep in groot volume monsters.

Gebleken is dat er op hoofdlijnen beperkte verschillen zijn in de operationele aanpak die de DPWE-O bedrijven toepassen bij een microbiologische verontreiniging. Op basis hiervan is een voorstel geformuleerd "hoe om te gaan met Coliformen in groot volume monsters".

Indien dit gewenst is kan een derde workshop worden georganiseerd om deze inhoudelijk met de operationele teams van de drinkwaterbedrijven (OT's) te bespreken.

In 2016 zal de BG onderzoeken welke onderzoeksvragen op basis van de nu uitgewisselde ervaring kan worden geformuleerd.

#### *Resultaten achterhalen herkomst stammen met MALDI-TOF-MS*

Bij evaluatie van de verkregen MALDI-TOF-MS spectra is er onderscheid in *Enterococcus moraviensis* tijdens cultivatie in verschillende matrices (feces mens, feces vogel, gras) bij directe pelletmetingen waarbij bepaalde pieken aan massa's in het spectrum kunnen fungeren als merker. Echter dit onderscheid en de merkers verdwijnen na een kweekfase op vaste SBA voedingsbodem. Er is ook geen ander kenmerk te vinden in de MALDI-TOF-MS spectra na de kweekfase op SBA voor onderscheid van *Enterococcus moraviensis* tussen de verschillende matrices.

In relatie tot de praktijk, waarbij er altijd een ophopingsfase moet plaatsvinden om zo voldoende materiaal te krijgen om de MALDI-TOF-MS analyse te kunnen uitvoeren, is verdere MALDI-TOF-MS analyse van monsters na de SBA kweekfase, ter bepaling of er sprake is van een recente besmetting of een milieustam, niet mogelijk.

Vanuit de 'proof of principle' fase zal dit niet alleen gelden voor de enterococci maar vermoedelijk ook voor de gebruikelijke coliformen/E.coli-methode met kweek.

**Belang voor DPWE:**

Microbiologische veiligheid van drinkwater is een gevoelig onderwerp, een eensluidende interpretatie van microbiologische resultaten en handelingsperspectief is daarom zeer waardevol.

**Van belang voor:**

- Verantwoordelijken voor winning, zuivering, distributie

**Trefwoorden:**

*Enterococci*, Bacterien van de coligroep, *E-coli*, besmetting, distributie, zuivering, winning, infiltratie

## Memo

### Aan

leden DPWEO BG , leden OT

### Onderwerp

coliformen in groot volumes

### Doelstelling

Het verkrijgen van eenduidigheid tussen de DPWE-O bedrijven in de toepassing van de wettelijke normen en bedrijfsnormen bij de interpretatie van microbiologische meetwaarden; meer specifiek, de Bacteriën van de coligroep waarden in groot volume monsters.

### Inleiding

Voor de beoordeling van de microbiologische kwaliteit van het drinkwater en de productie processen wordt specifiek gekeken naar het vóórkomen van bacteriesoorten zoals de bacteriën van de coligroep, *Escherichia coli* en *Enterococcon*. De geleidelijke verwijdering van deze soorten gedurende het zuiveringsproces en de afwezigheid in drinkwater zijn belangrijke constatering voor de beoordeling van het functioneren van de zuivering en de betrouwbaarheid van het geproduceerde drinkwater. Onderstaande figuur geeft schematisch aan welke organismen waar voorkomen. Bacteriën van de coligroep kunnen van fecale of natuurlijke oorsprong zijn, terwijl *E. coli* zeker van fecale herkomst is. Er zijn ook pathogene *E. coli* soorten (EHEC). Afwezigheid van bacteriën van de coligroep toont ook aan dat *E. coli* en EHEC afwezig zijn. Bij afwezigheid van *E. coli* (of bacteriën van de coligroep) is het minder waarschijnlijk dat andere pathogene micro-organismen (bijvoorbeeld enterovirussen, *Campylobacter* bacteriën, *Cryptosporidium* of *Giardia*) aanwezig zijn, maar het biedt geen garantie. Deze kunnen soms in grotere aantallen aanwezig zijn dan *E. coli*, bijvoorbeeld doordat ze als sporevormers langer kunnen overleven in het milieu.

Aanwezigheid van *E. coli* toont aan dat er recente feces in het water is gekomen, maar is geen bewijs van aanwezigheid van pathogenen. Alleen feces van geïnfecteerde mensen of dieren bevat immers pathogenen. Het analyseren van water op indicatororganismen geeft daarom nooit 100% zekerheid over de veiligheid of het risico. Voor de praktijk zijn wel eenduidige richtlijnen voor beoordeling van en respons op meetresultaten gewenst. In de operatie gaan we er dus van uit dat aantreffen van *E. coli* of *Enterococcon* duidt op de potentiële aanwezigheid van pathogenen en dus ongewenst.

### Datum

8 september 2016

### Contactpersoon

L.J. Kors

### Doorkiesnummer

020 608 70 60

### E-mail

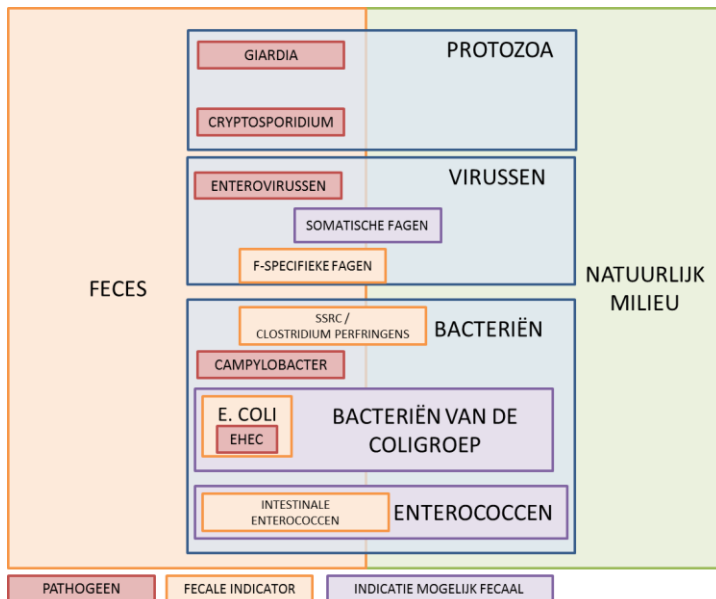
leon.kors@waternet.nl

Korte Ouderkerkerdijk 7  
Amsterdam  
Postbus 94370  
1090 GJ Amsterdam  
T 0900 93 94  
F 020 608 39 00  
KvK 41216593

[www.waternet.nl](http://www.waternet.nl)

1/10

Memo



Datum

8 september 2016

Voor de microbiologische beoordeling geeft de wet een helder statement: afwezigheid van deze soorten in 100 ml monster. Tevens worden aanwijzingen gegeven hoe te handelen bij constatering / aanwezigheid in drinkwater van de diverse bacteriesoorten (ILT, 2015; zie bijlage 2).

Naast bemonstering middels het wettelijk volume (100 ml) wordt de laatste jaren ook gebruik gemaakt van de zogenaamde groot volume monsters (GROVOL) in het kader van de analyse microbiologische veiligheid (AMVD of QMRA). Daarbij wordt, uitgaande van een gemiddelde dagelijkse inname van 280 ml ongekookt drinkwater, het jaarlijks infectierisico bepaald. Voor dit theoretische infectierisico geldt een grenswaarde van maximaal 1 infectie per 10.000 personen per jaar. Als indicatie kan dan gezegd worden dat daarmee maar 1 ziekteverwekker (virus, bacterie of protozoa) aanwezig mag zijn in ≈1 miljoen liter drinkwater.

In de AMVD wordt primair gekeken naar pathogenen (enterovirussen, *Campylobacter*, *Giardia*, *Cryptosporidium*). Omdat deze soorten in zeer lage aantallen voorkomen in de bronnen en de zuivering wordt voor een schatting van de verwijdering van *Campylobacter* gekeken naar de verwijdering van de bacteriesoorten *E.coli* als indicator voor het gedrag dit pathogeen. (zie bijlage 1). Omdat de analysemethode ook bacteriën van de coligroep telt, worden deze naast de *E. coli* resultaten gerapporteerd. Deze aanpak in de AMVD is een belangrijke aanleiding om bacteriesoorten in groot volume monsters te meten.

Het gebruik van groot volume (100 liter) monsters geeft:

- Meer inzicht in het feitelijk niveau van aanwezigheid van fecale indicator-organismen in bronnen voor drinkwater zoals genoemd in de wet: Bacteriën van de coligroep, *E.coli*, en *Enterococccen*. Een overschrijding van de wettelijke norm kan worden voorkomen omdat verontreiniging al op een lager niveau wordt gedetecteerd.
- Meer inzicht in de variatie van achtergrondwaarden van de betreffende bacteriesoorten. Zo kan een incident worden onderscheiden van normale variatie.
- Meer inzicht in de effectiviteit van zuiveringsprocessen voor het verwijderen van menspathogene bacteriën (*Campylobacter*, EHEC). In deze benaderingswijze worden de benoemde bacteriesoorten als modelparameter beschouwd. (zie tabel in bijlage 1).

2/10

## Memo

- Meer inzicht in mogelijk binnentreden van 'vreemd' water in systemen met schoon drinkwater (reinwaterreservoir, distributie),
- Detectie van bacteriën in grootvolume monsters geeft aan dat er recent een mogelijk fecale verontreiniging van het water is opgetreden mogelijk met menspathogene micro-organismen en mogelijk leidt dit tot een overschrijding van de grenswaarde voor het infectierisico, ook bij concentraties <1 per 100 ml.

**Datum**

8 september 2016

Het nemen van een grootvolume monster vergroot de kans op het aantreffen van genoemde bacteriën, er wordt met bijvoorbeeld een 100 L monster immers een 1000 maal groter volume genomen t.o.v. een 100 ml monster. Oftewel we meten op een log 3 nauwkeuriger niveau.

Op deze wijze zijn we de afgelopen jaren regelmatig geconfronteerd met het aantreffen van met name bacteriën van de coligroep in watermonsters. Het voordeel van de grootvolume monsters is dat een eventuele kwaliteitsafwijking in een vroeg stadium / laag niveau kan worden gedetecteerd.

De wet schrijft dat geen van de genoemde bacteriën in een monster van 100 ml mag zitten. De vraag is of met het aantreffen van één of een beperkt aantal bacteriën (*E. coli*, bacteriën van de coligroep, of *Enterococci*) in een groot volume direct een wettelijke normoverschrijding aan de orde is (nee!) of dat het aantreffen van bacteriën in een groot volume een indicatie is een verslechterende trend die opvolging behoeft.

In de afgelopen jaren is gebleken dat de DPWE bedrijven worstelen met de vraag hoe de resultaten van de groot volume monsters moeten worden geïnterpreteerd, en de verschillende wijze waarop wordt geacteerd bij positieve metingen. Moet één bacterie worden gezien als een besmetting (dus calamiteit) of als een indicatie van de "natuurlijke" achtergrondwaarde. Het antwoord op deze vraag hangt samen met de interpretatie en duiding van de resultaten.

Binnen de DPWE Begeleidingsgroep (BG) Waterkwaliteit is geconstateerd dat deze verschillen bestaan en dat er een sterke wens bestond om gezamenlijk een verkenning te doen naar onze ervaringen om tot een gedragen gezamenlijk standpunt in te komen.

### CCC programma

Onder de naam CCC (Coli-Cocci Combinatie) is in 2015/2016 een vergelijk gemaakt van uitgangspunten, inzichten en ervaringen met microbiologische metingen in met name groot volume monsters.

Een van de doelstellingen was om te onderzoeken of eenduidigheid is te krijgen tussen de DPWE bedrijven in de toepassing van de wettelijke normen en bedrijfsnormen bij de interpretatie van microbiologische meetwaarden. Oasen bleek ook geïnteresseerd in participatie. Tijdens een tweetal workshops is intensief stilgestaan bij verschillende aspecten van de materie (betekenis van de verschillende organismen, statistiek volgens de QMRA, soortentyping middels MALDI-TOF, herkomst duiding middels Source tracking). De begeleidingsgroep (BG) Waterkwaliteit is op basis van een uitgevoerde enquête bij DPWE-O van mening dat er dusdanig kleine verschillen bestaan in de interpretatie en handelswijze dat uniformering enigszins mogelijk is. Om die reden is deze notitie door de DPWE begeleidingsgroep Waterkwaliteit samengesteld.

3/10

## Memo

Datum

8 september 2016

### Rol van de OT's

Omdat bij een overschrijding van normwaarden van microbiologische parameters vaak opschaling naar een operationeel team (OT) plaatsvindt en tussen de bedrijven verschillende onderlinge (nood)leveringspunten zijn acht de BG het van belang dat deze notitie door de vertegenwoordigers van de BG worden ingebracht bij de OT's, en het geschetste handelingsperspectief wordt besproken en het liefst vastgesteld. Indien gewenst kan een gezamenlijke workshop met BG en OT afgevaardigden worden verzorgd om de materie toe te lichten.

Het effect hiervan zal zijn:

- eenduidige interpretatie van microbiologische resultaten zoals geproduceerd door onze laboratoria
- uniforme duiding van resultaten en handelswijze in de onderlinge communicatie tussen de bedrijven indien dit aan de orde is op operationeel/OT niveau.

### **Toepassing norm**

In de enquête is onderscheid gemaakt in ervaringen met de wettelijk normen en volumes en de groot volume monsters.

### Wettelijk volume (100 ml)

Wettelijke norm = afwezigheid van genoemde micro-organismen (Bacteriën van de coligroep, *E. coli*, *Enterococce*n) in 100 ml.

Er is bij de drinkwaterbedrijven géén verschil in handelswijzen t.a.v. het 100 ml volume. Bij constatering van 1 (één) of meer exemplaren *E. coli* of *Enterococce*n in 100 ml wordt conform de ILT richtlijn direct actie ondernomen om blootstelling aan mogelijk aanwezige pathogenen te voorkomen, bijvoorbeeld door de betreffende bron of het betreffende procesonderdeel uit bedrijf te nemen of een kookadvies te geven.

Vervolgacties zijn bijvoorbeeld typering, hernieuwd bemonstering op het betreffende monsterpunt, bemonstering op de belendende monsterpunten, omleiding van de waterstroom, complete afschakeling of reiniging hiervan. Bij het aantreffen van alleen bacteriën van de coligroep wordt eerst het resultaat van de herbemonstering afgewacht, tenzij er ook andere aanwijzingen zijn voor een (fecale) verontreiniging.

Interessant voor de beoordeling van urgentie dat de ILT procedure wel nader onderzoek oplegt is bij het vinden van bacteriën van de coligroep maar bij een eventuele herbevestiging deze slechts per kwartaal gerapporteerd wil hebben.

Wettelijk volume monsters (100 ml): bacterie tellingen in rode zone en distributie

Bacterie aantallen in wettelijk volume	<i>E. coli</i> of <i>Enterococce</i> n <sup>1</sup>	Bacteriën van de coligroep
0	Geen actie	Geen actie
1 of groter	Melden en acteren conform procedure ILT – zie bijlage 2	Melden en acteren conform procedure ILT – zie bijlage 2

<sup>1</sup> In de ILT procedure wordt melding gemaakt van intestinale *Enterococce*n. Momenteel loopt een discussie aangaande een specifieke soortentyping. In deze notitie wordt hier niet mee gewerkt en worden alle *Enterococce*n, geanalyseerd conform NEN-EN-ISO 7899-2, gemeld.

## Memo

Datum

8 september 2016

### Groot volume monsters (1 liter of meer)

De belangrijkste verschillen kwamen naar voren bij de interpretatie van groot volume monsters, het volume dat o.a. wordt ingezet in het kader van de QMRA methodiek.

De DPWE bedrijven gebruiken overigens verschillende volumes variërend van 1L in de blauwe of oranje zone tot 20 tot ruim 100 L in de rode zone<sup>2</sup>.

De hier voorgestelde handelswijze betreft de monsters uit de rode zone.

### Groot volume monsters (20-100 L): bacterie tellingen in rode zone

Bacterie aantallen in groot volume	<i>E. coli</i> of <i>Enterococce</i> n	Bacteriën van de coligroep
0	Geen actie	Geen actie
1-3*	Acteren conform procedure ILT, muv melden – zie bijlage 2	Afhankelijk van omstandigheden De te overwegen acties staan hieronder vermeld.
>3	Acteren conform procedure ILT, muv melden – zie bijlage 2	Acteren conform procedure ILT, muv melden – zie bijlage 2

\* Bij het voorstel van de bandbreedte 1-3 kve speelt de verdeling van micro-organismen in water een rol. Bacteriën zijn per definitie niet homogeen verdeeld, bacteriën komen in suspensie in groepjes voor. Bij een steekproef (monstername) is er een kans dat 'toevallig' 1 bacterie wordt aangetroffen, terwijl de concentratie op dat moment ver onder de meetgrens (1 per monstervolume) kan liggen. Zijn er grotere aantallen bacteriën aanwezig in het water dan is een enkelvoudige 'toevalstreffer' zeer onwaarschijnlijk en is de kans groter dat dat bij herhaling er weer bacteriën in het monster aanwezig zullen zijn. Bij een monstername uit een bacterie suspensie van ca 1 kve / 100 L is de kans vergelijkbaar dat bij een waarde van 1 tot enkele wordt gevonden gezien dit verdelingsaspect. De BG acht het verdedigbaar om te stellen dat bacterieaantallen binnen een zekere bandbreedte als gelijk kunnen worden beschouwd. Bemonstering van een homogene bacterie suspensie zal altijd een variatie aan waarden opleveren. En variantie van 5 is niet afwijkend (HWL).

Binnen de DPWE bedrijven was het drempelniveau waarbij na herbemonstering tot verdere sneller actie werd overgegaan verschillend, variërend van 1 tot 10 kve/100L.

Gezien bovengenoemde trefkans voor bacteriën bij een bemonstering, gezien het gegeven dat met groot volume monsters ver onder de wettelijke detectiegrens van 1/100ml wordt gemeten en gezien het gegeven dat soms sprake kan zijn van niet-fecaal verdachte soorten is in de BG voorgesteld dat bij een groter aantal bacteriën van de coligroep (meer dan 3) pas sprake is van een wezenlijke verhoging dat 3 kve niet significant verschillend is van 1 kve. (met en betrouwbaarheid van 95%)

\*\*Bij de inventarisatie bleek dat de meeste bedrijven bij 4 of meer bacteriën van de coligroep in een groot volume conform de ILT procedure wordt geacteerd (wel de handelingen, niet de meldingen aan ILT). Het is goed ons te realiseren dat dit veel strenger is dan ILT ons voorschrijft. De Drinkwaterbedrijven streven er dus naar om een veel strengere Bedrijfsnorm te hanteren (log 2-3 strenger) dan ILT ons oplegt. Mede gezien het feit dat ILT pas bij herhaling van de wettelijke norm (dus 2 maal een monster > 1 kve/100ml) gerapporteerd wel krijgen is het hanteren van 4 kve of hoger /groot volume een streng opgelegde norm.

<sup>2</sup> De Blauwe, Oranje en Rode zone verwijst naar de zonering zoals die in de Hygiëncode Drinkwaterbereiding (KWR 2012.083) is beschreven.

## Memo

Datum

8 september 2016

### **Betekent het aantreffen van een *E.coli* in een groot volume direct het overschrijden van het jaarlijkse $10^{-4}$ infectierisico (AMVD)?**

Een relevante en regelmatig terugkerende vraag die opdoemt, is de vraag of we het aantreffen van *E. coli* en intestinale *Enterococci* gelijk moeten stellen aan de aantallen pathogenen, met andere woorden, betekent het aantreffen van een *E. coli* in bv 100 liter direct dat het jaarlijks  $10^{-4}$  infectierisico dan direct overschreden is?

NEE, het aantreffen van *E. coli* in een groot volume betekent dat je systeem anders werkt dan je dacht, er is blijkbaar recente fecale verontreiniging in je water gekomen. Dat is geen hard bewijs dat het infectierisico wordt overschreden, maar het is wel waarschijnlijker dan voorheen. Belangrijk is om snel te begrijpen wat er aan de hand is, en dan kan het risico beter worden geschat. Bij een enkele overschrijding zal dit vaak niet lukken en is het blijkbaar vanzelf opgelost. Als het vaker optreedt, moet je doorgaan met zoeken tot je het oplost. Als het samenhangt met falen van de zuivering, kan het infectierisico worden geschat. Bij een herbesmetting is dit erg lastig omdat de samenstelling van de verontreinigingsbron onbekend is (gezond of geïnfecteerd persoon of dier).

### **Opties voor te nemen maatregelen**

Na het constateren van de ongewenste verontreiniging staan verschillende maatregelen ter beschikking. Afhankelijk van aard, niveau van de verontreiniging en locatie in de zuivering / distributie zijn dit monitorende, sturende of corrigerende maatregelen:

#### Monitoren:

- Soortentyping
- Herbemonstering van het betreffende monsterpunt
- Bemonstering op voor-, achterliggende of belendende monsterpunten in de zuivering / distributie
- Wachten : het uitzieken van de verontreiniging (bv bij filters)
- Navraag doen of er bijzondere bedrijfsomstandigheden of onjuist gebruik van bv glijmiddel is gebruikt

#### Sturen:

- Doorspoelen, spuien, desinfectie, bijvoorbeeld bij leidingen
- Debiet verlaging, de levering uit een proces onderdeel verminderen
- Betreffende onderdeel uit de levering houden en op rondpompen zetten

#### Corrigeren

- Drainen en desinfecteren, bijvoorbeeld bij een reservoir
- Verhogen dosering van de desinfecterende stap (UV, ozon)
- Kookadvies

#### Anders

- Inkopen drinkwater bij collega bedrijven



## Memo

### Onderbouwing van deze strategie

Datum

8 september 2016

Tijdens het CCC project is uitgebreid stilgestaan bij de argumenten die bij deze aanpak horen. Belangrijk om te benadrukken is, dat ook het aantreffen van Bacteriën van de coligroep een niet wenselijke situatie is en dat daarom nader onderzoek en actie gewenst is.

Argumenten die gelden om niet direct tot rigoureuze maatregelen over te gaan zijn:

- Benadering achtergrond signaal: het kan zijn dat het periodiek aantreffen van een gering aantal Bacteriën van de coligroep in 100L overeenkomt met een "normale" achtergrondwaarde. Indien dit sporadische voorkomt leidt dit zelden tot een overschrijding van de (1000 maal hogere) wettelijk norm. Wettelijk is er dan weinig aan de hand, aandacht is wel gewenst.
- QMRA beoordeling: De toepassing van de 100L methodiek t.b.v. het  $10^{-4}$  infectierisico geeft een andere "waarde" aan het aantreffen van bv *E. coli*. In deze methodiek wordt *E. coli* gebruikt als model parameter voor de verwijdering van *Campylobacter*.
- Sommige Bacteriën van de coligroep kunnen nagroeien en hoeven niet fecaal te zijn en zijn daarom vooral aanleiding voor nader onderzoek naar een mogelijke fecale verontreiniging.
- Bacteriën van de coligroep gelden in deze aanwezigheidsindicator als een early warning parameter omdat die over het algemeen in groter aantallen (log 2-3) voorkomen dan *E. coli* en een niet-fecale oorsprong kunnen hebben. Een mildere handelwijze bij bacteriën van de coligroep in aantallen tussen 1-3 kve in een groot volume kan daarom worden toegepast.
- Fecale oorsprong of anderszins: gebleken is dat de soorten die op een selectieve agar bodem als Bacteriën van de coligroep groeien, niet standaard van fecale oorsprong zijn. Dit betekent dat het voor kan komen dat "Bacteriën van de coligroep" van niet fecale origine wel worden aangetroffen maar wellicht afkomstig kunnen zijn uit nagroei en niet hoeven te duiden op een recente fecale besmetting. Het waarnemen van niet-fecale coliformen kan duiden op een "verstoring" van/in het proces. Source tracking, MALDI-TOF typering en next generation sequencing (NGS) kunnen hierbij ondersteunende technieken zijn.

#### Bacteriën en statistiek

Van microbiologische parameters is bekend dat de standaard afwijking zeer groot is. **Aanwezigheid van 1 of 3 kve is dus niet significant verschillend.** Dit is, alsmede het gegeven dat Bacteriën van de coligroep niet per definitie van fecale herkomst hoeven zijn, een reden dat Dunea voor een hogere triggerwaarde kiest: 10 kve/100L.<sup>3</sup>

<sup>3</sup> KWR: Vanuit getalsmatige oogpunt zou je 1-3 toe kunnen passen voor *E. coli* en voor Bacteriën van de coligroep 10/100 L (of zelfs 100). Dan zit je op het niveau dat je wettelijk norm overschrijdingen gaat voorkomen. Daaronder wil je alleen toekijken.

## Memo

### **Handelingsperspectief voor OT bij Bacteriën van de coligroep**

**Datum**

8 september 2016

Het aantreffen van Bacteriën van de coligroep blijft een indicator voor een ongewenste kwaliteitsontwikkeling, het kan duiden op (fecale of 'natuurlijke') verontreiniging, een verstoring van het zuiveringsproces of nagroei van micro-organismen.

De inzet van grootvolume monsters is een strategisch instrument om in een vroeg stadium een veranderende kwaliteitsverandering te kunnen detecteren en daarmee de kans te verkleinen dat bacterieaantallen uiteindelijk op een wettelijk niveau worden aangetroffen (>0 /100ml).

De soortentyping middels MALDI-TOF kan helpen de herkomst van de verontreiniging te duiden maar is niet sluitend, wel indicatief. Deze typering kan worden meegewogen in de beoordeling van te ondernemen acties indien er aanwijzingen zijn dat deze van natuurlijke en niet fecale oorsprong zijn.

Mits de aantallen in een grootvolume monster laag zijn (1-3) en op dit niveau als achtergrondsignaal blijven kan, afhankelijk van het monstervolume, de omstandigheden en de vermoedelijke oorzaak gekozen worden voor een milde aanpak:

- Intensivering van monitoring, zowel met herhaling van betreffende als overige monsterpunten, zoeken naar de oorzaak;
- Het in bedrijf houden van betreffende procesonderdeel of de drinkwaterlevering;
- Het uitzieken van de "aandoening" bij incidentele hits tot deze bij herhaling niet meer wordt aangetroffen;
- Langere termijn monitoren om te bepalen of dit een achtergrondniveau is of een toenemende trend die tot een overschrijding kan leiden;
- Melden aan doorlever-relaties zodat zij eventuele positieve resultaten kunnen duiden.

Bij een groter aantal bacteriën worden strengere maatregelen genomen, zulks altijd ter beoordeling aan het OT van het betreffende drinkwaterbedrijf, overeenkomstig de handelwijze die ILT in haar instructie voorschrijft. Hierbij mogen we in het achterhoofd houden dat deze aanpak veel strenger is dan de wet ons voorschrijft.

Het handelingsperspectief in deze notitie over interpretatie van bacterieaantallen in groot volume monsters zal bijdragen aan eenduidigheid binnen DPWEO. Dit geldt voor zowel de onderlinge communicatie alsmede de communicatie naar ILT over risico beoordeling en duiding van microbiologische waterkwaliteit.

## Drinkwater

Productie

## Memo

### Samenstelling DPWE werkgroep:

Dunea	Ed van der Mark
PWN	Herman Smit
Waternet	Leon Kors
Evides	Roland van Asperen / Bas Schaaf / Eveline Sack
Oasen	Jos Dusseldorp
HWL	Eric Penders
KWR	Patrick Smeets

### Datum

8 september 2016

### Literatuur

ILT (2015), Melden normoverschrijdingen, procedure voor het melden door drinkwaterbedrijven van een normoverschrijding van de drinkwaterkwaliteit. Maart 2015.

Hygiënecode Drinkwaterbereiding KWR 2012.083 Januari 2013

## Memo

### Bijlagen

Datum

8 september 2016

### Bijlage 1

Overzicht van humaan pathogenen en de gebruikte modelparameters in de QMRA methodiek

Humaan pathogenen te meten in de laatste open bron	Modelparameter voor de bepaling zuiveringscapaciteit van een proces
Campylobacter	<i>E. coli</i>
Cryptosporidium	Clostridium
Giardia	Clostridium
Enterovirussen	Bacteriofagen

### Bijlage 2

#### E. coli

Het aantreffen van *E. coli* in het eerste monster moet **direct** worden gemeld. Er moeten direct corrigerende acties worden genomen en een kookadvies worden gegeven, tenzij in overleg met ILT is bepaald dat dit niet noodzakelijk is. Dezelfde dag moet een herhalingsmonster worden genomen. Het herhalingsmonster wordt tevens onderzocht op de aanwezigheid van Enterococci. De resultaten van de analyse van het herhalingsmonster moeten direct worden gemeld.

#### Enterococci

Het aantreffen van Enterococci in het eerste monster moet **direct** worden gemeld. Bij intestinale Enterococci moeten tevens direct corrigerende acties worden genomen en een kookadvies worden gegeven, tenzij in overleg met ILT is bepaald dat dit niet noodzakelijk is. Dezelfde dag moet een herhalingsmonster worden genomen. Het herhalingsmonster wordt tevens onderzocht op de aanwezigheid van *E. coli*. De resultaten van de analyse van het herhalingsmonster moeten direct worden gemeld.

#### Bacteriën van de coligroep

Bij het aantreffen van bacteriën van de coligroep moeten herhalingsmonsters worden genomen. De herhalingsmonsters tevens onderzoeken op *E. coli* en Enterococci. Normoverschrijdingen van bacteriën van de coligroep worden periodiek, in de eerste week van elk kwartaal, gemeld, mits het herhalingsmonster positief is.

(Bron : ILT (2015))

## 1.1 CCC – De Coli-Coccen Combinatie

<b>Projectnaam</b> CCC	<b>Datum voorstel</b> 3/11/2014	<b>Projectnummer</b> (vul ik later in. DV)
<b>Begeleidingsgroep</b> Waterkwaliteit	<b>Startdatum</b> 1-1-2015	<b>Einddatum</b> 31-12-2015
<b>Projectmanager</b> Edwin kardinaal	<b>Budget KWR (k€)</b> 19	<b>Budget HWL (k€)</b> 46

### Aanleiding

Wanneer 4 bedrijven besluiten gemeenschappelijk op te trekken in een onderzoeksprogramma dan is dat een mooi voornemen, maar als bij de eerste sessie om tot invulling te komen er unaniem één onderwerp is dat met kop en schouder opkomt dan lijkt het haast afgesproken werk...

Bij bestudering van ieders longlist voor onderzoek ideeën kwam als rode draad het volgende microbiologische operationele knelpunt tevoorschijn: in ieders winning/productie/distributie gebied komen periodiek ongewenste hoeveelheden coliformen en/ of enterococci voor. Ofschoon de diversiteit in sub-onderwerpen betrekkelijk groot is en de verwachting niet bestaat dat dit met één jaar onderzoek is te tackelen heeft de begeleidingsgroep besloten de verschillende items samen te brengen in een project: de Coli-Cocci-Combinatie (CCC).

Alle bedrijven hebben op verschillende fasen van de drinkwaterbereiding ervaringen met detectie, determinatie en bestrijding van de micro-organismen. Het samenvoegen en vergelijken van deze ervaringen en het uitwisselen van de onderliggende onderzoeksvragen is een belangrijke stap in een gezamenlijke aanpak.

Een bloemlezing van de microbiologische perikelen:

- Tot welke hoeveelheid aangetroffen kve coli37 en/of enterococci kan over achtergrond<sup>1</sup> concentratie gesproken worden en vanaf welk niveau als (her)besmetting (dit kan per bedrijf verschillend zijn)?;
- Zijn de aangetroffen kve CC's in het teruggewonnen water (drainwater) van natuurlijke herkomst (planten, koudbloedige dieren) of van (her)besmetting van warmbloedigen (dieren, mensen, vogels);
- Wat is de relatie tussen het aantreffen van CC's in teruggewonnen water (drainwater) en de grondwater niveaus rondom de winputten of drains;
- Hoe hoog is de verwijdering van enterococci / coli37 in 50 cm en diepere onverzadigde zone bij een reële fecale belasting in de duin en wat zijn de overlevingstijden van deze micro-organismen in de duinbodem?  
Zie onder andere ook het conceptrapport uit het bedrijfstakonderzoek van dit jaar en de workshop van 10 november 2014 bij Dunea<sup>3</sup>;

<sup>1</sup> Er zijn aanwijzingen dat in drinkwater af productielocatie in groot volume monsters van 100 liter soms 1-2 kve coli37 worden aangetroffen.

<sup>2</sup> Van coli37 is al langer bekend dat dit een nagroeier kan zijn. Recenter resultaten van onderzoek naar enterococci (MALDI-TOF) wijzen eveneens in die richting.

<sup>3</sup> Concept BTO rapport van het Thematisch onderzoek Hygiëne en Veiligheid: "Verwijdering van *Escherichia coli* en MS2 bacteriofagen in de onverzadigde zone en de invloed van dikte, regenintensiteit en opgeloste organische stof".

- Mogelijk dat via modelstudie<sup>4</sup> nagegaan kan worden wat de maximale belasting van micro-organismen op het duin mag zijn in relatie tot de toestroom van micro-organismen van oppervlaktewater in het pand. Wat zijn de seizoensinvloeden hierbij?
- Wat zijn oorzaken voor het periodiek aantreffen van hogere aantallen enterococci en coli37 in:
  - Verzameld uit duin onttrokken water (VOW – Dunea; ruwwater – PWN; Oranjekom/Plas – Waternet; Water onttrokken uit de infiltratiegebieden (Evides))
  - Geconstateerde doorslag op Weesperkarspel 2014 (Waternet)
  - Vóórkomen van indicatorbacteriën in het distributiegebied na werkzaamheden – Dunea<sup>5</sup>;
  - Periodiek voorkomen (m.n. najaar) in het distributiegebied van vals negatieve metingen (Waternet)
- Leveren de aantallen die gemeten worden in de groot volumemonsters een feitelijk risico op (norm overschrijding) of kunnen de resultaten als indicatief worden gezien?<sup>6</sup>
- Relevantie van de groot volumemonsters in de AMVD normering bij bovengenoemde knelpunten; borging van het  $10^{-4}$  risico (Drinkwaterbesluit) kan alleen door onderzoek te doen in grote volumina<sup>7</sup>
- Tussen de (DPWE-)bedrijven bestaat op managementniveau geen overeenstemming over de wijze waarop de onderzoeksresultaten van het groot volumeonderzoek in de bedrijfsvoering moet worden geïnterpreteerd. Het lijkt verstandig om in overleg met ILenT tot een gemeenschappelijke visie te komen.
- Vanuit de literatuur zijn verschillende methoden bekend die onderscheid kunnen maken of CC's van een natuurlijke herkomst of van warmbloedigen afkomstig zijn<sup>8</sup>;
- De methode ontwikkeling met source tracking middels DNA-merkers is veelbelovend maar lijkt nog niet het ultieme instrument te zijn om voldoende specifiek soort specifieke besmetting te duiden.

<sup>4</sup> Zie ook DPWE onderzoek 2014: Microbiologische risico's bij de winning van drinkwater na duininfiltratie.

<sup>5</sup> Een onderzoek waarbij tijdens werkzaamheden naast de gebruikelijke volumina ook 1 liter monsters werden genomen, bleek dat in 10% van de gevallen het 100 mL monster een vals negatieve uitslag gaf.

<sup>6</sup> Zie memo van Patrick Smeets van 2 april 2014: "Interpretatie microbiologische waterkwaliteitsbeoordeling", ten behoeve van de Themagroep Hygiëne en Veiligheid.

<sup>7</sup> Benadering van de maximaal aanwezige hoeveelheid pathogenen/indicatorbacteriën per volume uitgaande van de grenswaarde in het Drinkwaterbesluit 2011. De grenswaarde voor het infectierisico in het Drinkwaterbesluit (2011) is maximaal 1 infectie per 10.000 personen per jaar. Met een consumptie van 222,3 ml per persoon per dag bedraagt dit per jaar voor 10.000 personen ongeveer 811.395 liter drinkwater. Dus bij 1 infectie per 10.000 personen betekent dit dus één pathogeen/indicatorbacterie per 811.395 liter drinkwater, of  $1,2 \times 10^{-6}$  indicatorbacteriën per liter, of maximaal 1,2 indicatorbacteriën per 1.000.000 liter drinkwater. Deze redenering levert, met verwijdering van 3 logeenheden door de langzame zandfilters, een grenswaarde op van maximaal 1,2 indicatorbacteriën per 1.000 liter verzameld uit het duin onttrokken water (VOW). In de aanbeveling voor het onderzoek is om praktische redenen in plaats van 1.000 liter per watermonster gekozen voor een volume van 100 liter. Dit volume is dus eigenlijk te klein om te waarborgen dat het infectierisico wordt gehaald.

<sup>8</sup> Litmustest (Martin & Mundt, 1972), identificatie van milieustammen met genome sequencing (Weigand et al., 2014), HWL past herkomstonderzoek succesvol toe met MALDI-TOF.

Deze aandachtsgebieden voor enterococci en coli37 vallen pakweg in drie onderdelen uiteen:

- 1) detectie en herkomst (vaststellen om welke indicatorbacteriën het gaat, de herkomst en vermogen tot groei);
- 2) vraagstukken en praktijk ervaringen van behandeling in winning, productie en distributie;
- 3) kwantitatieve consequenties van voorkomen (normen, groot volume metingen, statistiek).

De begeleidingsgroep kiest derhalve ook voor een driedelige projectuitwerking. De begeleidingsgroep stelt dat bij dit project meerderde doelen worden gediend: zowel een verdiepingsslag ten aanzien van de detectie/methode ontwikkeling alsmede de uitwisseling van relevante ervaringen.

### **Doel**

Uitwisselen van ervaringen met enterococci en coli37 besmettingen in de verschillende bedrijfssectoren in relatie tot de procesvoering alsmede het verdiepen van de detectie methodiek voor soort determinatie (bijvoorbeeld via MALDI-TOF). Tenslotte zal ten aanzien van de meetstrategie (groot volumeonderzoek) een eensluitend advies worden geschreven over de toepassing van deze onderzoeksresultaten.

### **Aanpak**

#### Workshops

Het organiseren van minimaal 2 workshops waarin inhoudelijk met verschillende ervaringsdeskundigen ervaringen worden gedeeld, te beginnen met winning. Hierbij wordt bewust met kleine groepen gewerkt (3 personen per bedrijf) en door presentatie en discussie ingezoomd op ervaringen, knelpunten en oplossingsrichtingen. In workshop 1 worden ervaringen/onderzoeksresultaten gepresenteerd en bediscussieerd.

Na discussie leidt dit tot vervolgonderzoek.

In workshop 2 worden de bevindingen na 2-3 maanden terug gerapporteerd.

Als deze methode aanslaat kan ook voor zuivering en of distributie een soortelijke aanpak worden gedaan. Dit leidt dan tot vervolgonderzoek in DPWE verband in 2016.

#### Onderzoek

Opstellen/uitvoeren onderzoeksprogramma dat tijdens workshop 1 is gedefinieerd. Hiervoor zijn verschillende technieken beschikbaar om de herkomst van de enterococci en coli37 bacteriën te bepalen. Een van de waardevolle technieken is MALDI-TOF.

MALDI-TOF -detectie milieu stammen versus enterische stammen: HWL heeft een stammdatatabase beschikbaar met daarin enterococci met verschillende fecale oorsprong. In de eerste fase worden enkele van deze stammen met de litmusmelktest en MALDI-TOF spectra geanalyseerd. Daarnaast worden enterococci stammen afkomstig van het milieu of na groeiproef op bijvoorbeeld plantenmateriaal met beide testen geanalyseerd. Met deze analyses wordt de proof of principle vastgesteld. In de tweede fase worden praktijkmonsters uit duinfiltraten die positief zijn voor enterococci door MALDI-TOF-analyses geëvalueerd of deze milieustammen zijn of dat deze afkomstig zijn van fecaliën. Bij die monsters die naast enterococci ook coliformen bevatten en waarbij onderscheid verkregen werd in fecaal/niet-fecaal, worden de coliformen spectra geëvalueerd of daarbij ook een kenmerk aanwezig is voor fecaal/niet-fecaal.

#### Statistiek en groot volume metingen

De statistische kant van de discussie lijkt te raken aan de activiteiten van de werkgroep hygiëne en veiligheid. Met deze groep wordt contact gezocht om een eensluitend beeld te schetsen voor de meetstrategie zoals die bij de DPWE bedrijven wordt bezigd.

### Projectopbrengsten

- Verslag van workshops waarin ervaringen, knelpunten en oplossingen worden gedeeld;
- Inzicht in herkomst van waargenomen enterococci (wel of niet fecaal).
- Rapportage over de onderzoeksresultaten en verbetering van de determinatie methodiek;
- Advies over hoe met resultaten van groot volume onderzoek moet worden omgegaan.
- Aanbevelingen voor de bedrijfsvoering.

### Begroting

Onderdeel Detectie en determinatie	€40.000,-
Bestaande uit:	
• Fase 1: Opstellen hypothesen	€10.500,-
• Fase 2: praktijkmonsters uit duin analyse MALDI-TOF	€21.500,-
• Rapportage (inclusief kwaliteitsborging door KWR)	€8.000,-
Onderdeel workshops : 2 x 6 personen (3 HWL; 3KWR) a € 1.100,-	€15.000,-
Onderdeel statistiek : 2 x 2 personen a € 1.100,-	€5.000,-
Managementsamenvatting / overleg / Projectmanagement	€5.000,-
<b>Totaal</b>	<b>€65.000,-</b>

### Contactpersonen

Dunea: Ed van de Mark  
PWN: Herman Smit  
Waternet: Leon Kors  
Evides: Heleen Westerink

HWL: Eric Penders  
KWR: Patrick Smeets/Leo Heinen/Luc Hornstra

### Criteria

*Urgentie: Hoog*

*Aantal DPW-bedrijven dat aan project belang toekent: 4*

*Link met het BTO ('implementatie BTO kennis'): Themagroep Hygiëne en Veiligheid*

*DPWE of BTO?: DPWE (motivatie: het betreft hier een operationeel knelpunt, aantreffen indicatorbacteriën, dat door alle bedrijven wordt ervaren.)*

### Literatuur:

Martin, J.D. and Mundt J.O. (1972). Enterococci in Insects. Applied Microbiology, Vol 24, No 4, p. 575-580

Weigand M.R., Ashbolt N.J. Konstantinidis K.T. and Santo Domingo J.W. (2014). Genome sequencing reveals the environmental origin of enterococci and potential biomarkers for water quality monitoring. Environmental Science and Technology, 48, p. 3707-3714



# Projectdefinitie - Plan van Aanpak

Projectnaam MALDI-TOF-MS analyse ter discriminatie en karakterisering van milieustammen van enterococcen/coliformen/ <i>E.coli</i> versus enterische stammen.	Projectnummer	Datum 23 maart 2015
Opdrachtgever DPWE	Projectmanager Edwin Kardinaal	Doorlooptijd 1 jaar
Kwaliteitsborger n.t.b.	Projectleider Eric Penders	Budget (k€) 40

## Aanleiding

In het kader van DPW onderzoek in 2015 is een project gestart (CCC - De Coli-Coccen Combinatie) met als rode draad het volgende microbiologische operationele knelpunt: in ieders winning/productie/distributie gebied komen periodiek ongewenste hoeveelheden coliformen en/ of enterococcen voor. Alle DPWE bedrijven hebben op verschillende fasen van de drinkwaterbereiding ervaringen met detectie, determinatie en bestrijding van de micro-organismen.

Bij constatering van een besmetting wordt de vraag gesteld of de besmetting direct afkomstig is van feces of dat de besmetting het gevolg is van nagroei of afkomstig is van een andere bron. Met deze aanvullende gegevens kunnen mogelijk betere maatregelen genomen worden.

In de literatuur wordt al melding gemaakt dat er enterococcen aanwezig zijn in insecten (Martin & Mundt, 1972), op planten (Mundt, 1963a) en dieren (reptielen, vogels, warmbloedige dieren)(Mundt, 1963b). Daarbij zijn ook enkele chemische testtechnieken (zoals een litmusmelk test) ingezet om een onderscheid te kunnen maken of enterococcen direct vanuit feces van warmbloedige dieren of dat het enterococcen zijn die langdurig al in het milieu aanwezig waren en in staat waren te overleven. Recent zijn er ontwikkelingen die meer informatie bieden over de eigenschappen van de gemeten enterococcen waarbij min of meer met groeifactoren/eiwitten een cluster aangeduid kan worden waar de enterococ van daar komt (Weigand et al., 2014).

Met de MALDI-TOF-MS is het mogelijk allerlei eiwitten in bacteriën te bepalen. In de huidige praktijk wordt met een database van Brüker (op basis van 70 eiwit-pieken die per bacteriesoort anders is) de bacteriesoorten benoemd.

Met de eiwit-spectra verkregen uit de MALDI-TOF-MS kan ook mogelijk een verdere evaluatie plaatsvinden, waarbij met behulp van multivariabele statistiek, clusters van eiwitten als *merker* bepaald kunnen worden waarmee onderscheid gemaakt kan worden tussen micro-organismen direct afkomstig van fecaliën of van een andere bron. Siegrist et al. (2007) en Giebel et al. (2008) presenteren gegevens waarin met de MALDI-TOF-MS een verdere karakterisering heeft plaatsgevonden van milieustammen van *E.coli* en enterococcen. Tijdens het promotieonderzoek van Maja Taucer is gebleken dat *E. moraviensis* kan groeien op het plantenextract. In dit onderzoek wordt deze soort als model-organisme genomen in de 'proof of principle' fase.

De onderzoeksvragen die hieruit naar voren komen zijn:

## Onderzoeksvragen

1. Is met de MALDI-TOF-MS en met de gebruikelijke enterococ-methode met kweek, mogelijk onderscheid te maken tussen stammen die in het milieu een langere tijd (in)actief zijn of stammen die direct afkomstig zijn van fecaliën.
2. Is met de MALDI-TOF-MS en met de gebruikelijke coliformen/*E.coli*-methode met kweek, mogelijk onderscheid te maken tussen stammen die in het milieu een langere tijd (in)actief zijn of stammen die direct afkomstig zijn van fecaliën.

## Projectresultaten

- Inzicht in de karakteristieken van enterococcen en coliformen/*E.coli* afkomstig van verschillende bronnen (direct uit feces of afkomstig van milieu)
- Een methode waarbij met multivariabele statistiek, merkers benoemd kunnen worden die dienst kunnen doen om bij een besmetting onderscheid te kunnen maken tussen micro-organismen direct afkomstig van fecaliën of van een andere bron.
- Rapportage.

## Hypothese

De enterococcen, coliformen/*E.coli* die min of meer actief zijn onder milieu omstandigheden hebben een ander metabolisme dan hun soort die direct uit feces afkomstig is. Het onderscheid hierin kan gedetecteerd worden met eiwit-spectra via de MALDI-TOF-MS.

## Experimentele opzet

### 'Proof of principle' fase

- Kweek van *E. moraviensis* (en andere soorten enterococcen) op plantextract en feces wordt uitgevoerd, waarna op verschillende tijdstippen materiaal op SBA platen wordt beënt en gekweekt volgens standaardvoorschrift. Kolonies vanuit de plaat worden met de MALDI-TOF-MS geanalyseerd en verschillende eiwitspectra worden verkregen.
- De eiwitspectra worden geëvalueerd m.b.v. multivariabele statistiek om clusters van eiwitten te vinden die dienst kunnen doen als merker.
- Indien nodig: verdere optimalisatie van MALDI-TOF-MS analyse matrix (gebruik van verschillende matrixoplossingen en extra enzymen (lysozyme)).

### Praktijkgegevens besmettingen

- Enterococ-besmettingen (in totaal maximaal 20) uit het duin (periode juni-september) of op andere monsterlocaties worden geanalyseerd met MALDI-TOF-MS en vervolgens met nieuwe methode geëvalueerd. Met de aanvullende litmusmelktest wordt de bron van besmetting geverifieerd.
- Coliformen/*E.coli* besmettingen (in totaal maximaal 10) uit het duin (periode juni-september) of op andere monsterlocaties worden geanalyseerd met MALDI-TOF-MS. Met de verkregen gegevens wordt nagegaan of hier ook patronen zichtbaar zijn die als merker kunnen fungeren.

## Tijdsplanning

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Projectdefinitie												
'Proof of principle' fase												
Praktijkgegevens besmettingen												
Rapportage												

## Projectorganisatie

De projectdefinitie wordt opgesteld door de projectleider (Eric Penders). Het onderdeel 'Proof of principle' wordt georganiseerd en begeleid door Eric Penders en uitgevoerd door het HWL-laboratorium. Indien de eerste fase succesvol is, vindt verder onderzoek plaats door besmettingen verkregen in de periode juni tot september met de methode te evalueren. Dit gedeelte van het onderzoek wordt begeleidt door Eric Penders en uitgevoerd door HWL. De kwaliteitsborger van het project zal afkomstig zijn van KWR en Edwin Kardinaal is de projectmanager.

## **Budget (totaal: 40k€)**

Projectdefinitie: **1,5 k€**

Fase 'proof of principle'

- Groeiproef *E. moraviensis* op planten/feces extract MALDI-TOF-MS spectra analyse: **10.2 k€**
  - Eric: 6.5 k€
  - HWL microbiologisch lab: 3.7k€
- Aanpassingen matrix (indien nodig): **5.4 k€**
  - Eric/HWL microbiologisch lab: 4.8 k€
  - Materiaalkosten: 0.6 k€

Fase 2 Besmettingen onderzoek (indien 'proof of principle' fase succesvol):

- 20 enterococcon besmettingen analyse: **6.6 k€**
  - Eric: 3.3 k€
  - HWL microbiologisch lab: 3.3k€
- 10 *E.coli* besmettingen analyse: **4.4 k€**
  - Eric: 3.3 k€
  - HWL microbiologisch lab: 1.1k€

Rapportage/borging: **11.9 k€**

- Eric: 7.5 k€
- Kwaliteitsborging: 1.6 k€
- Onvoorzien: 2.8 k€

## **Literatuur**

Mundt, J. O. (1963a) Occurrence of enterococci on plants in a wild environment. Applied microbiology 11.2: 141-144.

Mundt, J. O (1963b). Occurrence of enterococci in animals in a wild environment. Applied microbiology 11.2: 136-140.

Martin, J.D., Mundt, J. O. (1972) Enterococci in insects. Applied microbiology, 24.4: 575-580.

Weigand, M. R., Ashbolt, N. J., Konstantinidis, K. T., & Santo Domingo, J. W. (2014). Genome sequencing reveals the environmental origin of enterococci and potential biomarkers for water quality monitoring. Environmental science & technology, 48(7), 3707-3714.

Giebel, R. A., Fredenberg, W., & Sandrin, T. R. (2008). Characterization of environmental isolates of Enterococcus spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Water research, 42(4), 931-940.

Siegrist, T. J., Anderson, P. D., Huen, W. H., Kleinheinz, G. T., McDermott, C. M., & Sandrin, T. R. (2007). Discrimination and characterization of environmental strains of Escherichia coli by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Journal of microbiological methods, 68(3), 554-562.

## Coli - Coccen – Combinatie

Uitnodiging :

Zonder uitzondering hebben de DPWE bedrijven in de afgelopen jaren ervaringen gehad met het incidenteel aantreffen van ongewenste indicator organismen, zijnde Coliformen 37 graden of Enterococconen. Elk van de DPWE-bedrijven zijn speurend geweest naar dé oplossing voor dit probleem en om iedere illusie gelijk te elimineren: we hebben deze niet gevonden.

Wel zijn we stapsgewijs verder gekomen in het ontrafelen van het mysterie rond bron, doorslag, nagroei en (her)besmetting.

In een aantal workshops (2 of 3) zullen we in 2015 de tijd nemen om ervaringen uit te wisselen, hardop onze vragen en dilemma's te verwoorden en onderzoeksvragen te formuleren voor vervolg onderzoek.

Op de eerste dag zullen de DPWE bedrijven elk een casus beschrijven in hun winning, zuivering of distributie. Tijdens de tweede workshop, twee maanden later, zullen ervaringen met detectie, source tracking, typering of resultaat interpretatie worden uiteengezet.

Uitwisseling van kennis en ervaring tussentijds kunnen ons helpen de onderzoeksvragen aan te scherpen en ongekende oplossingsrichtingen uit te wisselen.

Onderwerpen die aan de orde kunnen komen zijn:

- Hoe gedragen indicator organismen zich bij bodempassage?
- Wat is de bijdrage van de onverzadigde zone?
- Geeft source tracking ons zicht op herkomst van specifieke coliformen?
- Hoe zwaar moeten we grootvolume monster uitslagen wegen in het wettelijk kader?
- Wat zijn normale waarden tijdens verschillende stadia van de zuivering?
- Hoe groot is de Maldi-tof typering – variëteit van de populatie?
- Behandelingstechniek : spoelen of stilzetten, behandelen of uitzieken?
- Kunnen we tot eenduidige aanpak en interpretatie van resultaten komen.

We hebben niet de illusie dat we alle vragen beantwoord krijgen, maar dat we wel stappen kunnen zetten om de vragen beantwoord te krijgen.

We zien jullie gaarne op vrijdag 10 april 2015 bij KWR te Nieuwegein in zaal OptiValves.

Leon Kors  
Herman Smit  
Ed van de Mark  
Heleen Westerink

## Programma 1<sup>ste</sup> Workshop ColiCocccenCombinatie (CCC)

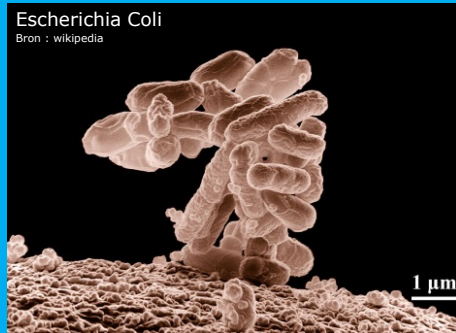
Locatie: KWR  
Groningenhaven 7, 3433 PE Nieuwegein  
Zaal: OptiValves

Tijd	Onderwerp	Spreker
9:00	Inloop met koffie en thee	
9:30	Ontvangst door dagvoorzitter	Herman Smit
9:45	DPWE – CCC – aanleiding en doelstelling	Leon Kors
10:15	<i>Coliformen</i> en <i>Enterococccen</i> : Relevantie van groot volume monsters	Patrick Smeets
11:00	Koffiebreak	
11:15	Casus 1 – Dunea	Dunea
12:00	Lunch	
13:00	Casus 2 – PWN	PWN
13:45	Casus 3 – Waternet	Jos Hooft
14:30	Theebreak	
15:00	Casus 4 – Evides	Evides
15:45	Samenvatting <ul style="list-style-type: none"><li>- Bundelen vraagstukken</li><li>- Opdrachtformulering voor 2<sup>de</sup> workshop</li></ul>	Herman Smit
16:15	Sluiting	

# CCC Workshop 1

## DPWEO bijeenkomst

10 april 2015



waternet

## CCC Workshop 1

- Aanleiding
- Doelstelling
- Onderwerpen
  
- Agenda

waternet

## Aanleiding

Najaar '14 DPWE Onderzoeks agenda 2015:  
Grote overeenkomst in onderwerpen van de  
DPWE BG Waterkwaliteit – in 10 v/d 14  
onderwerpen kwam Enterococci of  
Coliformen voor.

... zoek de verschillen ...

waternet

## Overeenkomsten

- Problemen
- Zoeken naar Oplossingen
- Detectie
- Wat is de Herkomst?

waternet

## Verschillen

Probleem locaties:

- Winning
- Zuivering
- Distributie

Laten we verder in zoemen op:

waternet

## Meet strategie

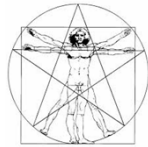
- Standaard Volume (100 ml) of Groot Volume (100L – 1000 x nauwkeuriger)?
- Wat betekent dit?

waternet



## Typering – 1 – Source tracking

- Coliformen 37° of E.coli?
- Wat is de herkomst van de besmetting?
- Wat is de hygiënische betekenis?



waternet

## Typering – 2 – Successie?

- Vinden we op de verschillende meetpunten dezelfde cocen soorten terug?



≠



≠



- Of zit hier successie in?

waternet

## Preventieve en curatieve strategieën

- Verschillende (beproefde) methoden
- Verschillende strategieën
  - Reinigen
  - Bronbescherming

waternet

## Onderzoeksvragen

- Hoe gedragen indicator organismen zich bij bodempassage?
- Wat is de bijdrage van de onverzadigde zone?
- Geeft source tracking ons zicht op herkomst van specifieke coliformen?
- Hoe zwaar moeten we grootvolume monster uitslagen wegen in het wettelijk kader?
- Wat zijn normale waarden tijdens verschillende stadia van de zuivering?
- Hoe groot is de Maldi-tof typering – variëteit van de populatie?
- Behandelingstechniek : spoelen of stilzetten, behandelen of uitzieken?
- Kunnen we tot eenduidige aanpak en interpretatie van resultaten komen

waternet

## Aanpak : Workshops!

1. Ervaringen uitwisselen: Cases  
Onze praktijk, ervaring, frustratie
2. De diepte in:  
Typering – interpretatie  
R&D - Recherche en Detectie  
GroVol – interpretatie
3. [Naar bewind van zaken]

Tussentijds: nadere kennis uitwisseling

waternet

## Programma

Tijd	Onderwerp	Spreker
9:00	Inloop met koffie en thee	
9:30	Ontvangst door dagvoorzitter	Herman Smit
9:45	DPWE – CCC – aanleiding en doelstelling	Leon Kors
10:15	<i>Coliformen en Enterococcon</i> : Relevantie van groot volume monsters	Patrick Smeets
11:00	Koffiebreak	
11:15	Casus 1 – Dunea	Dunea
12:00	Lunch	
13:00	Casus 2 – PWN	PWN
13:45	Casus 3 – Waternet	Jos Hooft
14:30	Theebreak	
15:00	Casus 4 – Evides	Evides
15:45	Samenvatting <ul style="list-style-type: none"><li>- Bundelen vraagstukken</li><li>- Opdrachtformulering voor 2<sup>de</sup> workshop</li></ul>	Herman Smit
16:15	Sluiting	

waternet

**Prettige dag!**

waternet

Nieuwegein, 10 april 2015 1

# Coliformen en enterococchen: relevantie van groot volume monsters


DPWE CCC workshop  
Patrick Smeets, 10 april 2015

**KWR** Watercycle Research Institute


Bridging science to practice 2

## Poep in je water?

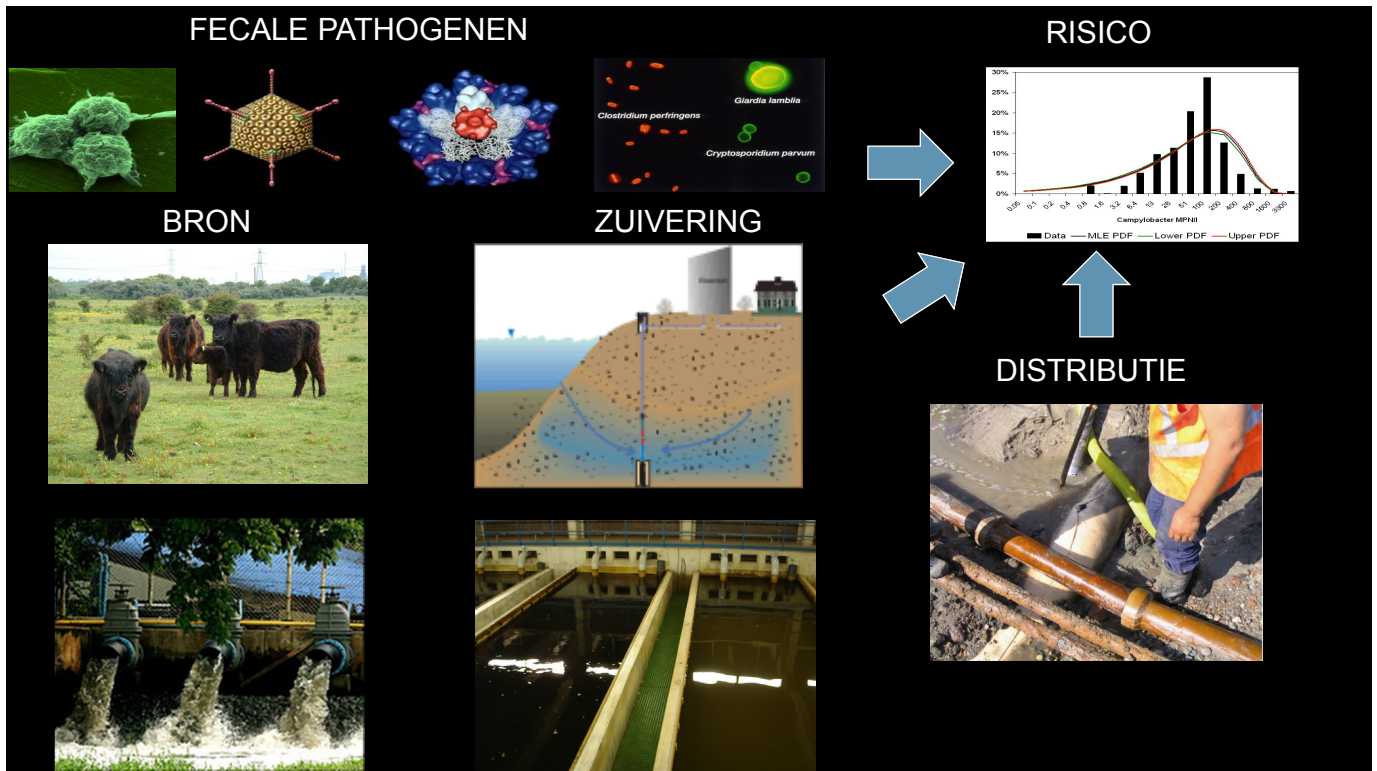
MEER DAN 840.000 DODEN PER JAAR DOOR VUIL WATER



SCHOON DRINKWATER IS DE BASIS VOOR GEZONDHEID, ONTWIKKELING EN WELVAART



**KWR** Watercycle Research Institute



Bridging science to practice 4

## Ziekteverwekkers, indicatorbacteriën en .....

### Indicatie verhoudingen aantallen per liter of gram in logeenheden

(gebaseerd op Soller et al. 2010)

**Organismen in rioolwater**

**Organismen in meeuwenpoep**

- enterococcen
- E. coli
- EC O157:H7
- Campylobacter
- Salmonella
- Cryptosporidium
- Giardia
- Norovirus
- Bacteroides
- Overig

**KWR** Watercycle Research Institute

## Waarom meten we coliformen, *E. coli* en enterococcen?

- *E. coli* komt 100 tot 1.000.000 X meer voor dan ziekteverwekkers in rioolwater
- Enterococcen komen 10 tot 100.000 X meer voor dan ziekteverwekkers in rioolwater
- Beiden gaan snel dood, dus aanwezigheid betekent RECENTE verontreiniging
- (SSRC, clostridium perfringens overleeft zeer lang, tientallen jaren)
- Aanwezig = RISICO!!!
- Afwezig ≠ veilig!

### Doel is gezondheidsrisico beheersen

Waterkwaliteitscontrole is een middel (steekproef)

## Nederlandse risico-benadering

Minder dan 1 infectie per 10.000 personen per jaar

Hoog? 1.600 mensen met infectie in Nederland aanvaardbaar

Laag? 4.600.000 gevallen van diarree per jaar in Nederland

Mensen drinken 0,27 liter ongekookt water per dag,

= 100 liter per jaar

10.000 mensen drinken 1.000.000 liter water per jaar

1 ziekteverwekker 10%-80% kans op infectie

Dus maximaal 1 ziekteverwekker in 1 miljoen liter per jaar



## Verontreiniging = verdund rioolwater?

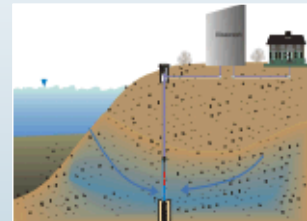
Stel: Het monster is representatief voor één dag

Voorbeeld voor virussen

Monstervolume	l	0,1
Pathogeen	-	Enterovirus
Verontreinigingsbron	-	Afvalwater gem
<i>E. coli</i> in rioolwater	org/l	$1,6 \times 10^8$
% rioolwater in drinkwater		0,00001%
Enterovirus in rioolwater	org/l	$1,9 \times 10^2$
Concentratie pathogeen <	org/l	$1,2 \times 10^{-5}$
Infectierisico dag (QMRAspot)	inf/p/d	$1,6 \times 10^{-6}$
Aantal dagen	d	1
Infectierisico dag nominaal	inf/p/d	0
Jaarrisico	inf/p/j	$1,6 \times 10^{-6}$

## Dagrisico voor verschillende organismen bij 100 ml monster (verdund rioolwater)

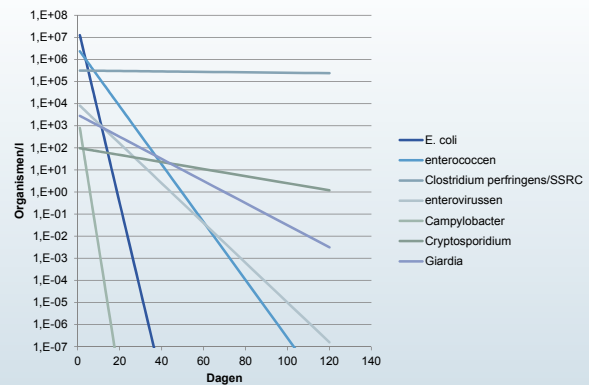
Monstervolume 0,1 (l)	Concentratie Org/l	Infectierisico pppj
Enterovirus	$1,2 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-6}$
<i>Campylobacter</i>	$6,3 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-4}$
<i>Cryptosporidium</i>	$2,9 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-5}$
<i>Giardia</i>	$1,3 \times 10^{-3}$	$8 \times 10^{-6}$





## 100 ml is niet altijd voldoende omdat:

- Het geen rioolwater is maar....
- Indicatororganismen zijn afgestorven maar ziekteverwekkers niet
- Situatie vaker dan 1 dag voor komt
- Ook lagere concentratie 'er niet in hoort te zitten'
- Er toch niet hygiënisch is gewerkt
- Organismen niet netjes over het water verdeeld zijn
- Het water 'zuivering' heeft ondergaan (zonlicht, bodempassage, desinfectie...)



VERSCHIL IN SNELHEID AFSTERVING BEÏNVLOEDT VERHOUDING INDICATOR : ZIEKTEVERWEKKER

## Betekenis van indicatororganismen

- *E. coli* is vrijwel altijd van een warmbloedige fecale bron
- Enterococci, Maldi-TOF of API getypeerd waarschijnlijk van warmbloedige fecale bron
- Enterococci gekweekt kan ook groeien in milieu, zowel fecaal als niet fecaal
- Coliformen 37°, Maldi-TOF of API getypeerd waarschijnlijk van warmbloedige fecale bron, of weinig onderscheidend
- Coliformen 37° gekweekt kunnen van fecale of niet fecale bron zijn
- Coliformen 37° zijn vaak aanleiding geweest waar bij nader onderzoek ook fecalen zijn gevonden
- SSRC en *Clostridium perfringens* kunnen ook van oude fecale bron zijn
- Bacteriofagen kunnen ook van niet fecale bron zijn

Bridging science to practice 11

## Specificiteit van indicatoren en typeringen

**Warmbloedig dier**

- RumBac2
- CowBacM3
- Bird-GFD
- Dog
- butti Xuella
- gavinia
- citrobacter

**Plant aardig/milieu**

AIIBac  
Coli-  
HSP  
Ent-WLN  
E. coli

enterococcen

coliformen

**HumBac Mens**

Determinatie mbv MaldiTOF (bacteriespecie)	
Klebsiella pneumoniae	
Klebsiella pneumoniae	
Citrobacter gillenii	
Citrobacter gillenii	
Raoultella ornithio	
Enterobacter amnigenus	
Serratia fonticola	
Niet Bepaald	
Niet Bepaald	
Citrobacter gillenii	
Niet Bepaald	
Pantoea agglomerans	
Pantoea agglomerans	
Pantoea agglomerans	
Pantoea species	
Pantoea agglomerans	
Pantoea agglomerans	
Butti Xuella agresti	
Butti Xuella agresti	
Citrobacter gillenii	
Butti Xuella izardii	
Enterobacter amnigenus	
Butti Xuella gavinia	
Pantoea agglomerans	
Pantoea agglomerans	
Butti Xuella izardii	

**bloedig dier/insect**

**KWR** Watercycle Research Institute

Bridging science to practice 12

## Ervaringen met metingen

**Afkeuringen na werkzaamheden**  
CFU/100 ml

Frequency of exceedance (fraction)

— E. coli — enterococcen

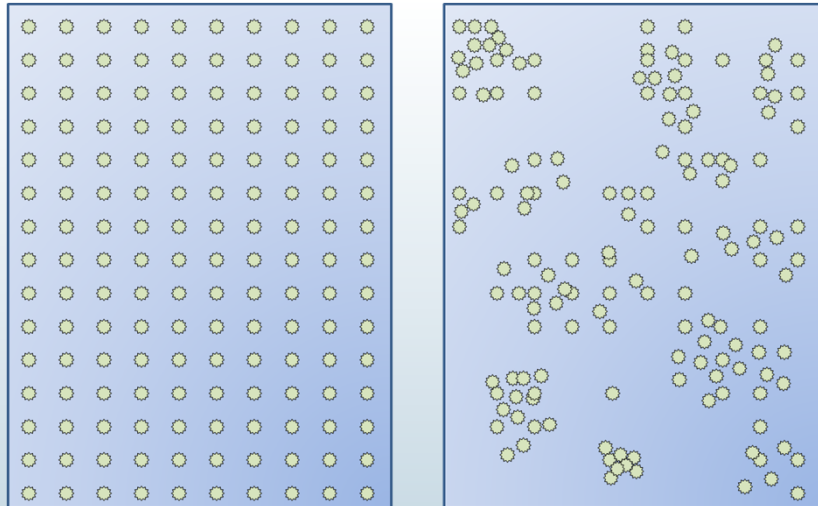
VOORBEELD WATERKWALITEITSCONTROLE NA WERKZAAMHEDEN 1 WATERBEDRIJF 10 JAAR

Monsters:	130	3	32	18	35
coliformen	+	+	+	+	-
E. coli	-	+	+	-	-
enterococcen	-	+	-	+	+

VOORBEELD WATERKWALITEITSCONTROLE NA WERKZAAMHEDEN 1 WATERBEDRIJF 10 JAAR

**KWR** Watercycle Research Institute

## (Statistische) problemen met monsternamen



## Grote volumes Simulatie monsters

- 14000 monsters van 1 l (14 m<sup>3</sup>)
- gemiddelde concentratie 0,03 CFU/l
- Gamma verdeling  $a=0.03$   $b=1$  (grote spreiding)
- 296 organismen in totale volume
- 1,8% kans op positief 1 l monster
- $\rightarrow 1,5$  log overschatting
- 0,036% kans op maximaal=4CFU/L
- $\rightarrow 2,1$  log overschatting
- 98.2% kans op negatief monster
- $\rightarrow 2,6$  log onderschatting?



## Methoden voor grote volumes

MF-SAMPLER



HEMOFLOW CONCENTRATIE

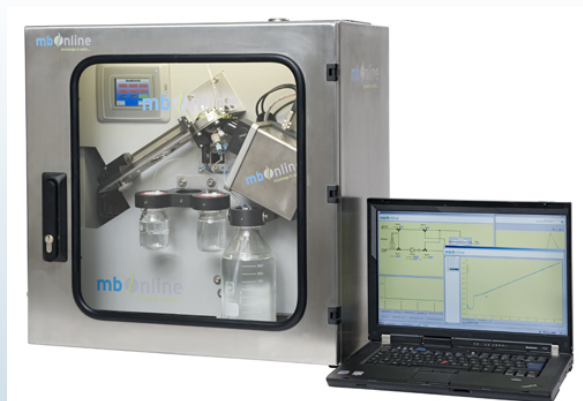


## Alternatieven voor grote volumes

TAP SAMPLER



BACT-CONTROL "CONTINUE MONITORING"



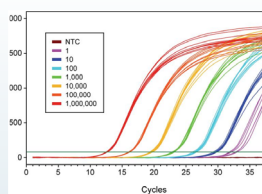
# Waterkwaliteitscontrole doelen

Kweek van coliformen, *E. coli* en enterococcen vaak met PCR, API of Maldi-TOF bevestiging



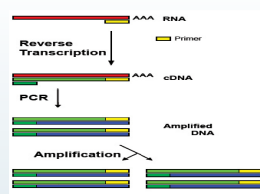
# Mogelijke Technologieën I

## RT-PCR E. COLI



*E. coli*  
 Toegepast door WLN  
 Validatie en Implementatie in BTO NMS  
 3 uur  
 Dood/levend?

## RT-PCR ENTEROCOCCEN



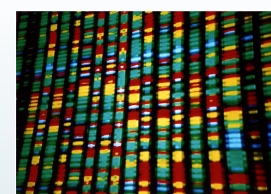
enterococcen  
 In ontwikkeling binnen WLN  
 Verwachting 3 uur  
 Dood/levend?

## BACTCONTROL



*E. coli*, coliformen  
 Getest door Vitens + ...  
 enterococcen in ontwikkeling  
 3 uur, 'on-line'  
 Levend (enzymactiviteit)

## NEXT GENERATION SEQUENCING



Totale bacterie populatie, klein deel genoom  
 Uitgeprobeerd door Vitens  
 Dagen  
 Dood/levend?

## Mogelijke technologieën II

### COLIFAST



Coliformen 37° of 44°  
tot 11 uur  
'On-line' of field test  
Levend (enzymactiviteit)  
100 CFU/100 ml

### AQUASCOPE



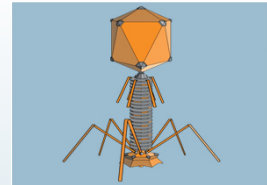
FISH : Escherichia coli, Campylobacter, Coliforms, Clostridium, Legionella pneumophila, Thiobacillus ferrooxidans, Enterococcus, Desulfovibrio, Aeromonas, Salmonella, Pseudomonas  
Vitens, Brabant W., HWL  
1 uur  
Potentie voor 'on-line'  
1 CFU/100 ml ???

### INNOSIEVE / MU-SCAN



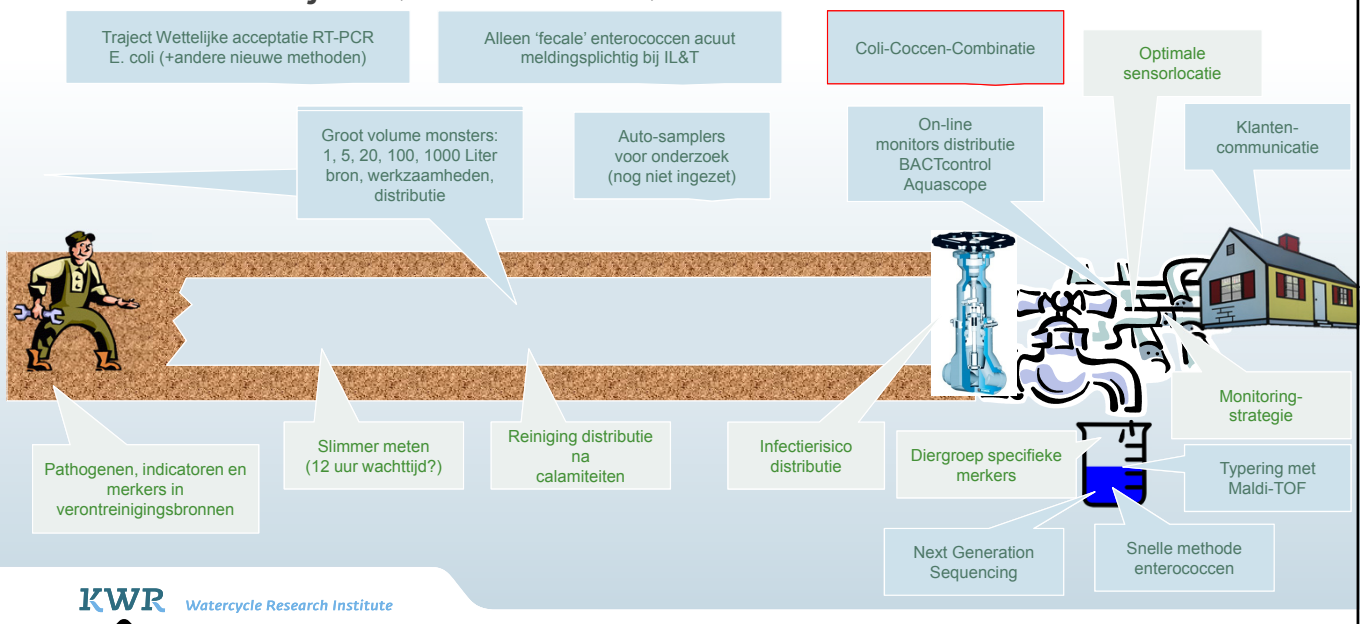
FISH: Legionella -> Coli+...  
4 uur  
WLN, Vitens  
Levend (enzymactiviteit)  
1 CFU/100 ml

### ANDERE PARAMETERS



Bacteriodes-fagen  
Mens- en dierspecifieke markers  
.....

## Onderzoeken en ontwikkelingen Waterbedrijven, laboratoria, BTO



# Vragen en discussie

# Coli37, e-coli, enterococcen en infectierisico

- Theorie en praktijk
- Borging
- Tijdens productie van drinkwater
- Tijdens distributie van drinkwater

1

- Uit de AMVD volgt voor Dunea een DEC van 11, dit is samengesteld uit 8 voor duinpassage en 3 voor langzame zandfiltratie. Vanuit het infectierisico ( $10^{-4}$ ) is benaderd dat een watermonster van 100 L verzameld uit het duin onttrokken water geen indicator bacteriën mag bevatten. In de praktijk worden echter regelmatig overschrijdingen van deze norm gevonden.
  - Zoals bekend zijn risico's van (microbiologische) verontreiniging van het drinkwater bij werkzaamheden in het distributienet natuurlijk heel groot. De borging of de werkzaamheden goed zijn uitgevoerd, wordt standaard (Drinkwaterbesluit) gevolgd door het uitvoeren van wateronderzoek in watermonsters met een volume van 100 mL. Dunea heeft onderzoek uitgevoerd waarbij naast 100 mL tevens een volume van 1.000 mL is toegepast. Uit resultaten van dit onderzoek bleek dat in 9% van de gevallen waarbij het 100 mL negatief was, het 1.000 mL wel positief bleek te zijn.
- 2 Wat betekent dit voor de borging van het infectierisico?



## Inhoud

- Infectierisico
- Analyse microbiologische veiligheid drinkwater
- Decimale eliminatie capaciteit
- Borging infectierisico
- Integriteit zuiverings- en distributiesysteem
- Infectierisico in relatie tot winsysteem
- Infectierisico in relatie tot distributie

3

## Drinkwaterbesluit mei 2011

*Bijlage A, noot in*

### ***Tabel I, Microbiologische parameters***

- Micro-organismen mogen niet in zodanige concentraties in het drinkwater voorkomen dat gevaar voor de volksgezondheid kan ontstaan.
- Grenswaarde infectierisico:  
één infectie per 10.000 personen per jaar.

4

## Infectierisico

- Consumptie 220 mL per persoon per dag
- Consumptie 10.000 personen per jaar: 803.000 L
- Dus grenswaarde: max 1 pathogeen / 803.000 L

5

## Infectierisico

- Grenswaarde van max 1 pathogeen / 803.000 L is met microbiologisch onderzoek niet meetbaar
- Inspectierichtlijn schrijft daarom “Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater” voor.

**Met andere woorden:**

- ***Voldoet de winning en het zuiveringssysteem aan de grenswaarde of het infectierisico?***

6

## Infectierisico, theoretisch

### Resultaat voor Dunea:

Theoretisch infectierisico winning en zuivering voldoet ruimschoots:

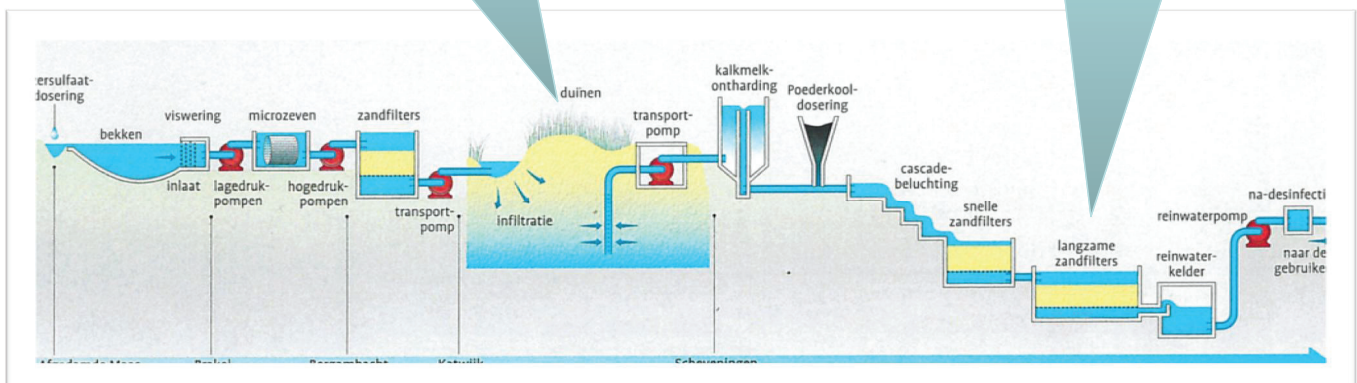
- Duinpassage: factor 100.000.000
- Langzame zandfiltratie: factor 1.000
  
- Dus totaal: 100.000.000.000 of: DEC 11

7

## Infectierisico, theoretisch

**Duinpassage:**  
8 logeenheden verwijdering

**Langzaam zandfiltratie:**  
3 logeenheden verwijdering



8

## Infectierisico, praktijk (I):

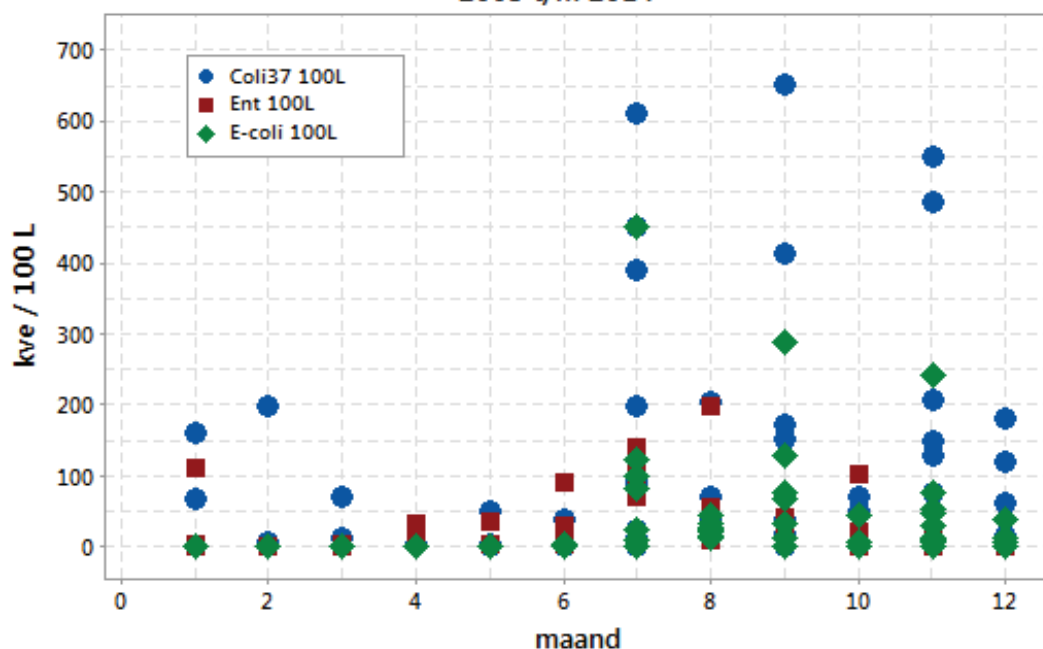
**Borgen infectierisico drinkwater met microbiologische analyse niet mogelijk, maar:**

- LZF factor 1.000 of DEC 3 dan:
- Grenswaarde infectierisico in duinfiltraat: max 1 / 803 L of 1/8 per 100 L of:
- afwezig in 100 L in duinfiltraat

9

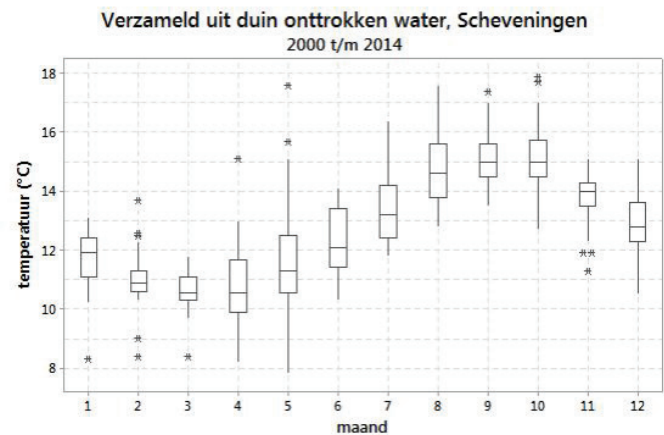
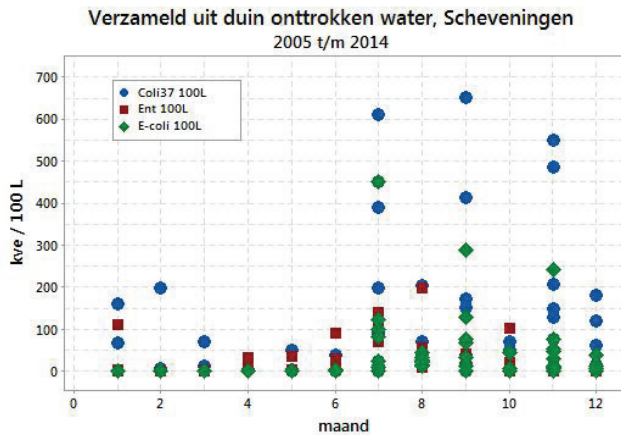
## Infectierisico, praktijk (I):

Verzameld uit duin onttrokken water, Scheveningen  
2005 t/m 2014



10

## Infectierisico, praktijk (I):



11

## Infectierisico, praktijk (I):

- Integriteit winsysteem
- Grondwaterstanden in duin?
  - Periode van regenval: onverzadigde zone?
- Begrazing?
- Relatie temperatuur?

12

## Infectierisico, praktijk (II)

- Integriteit van winning tot tap
- Risico's voor integriteit, onder andere:
  - Buisbreuk
  - Ongeplande werkzaamheden
  - Geplande werkzaamheden

13

## Infectierisico, praktijk (II)

- Kwaliteitsborging na werkzaamheden
  - Standaard met 100 mL watermonsters
  - Coli37 -> e-coli
  - Enterococcen
- Onderzoek 2013 tevens in volume van 1.000 mL

14

## Infectierisico, praktijk (II)

### Resultaat onderzoek

- Aantal 1.000 mL watermonsters: **111** in ‘warme’ periode.
- Onderzoek: coli37 / e-coli en enterococcen.
- Aantal afkeur:
  - 5,4% 100 mL watermonsters
  - 14,4% 1.000 mL watermonsters

15

## Infectierisico, praktijk (II)

### Resultaat distributieonderzoek:

- **9%** meer afkeur bij groter monstervolume!
  
- **Wat betekent dit voor infectierisico?**
- **Betreffende distributieleiding ten onrechte in gebruik genomen?**

16

## Stelling(en)

- Theoretisch infectierisico gaat uit van integer systeem
- Theoretisch infectierisico is in winsysteem en distributienet niet te borgen
- 100 mL volumina geven vals negatieve uitslagen
- Bedrijven nemen (fecaal) verontreinigde leidingen in gebruik

17

## Nader onderzoek

- Integriteit systeem bron tot tap verbeteren
- Verlaging risico's bij werkzaamheden (hygiëne codes)
- 1:1 relatie pathogenen en indicatorbacteriën?
- Afkeur alleen baseren op intestinale micro-organismen?

### Veel onderzoek in:

- Themagroep Hygiëne & Veiligheid
- Themagroep Biologische Activiteit

18



# Weesperkarspel

Microbiologische afwijking

zomer 2014



Workshop Coli-Coccon Combinatie (CCC) - DPWE 10 april 2015

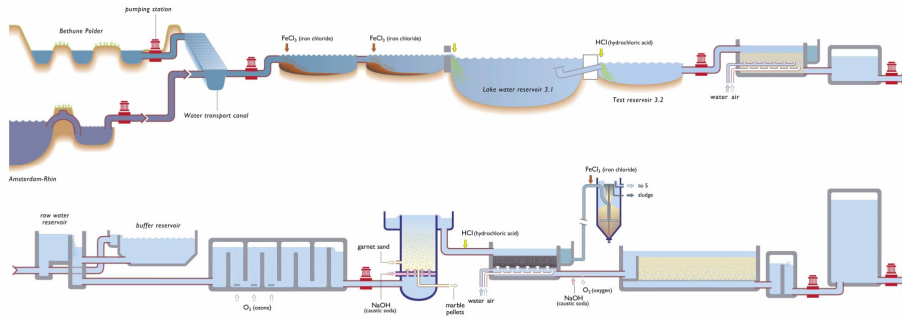
waternet

## Coliformen

- Aanleiding
- Bevindingen / oorzaak analyse
- Acties
- Communicatie

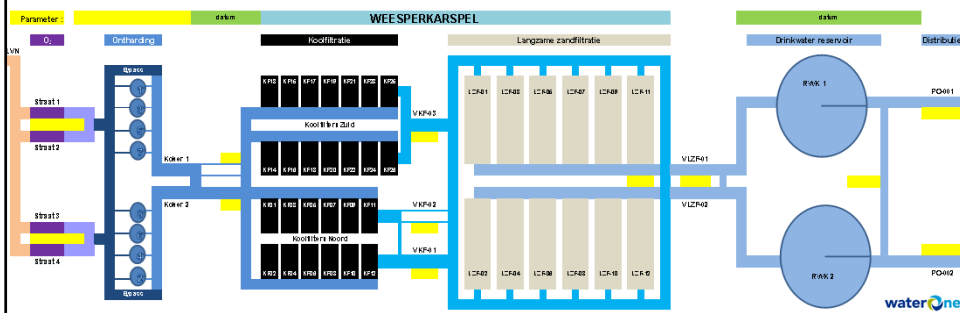
waternet

# Zuiveringschema WPK



waterone

# Processchema WPK



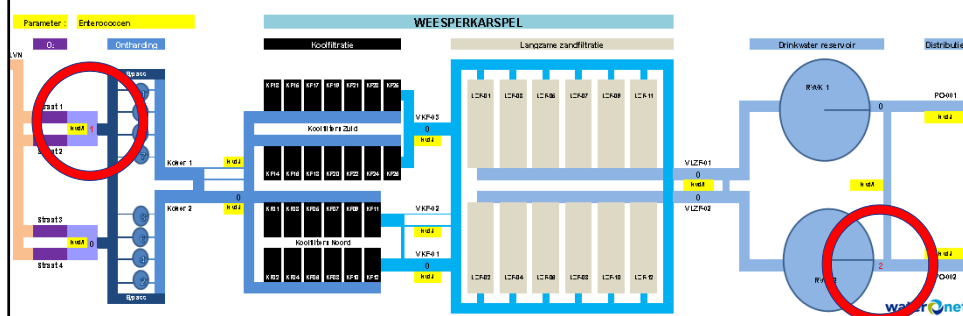
waterone

## HWL melding dd 2/7

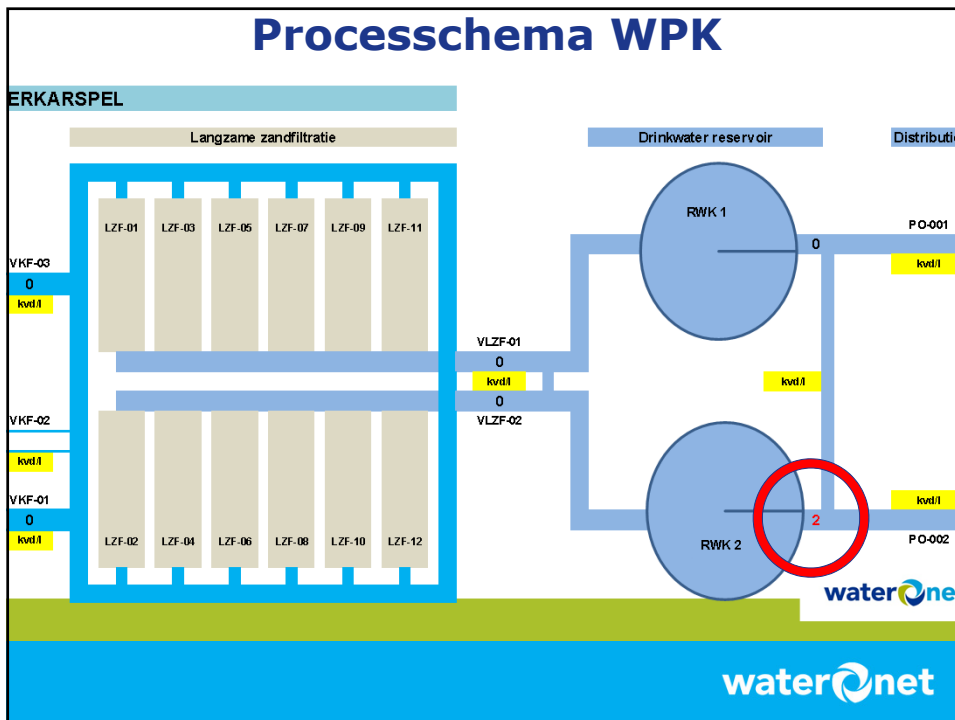
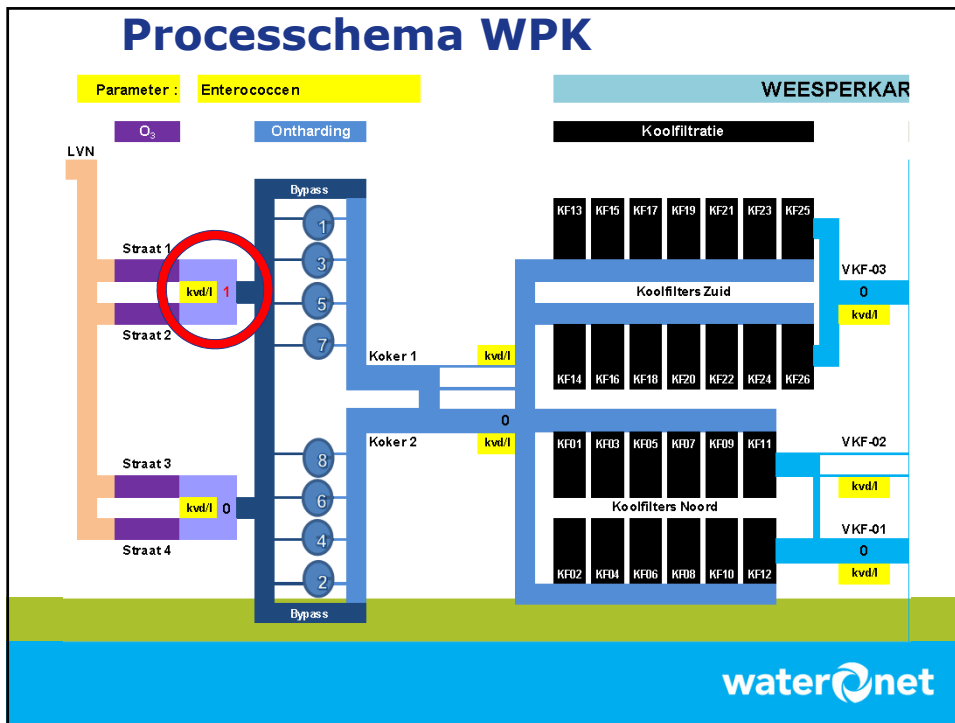
- monsters van maandag 30 juni :
  - Reservoir 2 WPK
  - 2 Enterococci in 1 L (bevestigd)
  - Betreft normaal controle monster

waternet

## Processchema WPK



waternet



## HWL melding dd 2/7

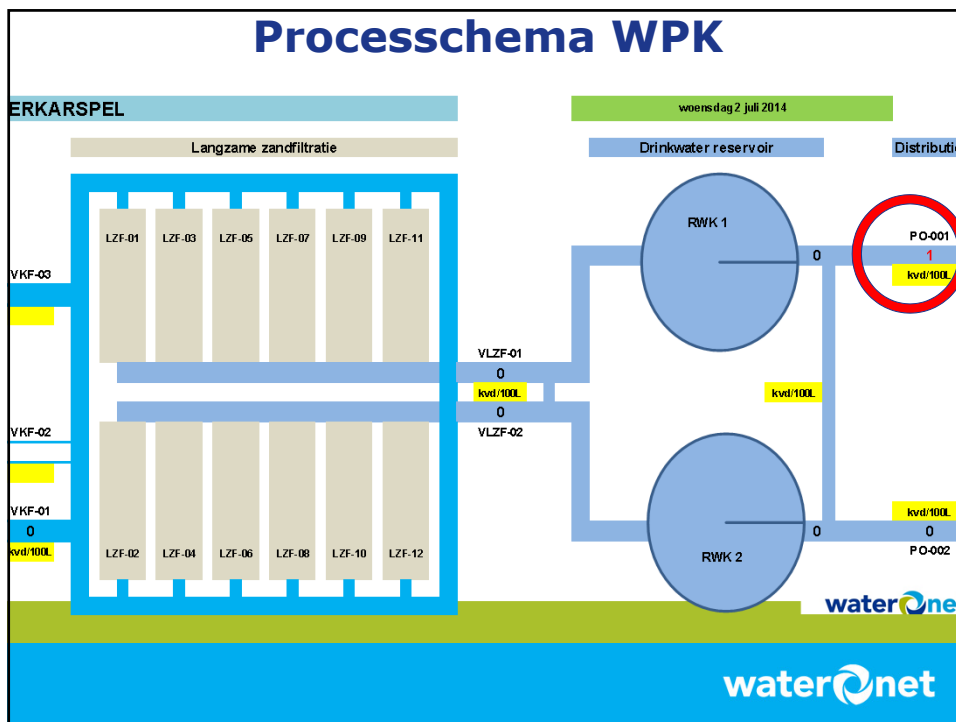
- Actie:
  - Herbemonstering 100 L (Enteroc + Coli 37)
  - 2 x LZF straten, 2 x reservoirs, 2 x pompen
  - Het loket geïnformeerd

waternet

## Vervolg Enterococcen dd 4/7

- monsters van woensdag 2 juli :
  - Pomp 1 WPK
  - 1 Enterococcen in 100 L (bevestigd)

waternet



## Vervolg Enterococci dd 4/7

- monsters van woensdag 2 juli :

Actie:  
Herbemonstering (iedere keer)

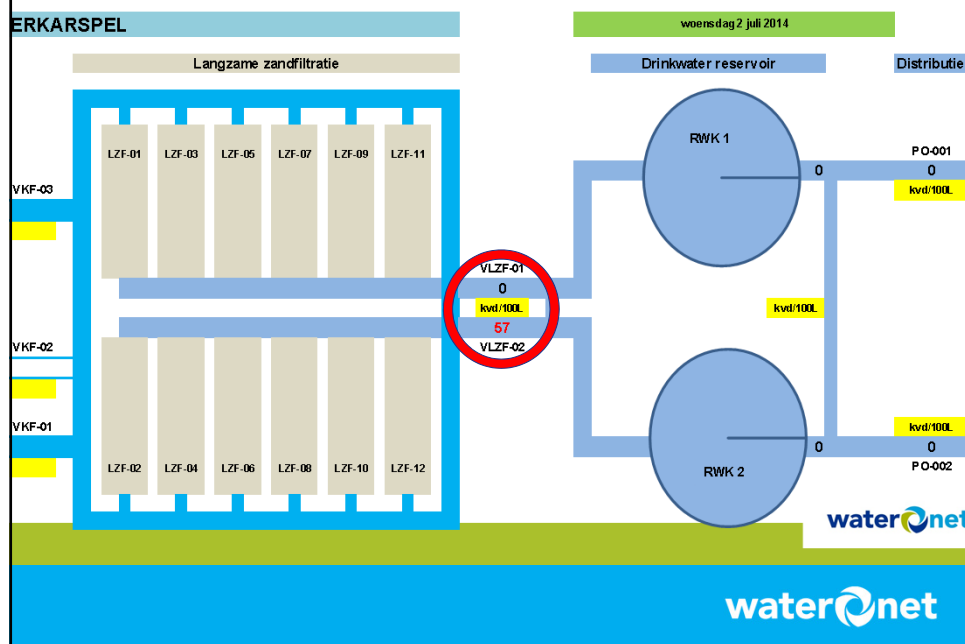
De monsters in de drinkwaterlijn zijn hierna schoon  
gebleven

## Maar.....uitslagen dd 3/7

- monsters van woensdag 2 juli :
  - LZF straat 2 WPK
  - 57 Coliformen in 100 L (bevestigd)

waternet

## Processchema WPK



## Uitslagen dd 3/7

- n.a.v. monsterneming van woensdag 2 juli :

Actie:

- Herbemonstering 100 L (Enteroc + Coli 37)
- 2 x LZF straten, 2 x reservoirs, 2 x pompen
- 6 x voedende LZF's
- Diverse deelstromen bemonsterd
- WPK van **3000** → **2000** m<sup>3</sup>/uur
- ILenT geïnformeerd

waternet

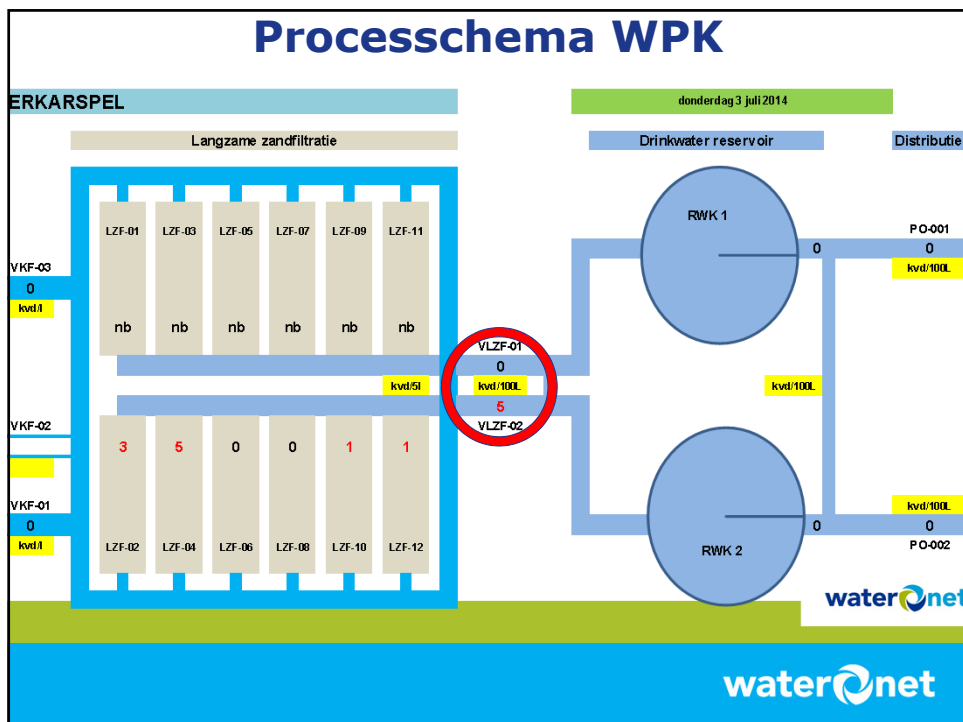
## Uitslagen dd 4/7

- monsters van donderdag 3 juli :

- LZF straat 2 WPK : 5 Coli 37 in 100 L
- Pompen en reservoirs = schoon
- Individuele filters [5 L monsters]
- Helaas niet 1 slecht filter

waternet





## Uitslagen dd 4/7

- N.a.v. monsters van donderdag 3 juli :

Actie:

- "Aeromonas" ervaring leert dat "uitzielen" helpt
- Geen normoverschrijding
- Handhaving 2000 kuub

## **Uitslagen dd 8/7 (weekend 5+6 juli)**

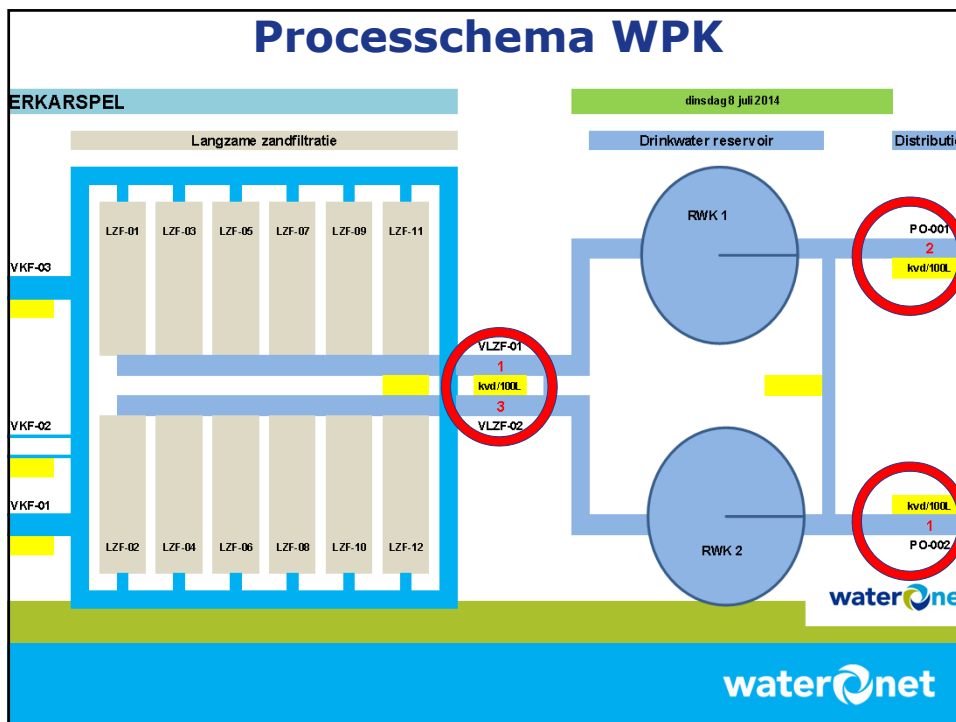
- Monsters van 4, 5 & 6 juli :
  - LZF straten schoon
  - Pompen en reservoirs = schoon
  - Individuele filters [5 L monsters]
  - Het lek lijkt boven water!
- Actie:
  - Optoeren WPK van 2000 → 3000 kuub
  - Contact Het Loket van PWN: 2 x schoon; niet voor donderdag weer gaan leveren

waternet

## **Uitslagen dd 9/7**

- Monsters van dinsdag 8 juli :
  - Beide LZF straten en beide pompen:
  - 1-3 Coli 37 in 100 L

waternet



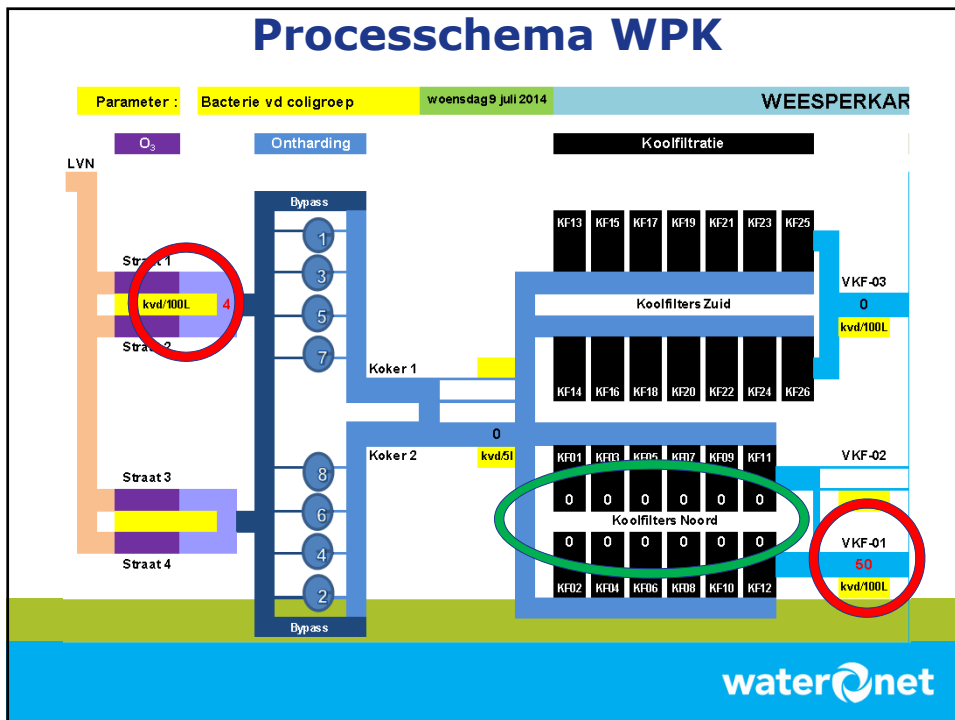
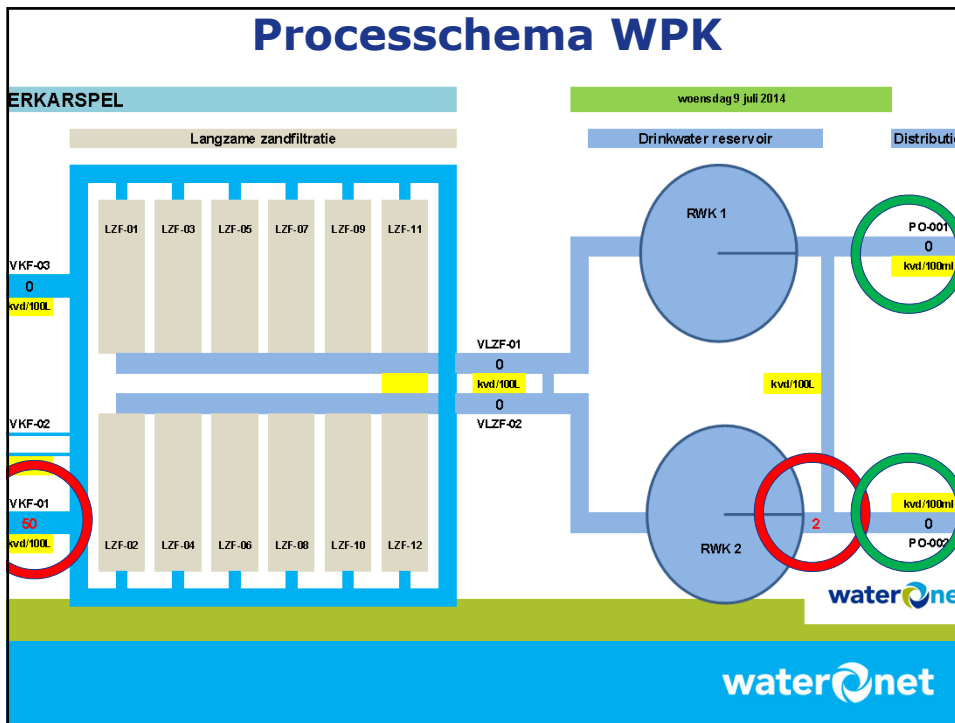
## Uitslagen dd 9/7

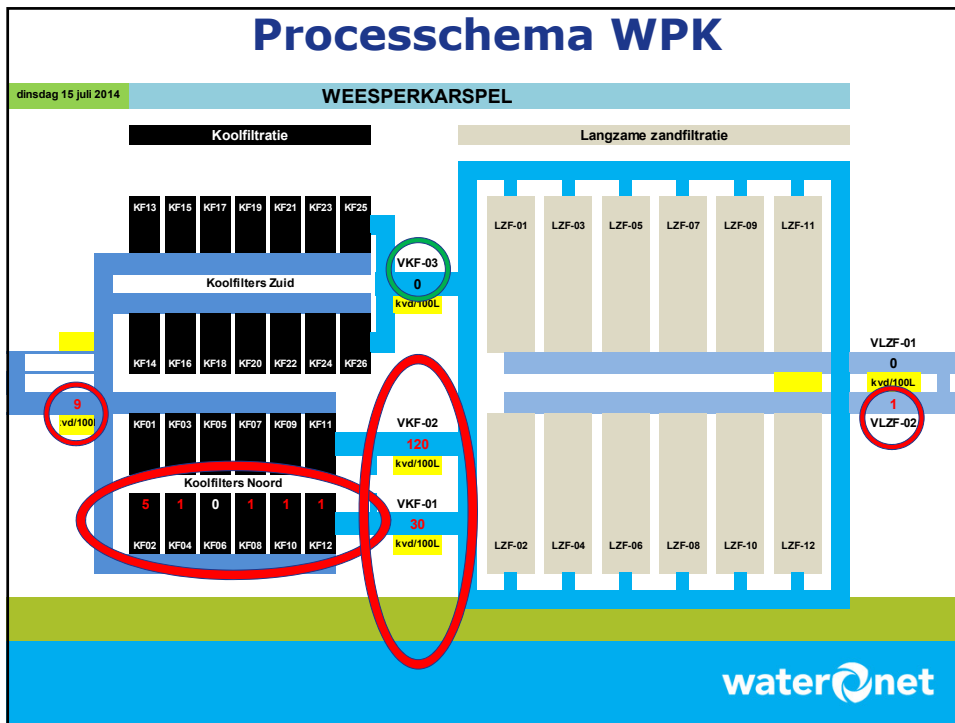
- N.a.v. monsters van dinsdag 8 juli :

Actie:

- Terug naar 2000 kuub
- Uitgebreide bemonstering verzameld langzaam zandfiltraat (+ stroom opwaards)
- De uitslagen LZF straten zijn v.a. 16/7 schoon

waterone



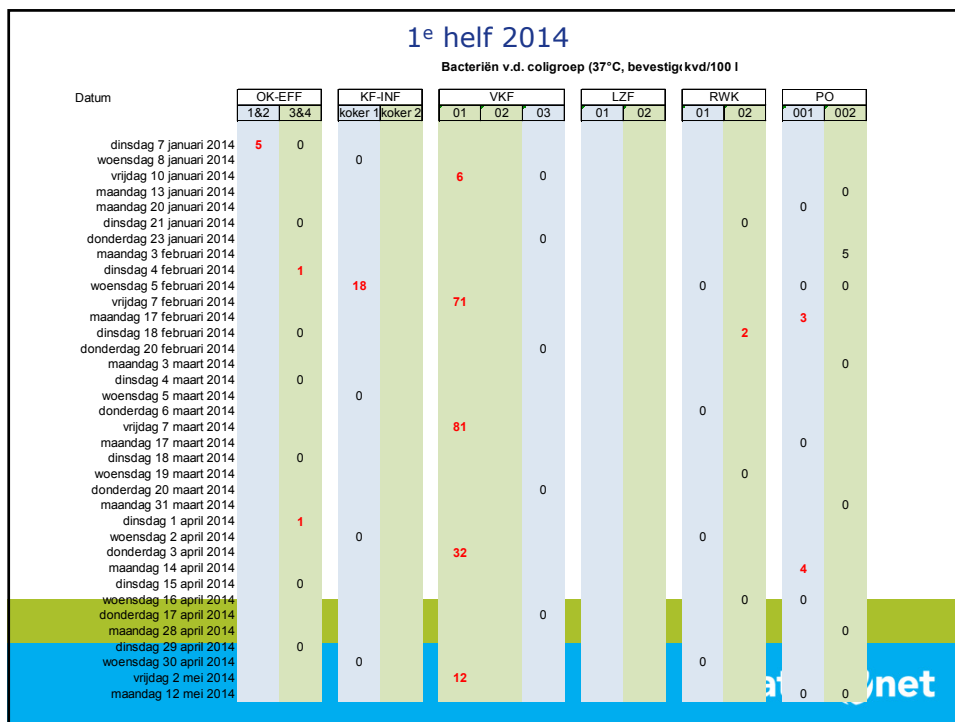


### LZF straten v.a. 16 juli 2014 schoon

Bacteriën v.d. coligroep (37°C, bevestigd/kvd/100 l)

Datum	OK-EFF		KF-INF	VKF			LZF		RWK		PO	
	1&2	3&4	koker 1	01	02	03	01	02	01	02	001	002
vrijdag 27 juni 2014				2	-							
woensdag 2 juli 2014				-	-		0	57	0	0	0	0
donderdag 3 juli 2014				-	-		0	5	0	0	0	0
vrijdag 4 juli 2014				-	-		0	0	0	0	0	0
zaterdag 5 juli 2014				-	-							
zondag 6 juli 2014				-	-							
maandag 7 juli 2014				-	-		0	0			0	0
dinsdag 8 juli 2014				-	-		1	3			2	1
woensdag 9 juli 2014		4		50	-	0	0	0				
donderdag 10 juli 2014				-	-		1	7				
vrijdag 11 juli 2014			0		open		0	0				
zaterdag 12 juli 2014			1		150							
zondag 13 juli 2014												
maandag 14 juli 2014			14		1		0	0				
dinsdag 15 juli 2014	7		9	30	120	0	0	1				
woensdag 16 juli 2014	5		11	2	0	1	0	0				
donderdag 17 juli 2014	0	0	3	0	1	0	0	0				
vrijdag 18 juli 2014	0	0	1	4	1	0	0	0				
zaterdag 19 juli 2014	0	0	0	0	0	0	0	0				
zondag 20 juli 2014	0	0	0	7	0	0	0	0				
maandag 21 juli 2014	1	0	9	5	0	1	0	0				0
dinsdag 22 juli 2014	1	0	0	0	1	0	0	0				
woensdag 23 juli 2014	0	0	0	0	0	0	0	0				
donderdag 24 juli 2014	0	0	0	1	0	1	0	0				
vrijdag 25 juli 2014	0	2	15	0	0	1	0	0				

**waternet**



## Microbiologische researchewerk

- aanbod vanuit Loenderveen
- werk de ozon wel goed?
- ontharding: demi-water, entmateriaal
- aanbod vanuit de koolfilters !
- lekkage van het langzaam zandfilter dak?
- andere besmetting van influent van de zandfilters
- retourstroom spoelwaterverwerking naar de ruwwater verdeelbak

## Verschil LZF straat 1 en 2

- Straat 2 krijgt aanvoer van KF 1-12 (Noord)
- Straat 1 krijgt aanvoer van KF 13-26 (Zuid)
- Niet 1 (LZF-) filter specifiek besmet
- In de aanvoer kokers naar de KF ligt granaatzand
  - 3 x 1 kuub materiaal verwijderd
  - Geen Coliformen gevonden [wellicht overgroeid], wel Clostridium

waternet



“slib” ca. 0,5 – 1 meter hoog





## Verschil LZF straat 1 en 2

- KF Noord en Zuid zijn anders gebouwd → belangrijkste verschil : Steunlaag vs Koppenbodem
- KF Zuid laat ook Coli 37 zien

waternet

## Spoelwaterverwerking

- SWV reinigt KF-spoelwater en gaat retour naar Ruwwaterverdeelbak
- 1 meting van spoelwaterbufferbak gaf 180 kvd/100ml
- Coli in effl SWV is niet abnormaal [als LOENEN]
- SWV geeft een verwijdering maar stel dat deze doorslag geeft: SWV → Ozon → KF → LZF
- Actie:
  - SWV op sloot
  - Bemonstering KF Spoeling → 0 coliformen
  - SWV geleidelijk en per unit weer in bedrijf genomen (medio Aug)

waternet

## Overige factoren

- Loenderveen:
  - aanbod normaal - seizoensfluctuaties
- Ozon:
  - vernieuwd dec 2013; incidenteel uitval agv testen of storing, effluent 5 kvd/100L (90 percentiel waarde)
  - **Capaciteitstesten** ivm de automatisering
- Ontharding:
  - Is effluent orde van grootte gelijk aan influent ?
- "Demi"-water installatie is vernieuwd
  - Verdunningswater Loog
  - Besmetingsrisico laag

waternet

## Overig

- Kool:
  - Effluent fluctuerend a.g.v. sediment op-werveling?
- LZF
  - Swap monsters condens : geen Coli of Entero's

waternet

## Oorzaak (?)

- Een incidentele (aantoonbare) capaciteits verhoging van Weesperkarspel met een (niet aantoonbare) opwerveling van (aantoonbaar) entmateriaal in de aanvoerkokers van de Koolfilters in combinatie met een (vermoedelijke) doorslag van de koolfilters

## Acties & Bevindingen

- WPK verlagen Debiet is effectief
- SWV stop water retour bedrijf helpt
- Koolfilters:
  - 'n Coli37 in effluent KF is niet ongewoon
  - Reinigen aanvoerleidingen frequenter inplannen
  - Reinigen filtraatleidingen [moet nog]
- LZF
  - Coli 37 in effluent LZF is ongewoon

## Meetstrategie Groot Volume

- Wettelijke volume 100 ml
- Wij doen 1- 100L
- Voordeel :
  - beter zicht op microbiologisch processen onder de radar
- Nadeel :
  - onnodige ophef ?

waternet

## Rekenvoorbeeld Groot Volume

- Wanneer 1-4 kve in 100L gemeten wordt, dan komt dit overeen met 1000 monsters van 100ml (dus 3 jaar lang dagelijks meten om er 1-4 te vinden).
- Bij een aantal van 1000 / 100L benaderen we de detectiegrens van 1/100 ml

waternet

## Communicatie

- Geen formeel OT bijeen geweest
- Wel intensief contact tussen betrokken partijen
- PWN
  - 2-4 maal per week op verschillende niveaus
- ILenT
  - Event is aangemeld dd 3/7
  - Tussentijds 3 x besproken
  - Mondeling geëvalueerd dd 31/7

waternet

## “Never waste a good crisis”

- Analyse microbiologische veiligheid WPK 2015
  - Technische of procedure oplossingen
- Uitwerken aandachtspunten ontharding / KF
- Conditie enkele afsluiters
- Good housekeeping

waternet

# Weesperkarspel

zomer 2015 . . . . .



Vragen ?

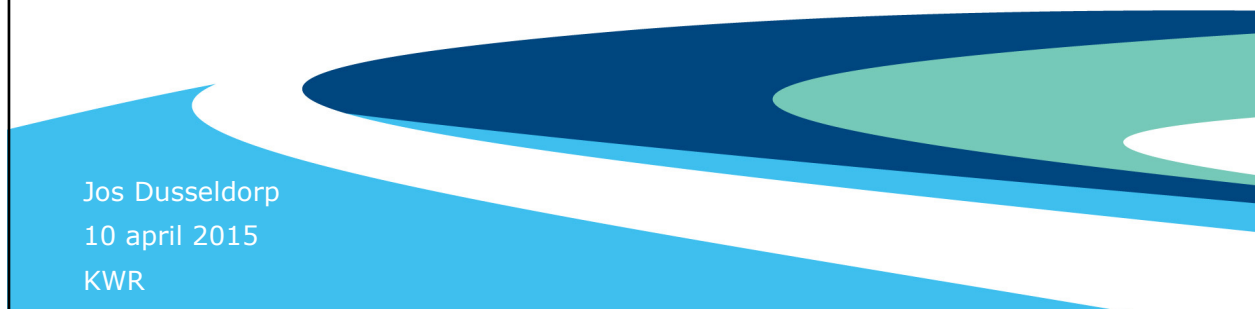
waternet

# Bacteriologische besmetting winning + zuivering ZS De Put

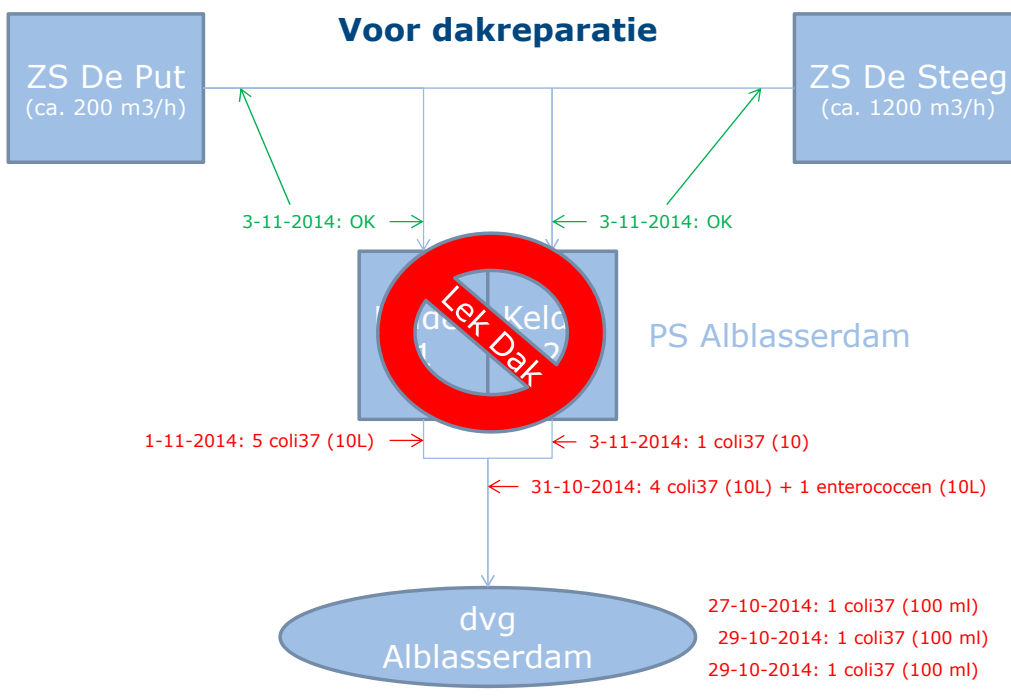
1<sup>e</sup> Workshop CCC (ColiCoccenCombinatie)

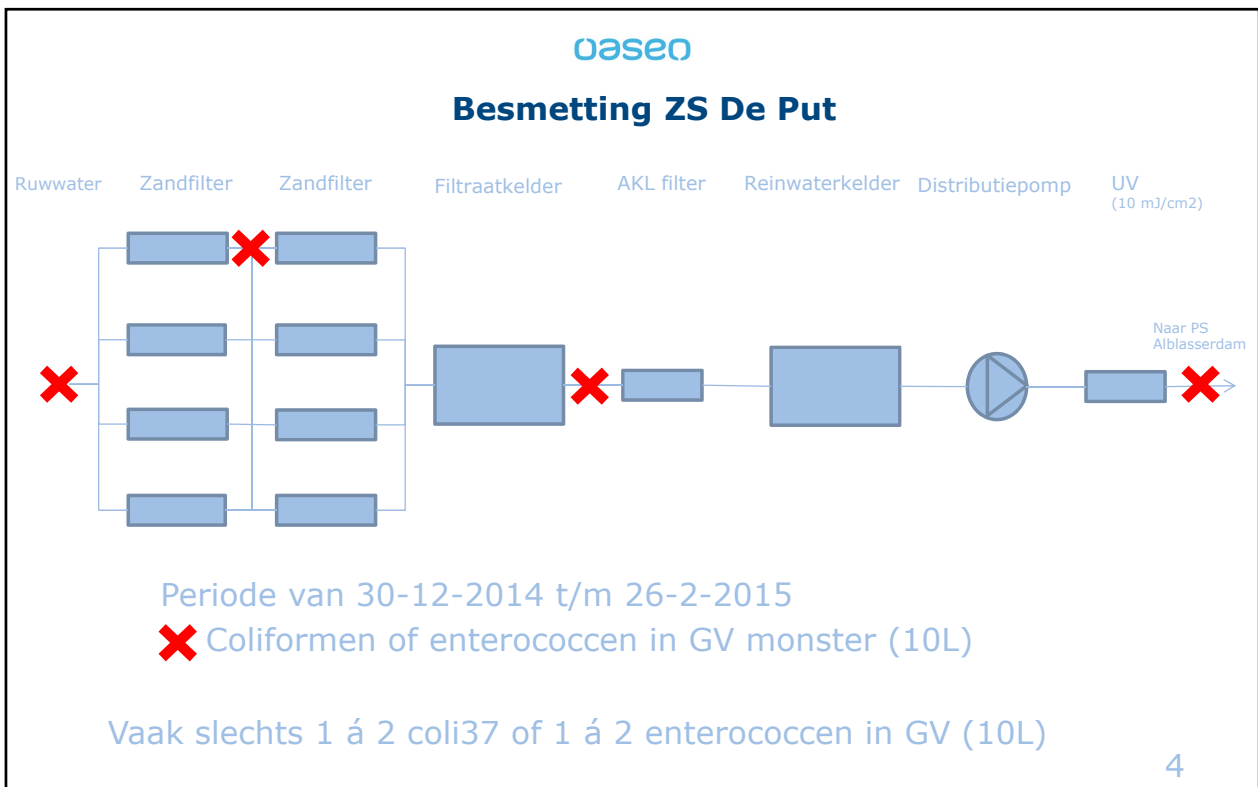
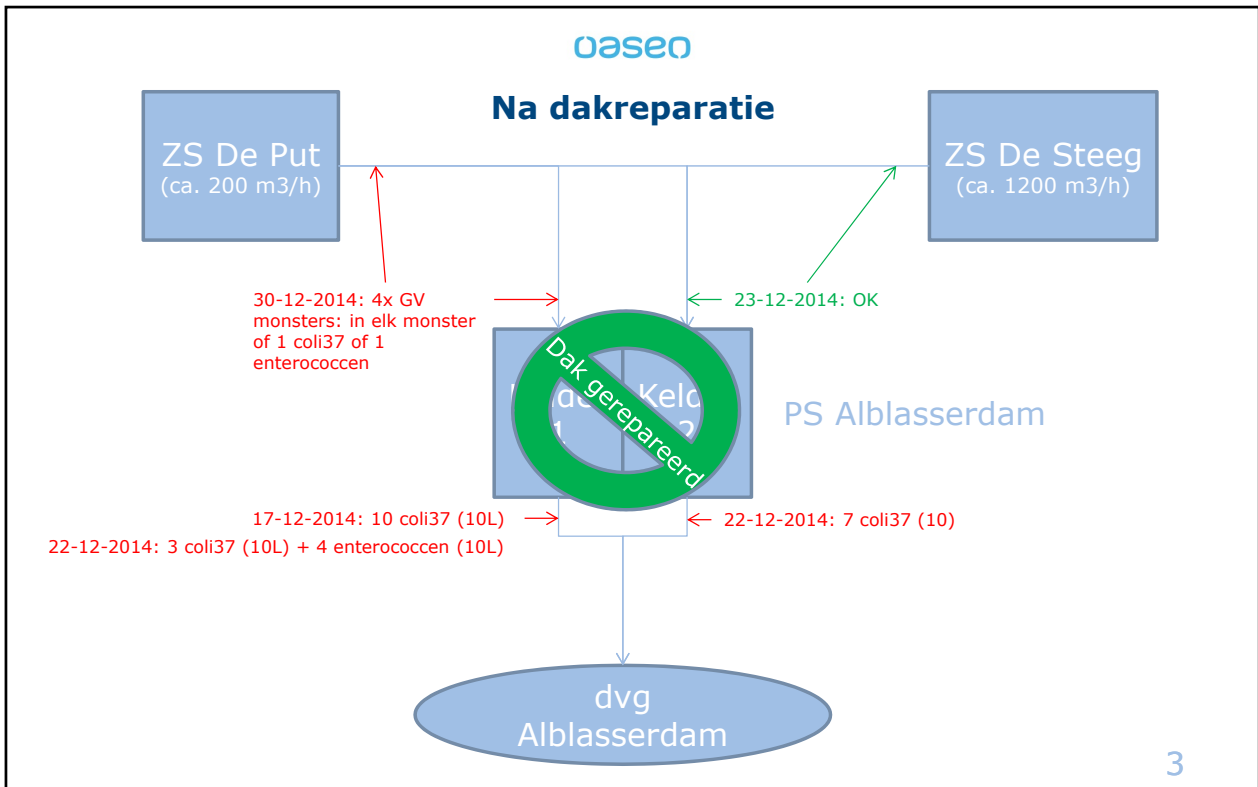
Te gast bij DWPE onderzoek

Jos Dusseldorp  
10 april 2015  
KWR

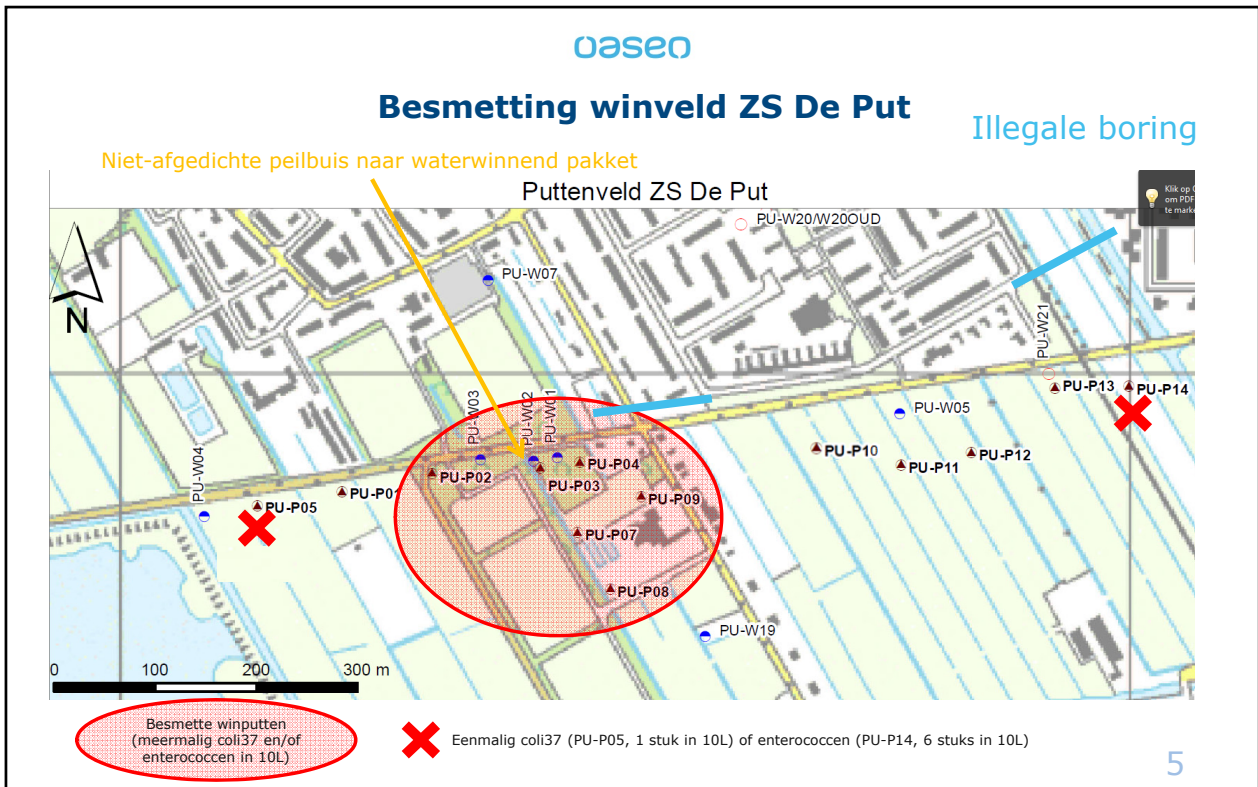


## Voor dakreparatie









- oaseo
- ## Vervolg
- Niet-afgedichte peilbuis is uitgeboord en correct afgedicht
  - Illegale boring bleek boven de deklaag (klei) te zijn geboord
  - Winputten in verdachte gebied staan op stilstand (of spuien om andere winputten te beschermen)
  - Overige winputten in bedrijf (sinds 26-2-2015 in 25 GV monsters genomen in de zuivering/uitgaand rein geen coli37 of enterococcen meer aangetoond)
  - Onderzoek omstorting winputten met injectie van stikstof
- 6

## Onderzoeksvragen

- Waar komen de coli37 en enterococcen vandaan?
- Hoe kunnen we een fecale besmetting van winveld en zuivering uitsluiten?
  - Opmerking: in geen enkel GV of 100ml monster is E-coli aangetoond
- Interpretatie van GV monsters?
  - Naast elk GV monster is ook een 100ml monster genomen. Na start incident geen coli37 of enterococcen in 100 ml meer aangetoond
- Wanneer veronderstel je winput/zuivering/uitgaand rein weer 'schoon'?
- Wat is de beste manier of coli37 / enterococcen weer uit de zuivering te krijgen?
  - Stilstand, filters vaak spoelen, hoger debiet, desinfectie, geduld?

[Op zoek naar een uniforme aanpak](#)

## Memo

### Aan / Team

Deelnemers 1ste Workshop CCC op 10 april 2015

### Van / Team

Herman Smit

### Telefoonnummer

06 536 926 50

### E-mail

Herman.Smit@pwn.nl

### Datum

20 april 2015

### Onderwerp

Verslag 1ste workshop CCC op 10 april 2015

### Inleiding

Zonder uitzondering hebben de DPWE bedrijven in de afgelopen jaren ervaringen gehad met het incidenteel aantreffen van ongewenste indicator organismen, zijnde Coliformen 37° en/of Enterococcen. Elk van de DPWE-bedrijven zijn speurend geweest naar dé oplossing voor dit probleem en om iedere illusie gelijk te elimineren: deze is niet gevonden.

In deze eerste Workshop hebben de DPWE bedrijven en Oasen elk een casus en de specifieke vragen van het betreffende bedrijf voorgelegd. Daarnaast heeft Patrick Smeets (KWR) een presentatie gegeven over de relevantie van grootvolume monsters.

### Het programma:

Het gehanteerde programma van de dag was:

Tijd	Onderwerp	Spreker
9:00	Inloop met koffie en thee	
9:30	Ontvangst door dagvoorzitter	Herman Smit
9:45	DPWE – CCC – aanleiding en doelstelling	Leon Kors
10:15	<i>Coliformen</i> en <i>Enterococcen</i> : Relevantie van groot volume monsters	Patrick Smeets
11:00	Koffiebreak	
11:15	Casus 1 – Dunea	Ed van der Mark
12:00	Lunch	
13:00	Casus 2 – PWN	PWN
13:45	Casus 3 – Waternet	Jos Hooft
14:30	Theebreak	
15:00	Casus 4 – Evides	Heleen Westerink
15:45	Samenvatting - Bundelen vraagstukken - Opdrachtformulering voor 2 <sup>de</sup> workshop	Herman Smit
16:15	Sluiting	

Vanwege een overschot aan spreektijd heeft Oasen een casus in kunnen brengen en heeft HWL het geplande onderzoek toegelicht.

### Highlights van de presentaties:

*Patrick Smeets (KWR) - relevantie van grootvolume monsters*

- De risico inschatting beweegt van aanwezigheid van coliformen en enterococcen in 100ml ja/nee naar een filosofie: ze horen er niet in drinkwater aanwezig te zijn. als ze worden aangetroffen wat is de herkomst?
- De herkomst van de ene enterococ en/of coliform is de andere niet.
- Verdeling is niet homogeen in het water. Klein volume grote kans op overschatting (aangetroffen) of onderschatting (vals negatief). Groot volume is pakkans groter, betere schatting van de werkelijke

#### *Ed van der Mark – Dunea*

- Theoretisch vs. praktische desinfectiecapaciteit
  - Theorie: Duin + LZF = 8 + 3 = 11 DEC. Na duin mag er 1 e.coli in 1.000ltr aanwezig zijn of 0,1 in 100ltr (Grovol) met andere woorden afwezig in 100ltr.  
Praktijk: 2005 – 2014: 100 – 400 coliformen in 100ltr onttrokken water. Met name zomerperiode juli t/m okt.
    - Relaties: temperatuur, hoger grondwaterstand, veel regenval?
  - Als na werkzaamheden een 1ltr monster genomen wordt ipv de verplichte 100ml monsters neemt het aantal afkeuringen toe van 5% naar 14%. Periode september – oktober. Warmer.
    - Theorie gaat uit van integer systeem. Dit is in praktijk voor win- en distributiesysteem niet te borgen.
  - 100ml geven vals negatieve uitslagen. Hierdoor nemen bedrijven 'besmette' leidingen weer in bedrijf.
- Voorstel: Meten in groter volume na werkzaamheden.  
Vraag: onderzoek opzet na ingreep 1 of meer?

#### *Bernadette – PWN*

- Besmetting in infiltratiegebieden. Aantal en duur besmettingen varieert per jaar. Soms putten langdurig (maanden tot jaar) besmet soms enkele weken.
  - Verschil Ikief en Icas: Ikief weinig besmettingen en als ze er zijn kortdurend, uitgezonderd put 10-608: duurde meer dan een jaar. Icas vorig jaar: op een strang na geheel besmet gedurende enkele maanden. De strang (Q300) die in 2014 schoon was/bleef was in 2013 langdurig besmet (9 maanden).
  - Afgelopen jaren veel onderzoek en veel zaken uitgesloten. Oorzaak (of oorzaken nog niet gevonden)  
Op dit moment is een stagiair actief met kleurstof onderzoek naar mogelijke kortsluitstromen en andere effecten in de bodem.
- Vraag: Ervaring van andere bedrijven met waarden op individueel strang niveau?

#### *Jos Dusseldorp – Oasen*

- Uit regulier distributiemonster en na herhalingen coliformen terug kunnen zoeken via distributiepompstation (Alblasserdam) naar zuiveringsstation de PUT.
  - Open peilbuis aangetroffen is afgedicht -> Geen oplossing. Illegale boring boven afdichtende kleilaag nabij winputten -> kan niet oorzaak zijn. Winputten in verdacht gebied op spui, overige winputten in bedrijf. Geen coliformen en enterococci meer in Grovol (10ltr). Onderzoekt loopt naar de omstorting van de verdachte winputten.
- Vragen: Wanneer zet je een bedrijf weer bij?  
Hoe krijg je effectief een besmetting weer uit je bedrijf?  
Enterococci in afwezigheid van coliformen?  
Gedrag door de zuivering heen?

#### *Jos Hooft – waternet*

- Begin juli 2 enterococci in standaard 1ltr monster reinwaterkelder Weesperkarspel
  - In herhalingsmonster Grovol (100ltr) 1 enterococci reinwaterpomp 1
  - Terugzoeken op verschillende plekken steeds aantallen coliformen en/of enterococci aangetroffen, niet meer na drinkwaterreservoirs.
  - Weesperkarspel op lagere productie 3.000m<sup>3</sup>/h -> 2.000m<sup>3</sup>/h
  - Na herbemonstering alles okee. Productie weer opgeschroefd naar 3.000m<sup>3</sup>/h gebracht: nu aantal coli37 in 100ltr na LZF en reinwaterpompen.
  - Productie weer verlaagd naar 2.000 m<sup>3</sup>/h. na herbemonsteringen weer schoon. Terug zoeken in de zuivering. Diverse zaken gevonden.
  - Eind juli terug naar normaal maar spoelwaterbehandeling water nu op de sloot lozen.
- Vraag: Wanneer ga je uit bedrijf?  
Fluctuaties in hoeveelheden coliformen en enterococci uit de plas?

#### *Heleen Westerink – Evides*

- Coliformen na infiltratie. Coli seizoensinvloeden: 0 – 180 ltr, e.coli 0 – 40 ltr.
  - Horizontale drains 2 – 5 onder maaiveld.
  - Waren hoop struiken / begroeiingen op de drains met wortels tot in de drains -> zijn gerooid.
- Vragen: oorsprong van coliformen  
Waarom komen coliformen uit de infiltratie?  
Wat kan Evides doen om Infiltratie betrouwbaar te maken.

### **Algemene zaken: actiepunten uitzoeken voor de volgende Workshop**

- Vergelijk gegevens typering op verschillende plekken in de zuiveringen – Actie allen  
Wat kunnen we leren van typering cq. successie
- Vergelijk meten in distributienet na ingreep 100ml -> 1ltr monsters. Is het afkeuringspercentage 2-5% of ligt dit hoger?
- Vergelijken metingen op individueel strang(PWN - Bernadette)/drain(Evides - Heleen)/U-bak(Waternet – Steven van Duijvenbode) in relatie met verzadigde zone, transport afstand en afdoding.
- Vergelijk gedrag door de zuivering heen (Oasen – Jos Dusseldorp) (Waternet – Jos Hooft) – Wat zou de oorzaak kunnen zijn dat de zuivering niet doet wat hij zou moeten doen?
- Wanneer zet je een zuivering weer bij (Oasen – Jos Dusseldorp) (Waternet – Jos Hooft) – vraagstuk is gerelateerd aan de vraag is 1 per 100ltr een probleem?
- Volumes. Theoretisch vs. Praktisch risico, indicator vs. ziekteverwekkers?
- Snelle fecale detectie – PCR vs. kweek
- Wat kan je doen als blijkt dat de AMVD in de praktijk niet voldoende blijkt?

**Agenda 2<sup>de</sup> workshop CCC**  
**KWR Nieuwegein, Optivalves**

9.30u – 10.00u	Ontvangst met Koffie/Thee	
10.00u – 10.20u	Source tracking	Leo Heijnen
10.20u – 10.40u	Maldi TOF (incl typering en successie bij de DPW(E) Bedrijven	Maja Toucer
10.40u – 11.00u	PCR vs. Kweek methoden voor-/nadelen	Leon Heijnen
11.00u – 11.15u	Voortgang onderzoek	Eric Penders
11.15u – 11.30u	Koffie	
11.30u – 12.15u	Terugkoppeling onderlinge contacten: - Vergelijking metingen individuele strangen (PWN), drains (Evides), verzameld teruggewonnen water (Dunea) en U-Bak (Waternet - Vergelijking gedrag door de zuivering Oasen / Waternet	
12.15u – 13.00u	Lunch	
13.00u – 14.00u	Groepsdiscussie I: Hoe om te gaan met uitslagen van Grovols Inleiding door Patrick Smeets: - pakkans en wat zegt een positieve uitslag Leon Kors trapt af met stelling Lagerhuis format: Voor- en tegenstanders Afronden naar gedragen voorstel DPWE breed	
14.00u – 14.20u	Thee	
14.20u – 15.20u	Groepsdiscussie II: In- en uitbedrijf criteria Uiteen in 3 groepen: winningen (Herman), Zuivering (Leon) Distributie (Ed) Terugkomen met voorstel voor hele groep Voorstellen bediscussiëren Afronden naar gedragen voorstel DPWE breed	
15.20u – 15.30u	Afsluiting	
– 16.00u	Uitloop	

## **MALDI-TOF voor de snelle identificatie van bacteriën in water**

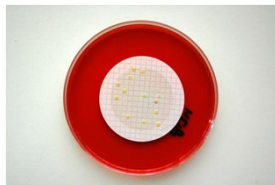
M. Taučer-Kapteijn en W. Hoogenboezem

2 oktober 2015, KWR Nieuwegein

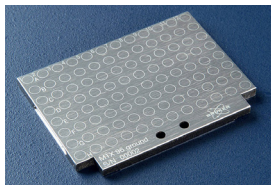
## **MALDI-TOF**

Met MALDI-TOF MS wordt van de micro-organismen een massaspectrum gemaakt. Het massabereik is zodanig dat veel voorkomende (voornamelijk ribosomale) eiwitten van de organismen worden gemeten.

## Werkwijze MALDI-TOF

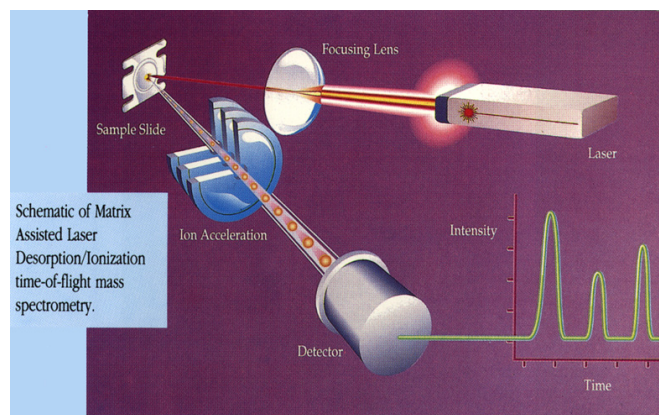


Een membraanfilter op lozeak



4 min/ identificatie

## MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight)



Door de energie van een laser verdampen (in vacuüm) zowel de matrix als het monster en komen ze in de gasfase terecht (desorptie). Ook wisselen ze een proton (positief geladen deeltje) met elkaar uit waardoor voornamelijk enkelvoudige positief geladen moleculen (ionisatie) ontstaan. De ionen worden versneld in een elektromagnetisch veld richting detector.



## Vergelijking massaspectra met de database

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Enterococcus hirae DSM 20160T DSM	2.231	<a href="#">1354</a>
2 (++)	Enterococcus hirae DSM 3320 DSM	2.174	<a href="#">1354</a>
3 (+)	Enterococcus villorum DSM 15688 DSM	1.774	<a href="#">112904</a>
4 (+)	Enterococcus ratti DSM 15687T DSM	1.772	<a href="#">150033</a>
5 (+)	Enterococcus faecium 11037 CHB	1.717	<a href="#">1352</a>
6 (-)	Enterococcus faecium 20218_1 CHB	1.652	<a href="#">1352</a>
7 (-)	Enterococcus faecium PX_21086109_III MLD	1.65	<a href="#">1352</a>
8 (-)	Enterococcus faecium DSM 13589 DSM	1.486	<a href="#">1352</a>
9 (-)	Clostridium paraputrificum 1083_ATCC 17796 BOG	1.421	<a href="#">29363</a>
10 (-)	Enterococcus mundtii DSM 4840 DSM	1.391	<a href="#">53346</a>

## Betrouwbaarheid

### Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

## Implementatie MALDI-TOF

- In vergelijking met andere identificatie/bevestiging technieken b.v. Api-test en PCR is MALDI-TOF sneller en minder arbeidsintensief.
- Een nadeel van deze techniek is, dat een directe detectie uit water niet mogelijk is. Om een identificatie te kunnen uitvoeren is namelijk een hoge concentratie bacteriën nodig (een kolonie).
- Er is de uitbreiding van de database mogelijk.
- Per analyse gevalideerd /onder accreditatie.

## Gebruik van de MALDI-TOF

- identificatie techniek (soort naam)
- vervanging van de bevestigingstechnieken
- "source tracking" (samenstelling van soorten, bron identificatie)
- meer informatie over de fecale bronnen (vers fecaal/ langdurig verblijf in het milieu)

## Monitoring (enterococci in abstracted water)

- 181 large volume samples (100L)
- In total 387 colonies identified with MALDI-TOF

- *E. moraviensis* (44.2%)
- *E. faecalis* (30.0%)
- *E. casseliflavus* (12.9%)
- *E. faecium* (3.9%)
- *E. mundtii* (3.9%)
- *E. termitis* (2.6%)
- *E. hirae* (1.8%)
- *E. haemoperoxidus* (0.5%)



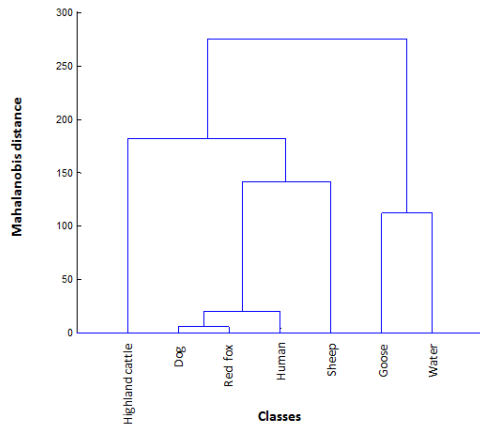
## Faecal sources in ICAS - enterococci species distribution



Enterococcus spp.	red fox	rabbit	sheep	highland cattle	dog	human	goose	abstracted water
<i>E. faecalis</i>	39.6	0.9		35.3	54.2	27.2	29.4	30.0
<i>E. faecium</i>	23.7			5.9	11.8	35.1	7.8	3.9
<i>E. hirae</i>	25.5		69.0	5.9	18.1	2.3		1.8
<i>E. durans</i>	4.9		2.4		8.3	3.8		
<i>E. casseliflavus</i>	1.0		5.6	52.9	2.1	2.6	5.2	12.9
<i>E. gallinarum</i>		98.1	9.5		1.4	2.0	3.9	
<i>E. mundtii</i>	2.9		13.5		0.7	5.8	8.7	3.9
<i>E. moraviensis</i>	0.3	0.9					23.8	44.2
<i>E. haemoperoxidus</i>							11.3	0.5
<i>E. avium</i>					2.8	18.7		
<i>E. gilvus</i>	0.3						4.3	
<i>E. termitis</i>							3.5	2.6
<i>E. saccharolyticus</i>						2.3		
<i>E. silesiacus</i>							2.2	
<i>E. agamarius</i>	1.0							
<i>E. thailandicus</i>					0.7			
<i>E. malodoratus</i>	0.5							
<i>E. sulfurens</i>	0.3							
<i>E. phoenicicola</i>								0.3



### Clustering op basis van de soortenverdeling



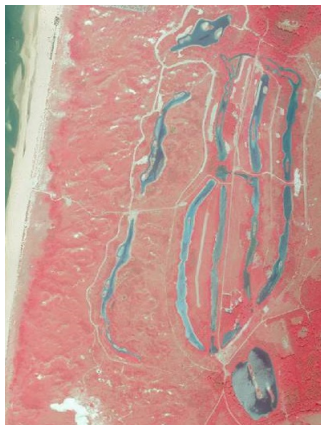
### Waarneming in het veld



Op sommige plekken in ICAS hoge aantallen ganzen aanwezig direct bij de putten.

### Het bepalen van "kritische plekken" (hoge fecale belasting door ganzen)

ICAS



ICAS (ganzen gebieden)



## Het weren van ganzen (ICAS) als gevolg van de MALDI-TOF resultaten



## Wanneer zet je een zuivering weer bij?

Is 1 ColiCoccon per 100 ltr een probleem?

Jos Hooft en Jos Dusseldorp  
2 oktober 2015

### Resumé case ZS De Put

- Zuiveringsstation uit productie gehaald na bacteriologische besmetting
- Oorzaak is lekstroom naar bacteriologisch betrouwbare winlaag (doorbraak afdekkende kleilaag)
- Injectie stikstof heeft aangetoond dat omstorting winputten lek was (gaten van 3 meter gevonden)
- Zuivering in productie gezet op 'goede winputten' + 17 goede opeenvolgende GV monsters in de zuivering

## Bijzetten na goede monsters versus QMRA

- Infectierisico lager dan 1 per 10.000 personen
  - Afwezigheid pathogenen in ca. 1.000.000 liter water
  - Met waterkwaliteitsanalyses niet haalbaar
- Toepassing QMRA (Quantitative Microbial Risk Assessment)
  - Omgekeerde QMRA → concentratie pathogenen in ruw water 'geschat' waarbij juist aan het infectierisico wordt voldaan

3

## Resultaten studie

- UV installatie maximaal effectief bij een fluence van 90 mJ/cm<sup>2</sup>
- Intensief monsterprogramma van pathogenen in onttrokken water voor 95% zekerheid
- Onzekerheid over verontreinigingsbron → zekerheid niet gegarandeerd op basis van negatieve monsterresultaten voor pathogenen

4

## Resultaten studie

- Kosten meten pathogenen zeer hoog
  - Toepassen getrapte meetstrategie
    - 100 liter monsters geconcentreerd
    - Analyses op bacteriofagen, (E.)coli en enterococcen
    - Positieve monsters onderzoeken op pathogenen en dierspecifieke fecale merkers
    - Gedurende het jaar → seizoensinvloeden

## Vergelijk gedrag door de zuivering heen

Wat zou de oorzaak kunnen zijn dat de zuivering niet doet wat hij zou moeten doen?

Jos Hooft en Jos Dusseldorp  
2 oktober 2015



## Grondwater versus Oppervlaktewater

- Grondwater (Oasen): microbiologisch betrouwbaar
- **Niet** te vergelijken met oppervlaktewater (Waternet)

7

## Grondwater (Oasen)

- Uitgangspunt: inkomend ruw is bacteriologisch betrouwbaar
  - Bodempassage >6 log verwijdering
- Aantasting integriteit winveld leidde op ZS De Put wel tot coliformen/enterococci in reinwater
  - UV fluence 10 mJ/cm<sup>2</sup>

8


## Grondwater (Oasen)

- Analysemeetprogramma

	Coliformen	Enterococcen
Ruw water	13x per jaar	2-4x per jaar
Zuiveringsprocessen	0x per jaar	0x per jaar
Rein water	52x per jaar	0x per jaar

**Klein volume (100 ml)**

- Na werkzaamheden / inbedrijfsvoering wel 1 of 2 bacteriologische monsters
- Plannen 2016: periodiek GV-monsters elk ZS voor opbouwen database




Puur water & natuur

## Vergelijken metingen op individueel strang/drain(Evides/U-bak in relatie met verzadigde zone, transport afstand en afdoding.

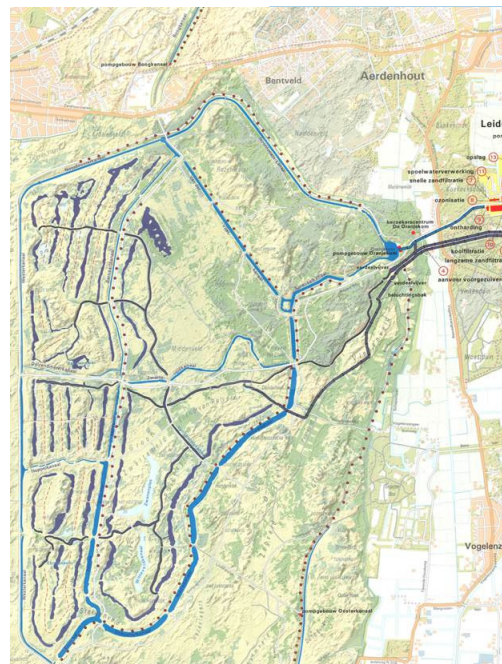
CCC workshop 2 oktober 2015

[www.pwn.nl](http://www.pwn.nl)



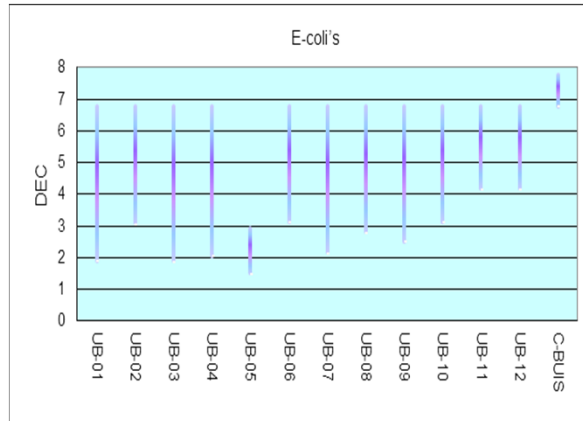
## Waternet

- Via de 12 U-bakken wordt het water uit de drains op de open winkanalen in de AWD geloosd.
- Alle drains worden dit jaar geschoond om de laterale aanstroom te verbeteren en de minimale verblijftijd van 60 dagen te kunnen garanderen.
- De verdeelputten (zwakke punt) van de drains worden aan een civieltechnische inspectie onderworpen.
- Nu kan de minimale verblijftijd niet voor alle drainonttrekkingen worden gegarandeerd. Dit is mogelijk de oorzaak voor het minder functioneren van de bodempassage in sommige perioden.



## Gemeten DEC

- Het GVO voor Enterococcon gaf een vergelijkbaar beeld.
- Monsternamen: Mei - Juni - Augustus - November 2012
- Mei en Juni scoorde het best en augustus het slechts qua DEC.
- In 5 C\_buizen (stijgbuizen op de drain zelf) is eenmalig (november) gemeten. Alles was schoon (0 kve/100L).
- Boven drains UB-05 liggen allerlei kwelplassen. In hoge mate sprake van kortsluitstromen. Zijn van plan deze kwelplassen te gaan dempen (lastig traject vanwege F&F wetgeving)
- Het streven is om de spreiding in de DEC te verkleinen en standaard een DEC van > 5 te hebben.

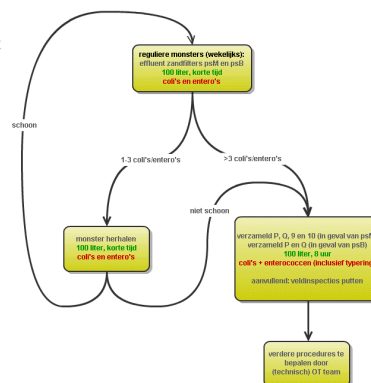


## PWN

In de periode 2011-2013 zijn voor de bepaling van de achtergrondconcentratie de volgende monsterpunten gemeten met behulp van grootvolumemonsters:

- De effluënten van de snelfilters van PWM en PBG zijn gedurende het hele jaar elke week gemeten op bacteriën van de coligroep en elke maand op enterococcon.
- Het uitgaande water van beide pompstations is in 2011 en 2012 elke week en in 2013 elke twee weken gemeten op bacteriën van de coligroep maar niet op enterococcon.
- De secundairs in het infiltratiegebied (9, 10, P en Q) zijn in 2013 van mei t/m oktober elke week gemeten op zowel bacteriën van de coligroep als enterococcon.

Bij het aantreffen van bacteriën van de coligroep en/of enterococcon van bovengenoemde monsters zijn herhalingsmonsters en extra monsters van de strangen genomen om de oorzaak van de besmetting te kunnen achterhalen. Deze herhalingsmonsters zijn niet meegenomen in de berekening van de achtergrondconcentratie.



Voor elk monsterpunt is in de onderzochte periode de gemiddelde aantal over een jaar berekend door de som van het aantal aangetroffen bacteriën van de coligroep of enterococce te delen door het totaal bemonsterde volume.

PSM: Gemiddelde concentratie per jaar van bacteriën van de coligroep (kvd/l)

Jaar	PWM-VLZF-EFF1 (kvd/l)	PWM-VLZF-EFF2 (kvd/l)	PWM-PO-RW (kvd/l)
2011	0,0107	0,0071	<0,0002
2012	0,0100	0,0391	<0,0002
2013	0,0670	0,0119	<0,0004
2014	0,0585	0,0728	<0,0003

PSM: Gemiddelde concentratie van enterococce (kvd/l)

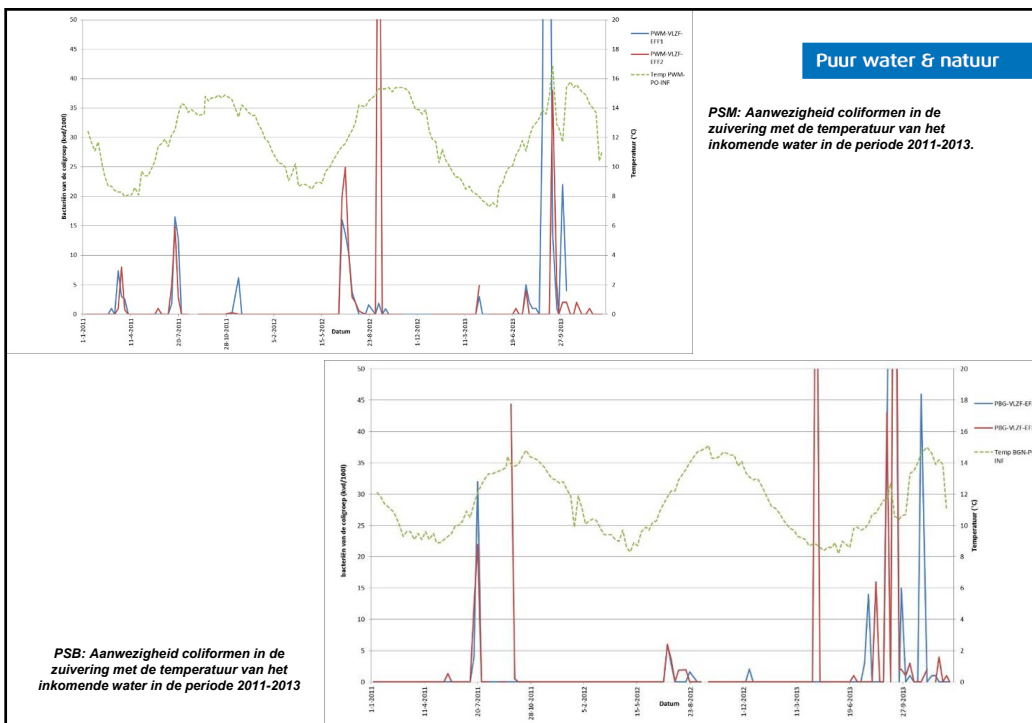
Jaar	PWM-VLZF-EFF1 (kvd/l)	PWM-VLZF-EFF2 (kvd/l)	PWM-PO-RW (kvd/l)
2011	-*	-	-
2012	0,0022	0,0043	-
2013	<0,0011	<0,0009	-
2014	<0,0004	0,0003	<0,0004

PSB: Gemiddelde concentratie per jaar van bacteriën van de coligroep (kvd/l)

Jaar	PBG-VLZF-EFF1 (kvd/l)	PBG-VLZF-EFF2 (kvd/l)	PBG-PO-RW (kvd/l)
2011	0,0073	0,0170	<0,0002
2012	0,0026	0,0027	<0,0002
2013	0,0579	0,0540	0,0004
2014	0,0692	0,0286	0,0036

PSB: Gemiddelde concentratie van enterococce (kvd/l)

Jaar	PBG-VLZF-EFF1 (kvd/l)	PBG-VLZF-EFF2 (kvd/l)	PBG-PO-RW (kvd/l)
2011	-	-	-
2012	0,0008	0,0023	-
2013	<0,0008	<0,0008	-
2014	0,0177	0,0121	<0,0004



Gemiddelde concentratie per jaar van bacteriën van de coligroep (kvd/l) in verzameld effluent secundairs 9 en 10 (IKIEF) en secundair P en Q (ICAS) in de jaren 2011 t/m 2014

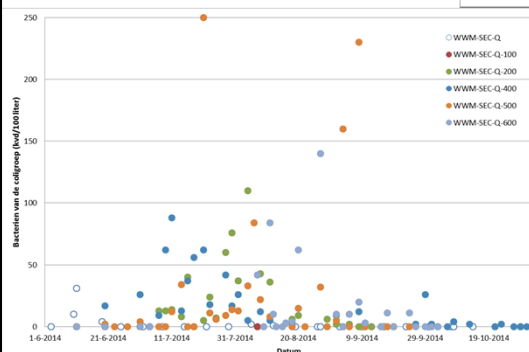
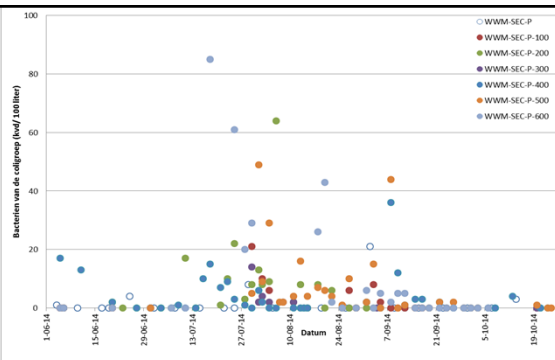
Jaar	WWM-SEC-09	WWM-SEC-10	WWM-SEC-P	WWM-SEC-Q
	kvd/l	kvd/l	kvd/l	kvd/l
2011	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
2012	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
2013	<0,0004	0,0023	0,0079	0,0228
2014	<0,0004	0,0033	0,0294	0,0047

Gemiddelde concentratie per jaar van enterococci (kvd/l) in verzameld effluent secundairs 9 en 10 (IKIEF) en secundair P en Q (ICAS) in de jaren 2011 t/m 2014

Jaar	WWM-SEC-09	WWM-SEC-10	WWM-SEC-P	WWM-SEC-Q
	kvd/l	kvd/l	kvd/l	kvd/l
2011	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
2012	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
2013	0,0013	<0,0003	0,0104	0,0105
2014	<0,0003	<0,0003	0,0112	0,0007



Overzicht van de aanwezigheid van bacteriën van de coligroep (kvd/ 100l) in de strangen en het verzameld effluent van secundair P van 1 juni 2014 t/m 1 november 2015 ( de hoge waarden van P-400 vanaf 19-10-2014 zijn weggelaten uit oogpunt van overzichtelijkheid



Overzicht van de aanwezigheid van bacteriën van de coligroep (kvd/100l) in de strangen en het verzameld effluent van secundair Q van 1 juni 2014 t/m 1 november 2015 (Q300 is weggelaten uit oogpunt van overzichtelijkheid, wordt apart besproken).



## Vragen vanuit PWN

- Vorig jaar hadden wij veel oorwormen in putten zitten, dit jaar hebben wij alle pakkingen vernieuwd en zijn er bijna geen oorwormen meer te zien. Hebben jullie ook oorwormen in de buurt van de (win)putten?
- Dit jaar hebben we regelmatig hoge aantallen coliformen na de zandfilters we hebben geprobeerd het influent te meten maar daar vinden we alleen soms lage aantallen coliformen. Wij hebben het idee dat coliformen uit de zandfilters spoelen. Hebben jullie daar ervaringen mee?



Nieuwegein, 10 april 2015 1

# Coliformen en enterococcen: relevantie van groot volume monsters - SAMENVATTING

DPWE CCC workshop  
Patrick Smeets, 2 oktober 2015

**KWR** Watercycle Research Institute

Bridging science to practice 2

## Hoe zijn (indicator) organismen verdeeld in het water? 150 organismen in 25000 liter (25 X monstervolume)

**KWR** Watercycle Research Institute



# Pakkans distributie

## Modelonderzoek:

- Periodiek meetprogramma: 5% pakkans grote verontreiniging
- Werkzaamheden: 25% pakkans (in 100 ml na 24 uur wachttijd)

## Verhogen pakkans:

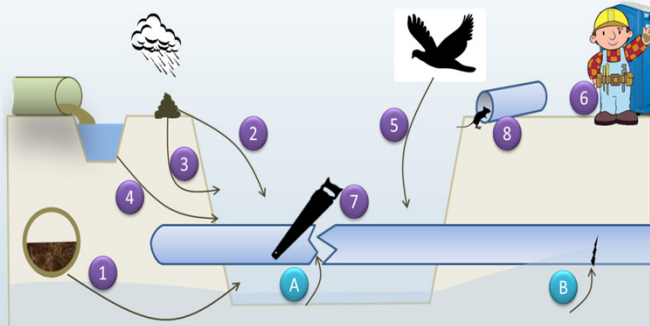
- Continu meten op strategische punten: 63%
- Direct meten na spuien: 2X zo vaak positief
- 1 liter monster na werkzaamheden: 3X zo vaak positief

Op basis van modelberekeningen en zeer beperkte meetgegevens!

# Wat is de fecale bron?

Rioolwater en oppervlaktewater: meer indicatoren dan pathogenen

Poep van dieren of mensen mét infectie: van 10.000 keer minder tot 100 X meer pathogenen dan indicatoren

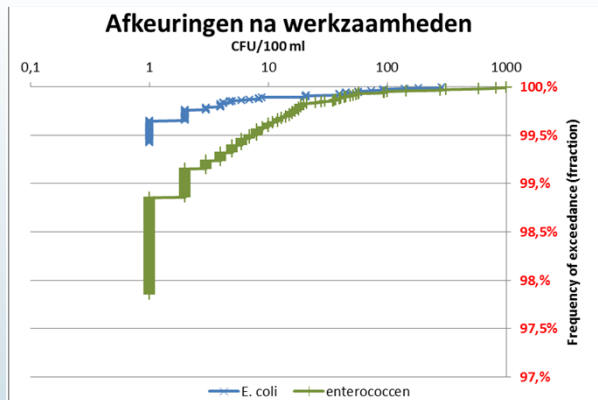


MOGELIJKE BESMETTINGSBRONNEN EN ROUTES

Organisme	Riool <sup>2,3</sup>	Opp. Water <sup>2</sup>	Mens Feces <sup>4</sup>	Rund <sup>5,6,7</sup>	Hond <sup>2,3</sup>	Schaap <sup>2,3</sup>	Vogel/meeuw <sup>2,3</sup>	Hert/Ree <sup>2,3</sup>
	Log <sub>10</sub> n/l		Log <sub>10</sub> n/g of Log <sub>10</sub> DNA/g					
Indicator-organismen								
<i>E. coli</i>	7,5-8,6	4,1	6,0	5,3	8,1		5,0-6,7	
Enterococci	6,4-7,5	4,3	5,5	x	4,4		2,0-5,1	
<i>C. perfringens</i>	5,0-6,3							
Somatische colifagen	3,0-6,4	2,9						
F-specifieke RNA fagen	5,7-7,0	3,7						
Pathogenen								
Enterovirus	0,5-3,1	-0,3						
<i>Campylo-bacter</i>	2,5-6,0	1,9	6,0-9,0	2,0-5,7		3,1	1,2-7,3	2,1-7,2
<i>Cryptosporidium</i>	1,6-4,5	1,8	7,0-8,0	1,7-3,6		-8,3	2,3-3,9	<0,0-2,9
<i>Giardia</i>	0,8-5,8	1,9	5,0-8,0	-0,0-6,8			0,0-4,9	

PATHOGENEN EN INDICATORORGANISMEN IN FECALE BRONNEN

## Ervaringen met metingen



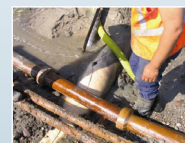
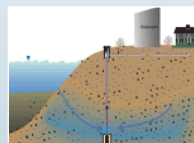
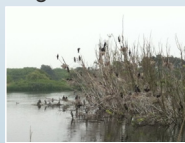
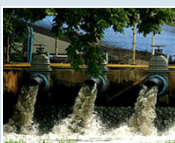
VOORBEELD WATERKWALITEITSCONTROLE NA WERKZAAMHEDEN  
1 WATERBEDRIJF 10 JAAR

Monsters:	130	3	32	18	35
coliformen	+	+	+	+	-
<i>E. coli</i>	-	+	+	-	-
enterococci	-	+	-	+	+

VOORBEELD WATERKWALITEITSCONTROLE NA WERKZAAMHEDEN 1  
WATERBEDRIJF 10 JAAR

## Samenvattend

- Eén monster met één kolonie vormt geen basis voor kwantificering van risico
  - Kwalitatief: hoe kan deze hier terecht komen? Falen barrières? Mogelijke fecale bron?
- Enkele monsters met één kolonie: 'toevalstreffers', gemiddelde concentratie onder de meetgrens
  - Zeer globale schatting van gemiddelde concentratie
- Plus enkele monsters met meerdere kolonies, variabele concentratie tot boven meetgrens
  - Redelijke schatting van gemiddelde en globale schatting van variatie
- 'Special events' kun je niet voorspellen op basis van variatie!
- Risicobeoordeling: wat is de fecale bron???



# Lagerhuis discussie

# Identificatie van fecale besmettingsbronnen (Source tracking)

DPWE: CCC workshop  
2 oktober 2015

## Herkomst van fecale verontreinigingen

### Belang

Kennis over de herkomst:

- Gericht en efficiënt oplossen van problemen
- Maatregelen om problemen te voorkomen
- Informatie over het risico
  - Fecale verontreiniging t.g.v. mensen > virussen

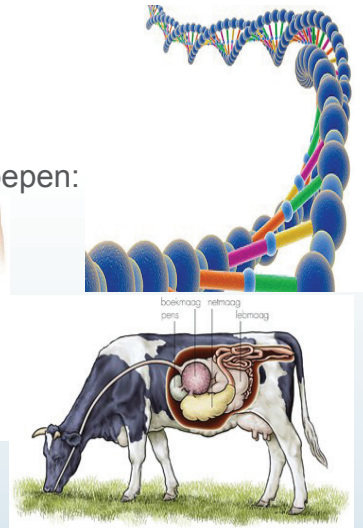
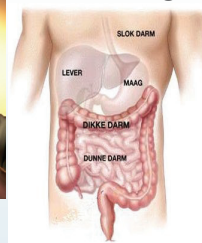
Dier(soort/groep) specifieke DNA-merkers

- Van welke diersoort/-groep is een fecale verontreiniging afkomstig?

# Methoden: basis

Diergroep specifieke darmbacteriën door verschillen tussen diersoorten/groepen:

- Genetische
- Morfologische
- Voedingspatroon
- Verschillen in samenstelling van darm-flora
  - Bacterietypen die specifiek bij één diersoort/groep voorkomen
    - o.a. verschillende bacteroides typen
  - Bacterietypen te onderscheiden met DNA-merkers
    - DNA merkers kwantificeren met qPCR



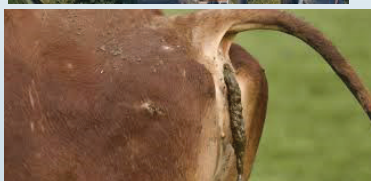
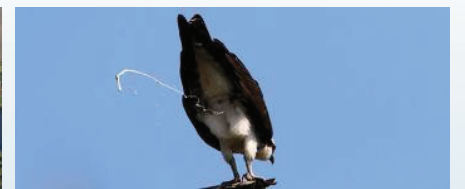
# Methoden: ontwikkeling BTO 2012-2014 Rijkswaterstaat

Ontwikkelde methoden:

Methode	Target
Mensen	DNA van Bacteroides bacteriën
Hekauwers	DNA van Bacteroides bacteriën
Runderen	DNA van Bacteroides bacteriën
Varkens	DNA van Bacteroides bacteriën
Vogels	DNA van Helicobacter bacteriën
Honden	DNA van honden

BTO 2013.014

BTO 2014.053



## Eigenschappen van de merkers

Getest op grote collectie fecale monsters van mensen, runderen, schapen, vogels, herten/reeën:

- Zeer specifiek
- Hoge concentraties in feces
  - Veel hoger dan E.coli/enterococci
  - Detectie: zeer gevoelig

Toepassing op groot aantal zwemwater locaties (RWS/waterschappen):

- Resultaat van merkers matched de verwachting:
  - Merkers lijken geschikt om herkomst van fecale besmettingen te achterhalen
  - Worden steeds meer toegepast

## DPW onderzoek 2014

Vraag: zijn DNA-merkers bruikbaar voor het identificeren herkomst fecale verontreinigingen?

Gedurende een jaar analyse van:

- Monsters afkomstig van feacaal besmet "open water"
  - Worden de bronnen gedetecteerd?
- Monsters afkomstig van locaties waar geen besmettingen te verwachten zijn maar wel E.coli en/of enterococci worden gedetecteerd (strangen, na duinpassag)
- Geven DNA-merkers inzicht in de bron van besmetting?

## Resultaten DPW onderzoek 2014

- Monsters afkomstig van fecaal besmet “open water”
  - Resultaat: gedetecteerde DNA merkers komen overeen met de verwachting
- Monsters afkomstig van locaties waar geen besmettingen te verwachten (strangen, na duinpassage)
  - DNA-merkers geven geen duidelijke aanwijzingen
    - Geen fecale herkomst van aangetoonde E.coli/enterococcen?
    - Andere “besmetter”, geschikte DNA-merker ontbreekt? Welke?
    - Gevoeligheid DNA merkers?



KWR Watercycle Research Institute  
KWR 2015.036

## Conclusie

DNA-merkers zijn geschikt om de bron(nen) van fecale besmettingen te achterhalen (source tracking).

DNA merkers hebben nog geen inzicht gegeven in de herkomst van sporadische besmettingen die worden aangetoond na duinpassage.

- Of is het niet vinden van merkers juist belangrijke informatie?

## MALDI-TOF-MS analyse ter discriminatie en karakterisering van milieustammen van enterococconen/ *E.coli* versus enterische stammen.

### Voortgang onderzoek/GO-NOgo

DWPE vergadering 6 november 2015

Eric Penders  
Sander Dijkstra

## Inleiding

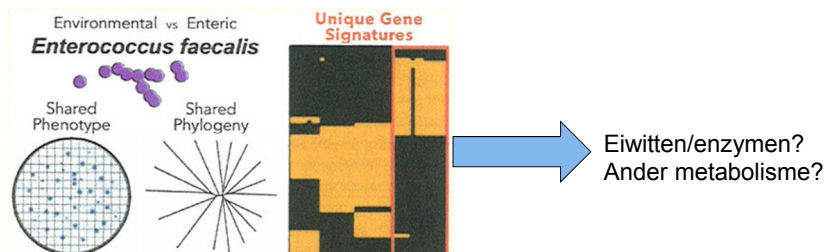
Bij constatering van een besmetting wordt de vraag gesteld of de besmetting direct afkomstig is van feces of dat de besmetting het gevolg is van nagroei of afkomstig is van een andere bron. Met deze aanvullende gegevens kunnen mogelijk betere maatregelen genomen worden.

**ENVIRONMENTAL**  
Science & Technology

Article  
pubs.acs.org/est

### Genome Sequencing Reveals the Environmental Origin of Enterococci and Potential Biomarkers for Water Quality Monitoring

Michael R. Weigand,<sup>1</sup> Nicholas J. Ashbolt,<sup>2,4</sup> Konstantinos T. Konstantinidis,<sup>5,7,8,11</sup> and Jorge W. Santo Domingo<sup>6,9</sup>





## Experimentele opzet

'Proof of principle' fase

- Kweek van *E. moraviensis* op plantextract en fecesextract wordt uitgevoerd, waarna op een tijdstip materiaal op SBA platen wordt beënt en gekweekt volgens standaardvoorschrift en extracten worden gecentrifugeerd voor het verkrijgen van een bacteriën-pellet.
- Pellets en kolonies vanuit de plaat worden met de MALDI-TOF-MS geanalyseerd en verschillende eiwitspectra worden verkregen.
- De eiwitspectra worden geëvalueerd m.b.v. multivariabele statistiek om clusters van eiwitten te vinden die dienst kunnen doen als merker.
- Indien nodig: verdere optimalisatie van MALDI-TOF-MS analyse matrix (gebruik van verschillende matrixoplossingen en extra enzymen (lysozyme)).

Indien 'Proof of principle' succesvol -> Praktijkgegevens besmettingen (fase 2)

## Uitvoering 'Proof of principle' fase

Gras



100 gram + 2 l steriel PLD-LZF water  
5 uur laten staan  
om het uur geroerd

0,22 µm filter



Autoclaaf  
15 min. 121 grd. C

Gans



40 gram + 2 l steriel PLD-LZF water  
5 uur laten staan  
om het uur geroerd



Centrifugeren voor weghalen storende deeltjes

Mens



23 gram + 2 l steriel PLD-LZF water  
5 uur laten staan  
om het uur geroerd

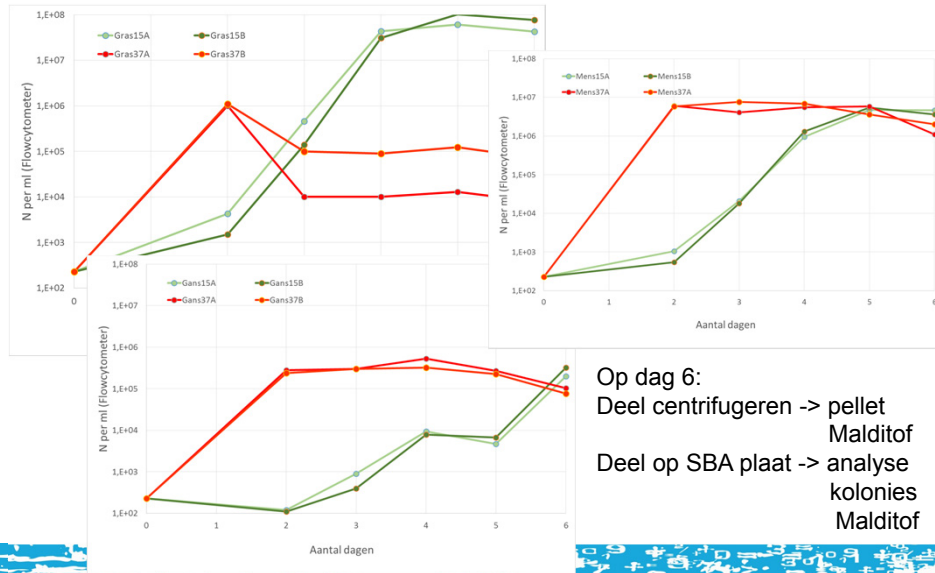


0,45 µm filter

Beënting van extracten met *Enterococcus moraviensis* (startconcentratie 228 kve/ml)

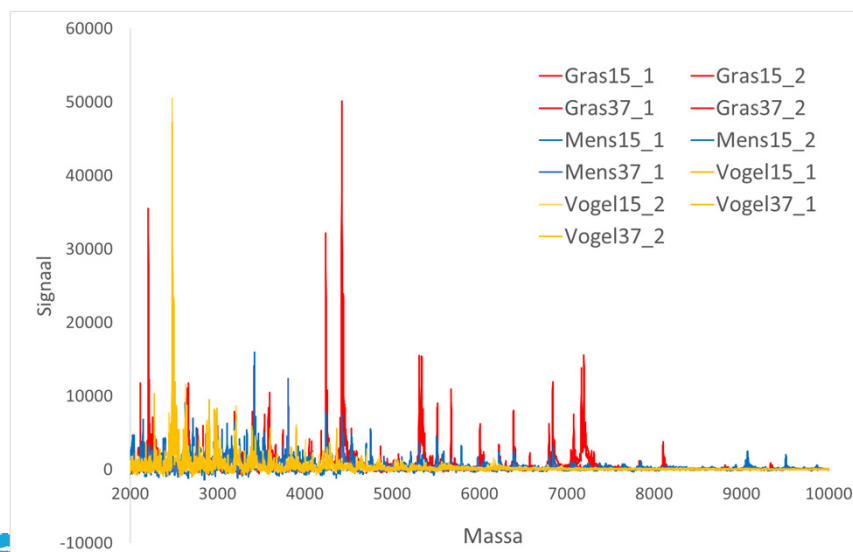
## Resultaten

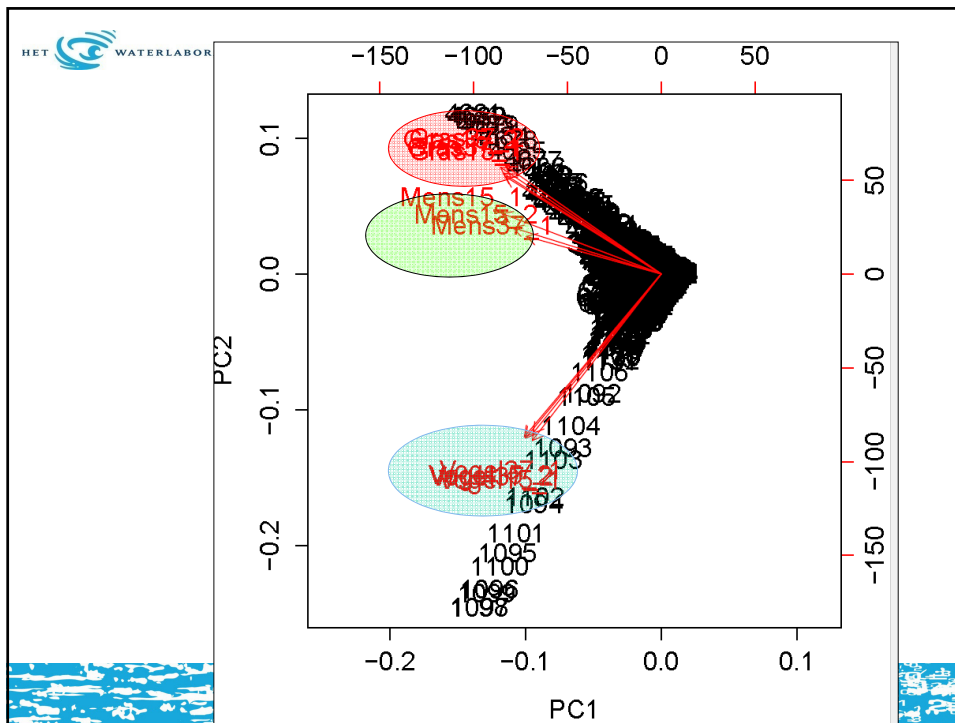
### Groei?



## Resultaten

### Pellet metingen





Voorgaande data evaluatie is op ruwe data (direct uit MALDITOF-MS).

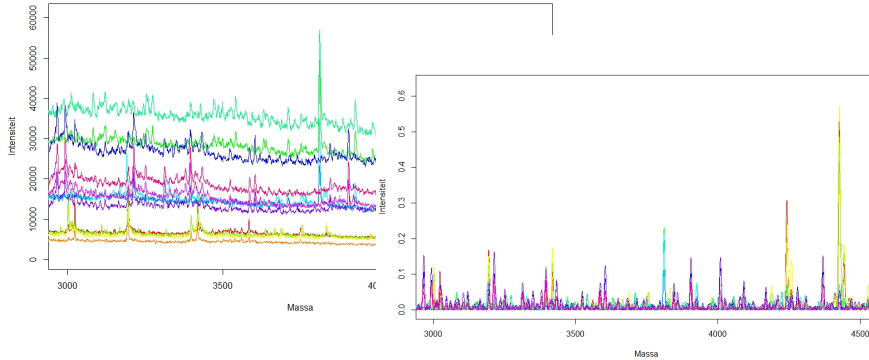
Voor 'proof of principle' nog:

- Evaluatie gegevens MALDITOF-MS (borging signaalverwerking/statistiek op basis van literatuur)
- Evaluatie verschillen in signaal zelf tussen pelletmetingen en SBA plaat (indicatie van de variatie in signaal)

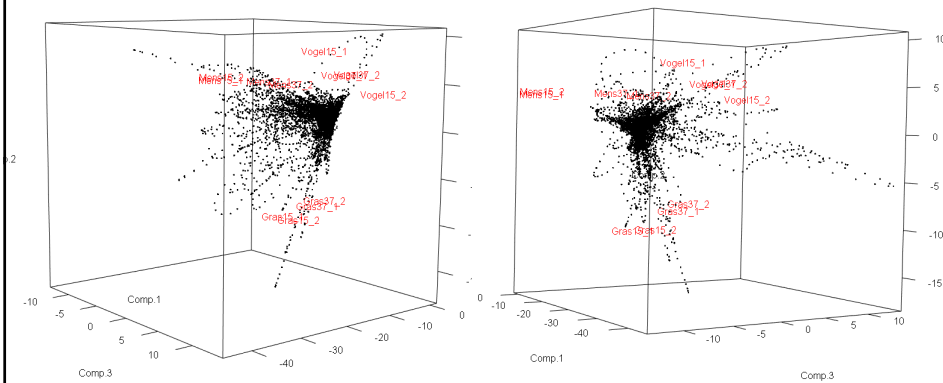
alvorens een methode mogelijk voorhanden is en er praktijkmetingen uitgevoerd kunnen worden.

Verwerking data uit MALDITOF-MS (originele bestanden uit Mald):

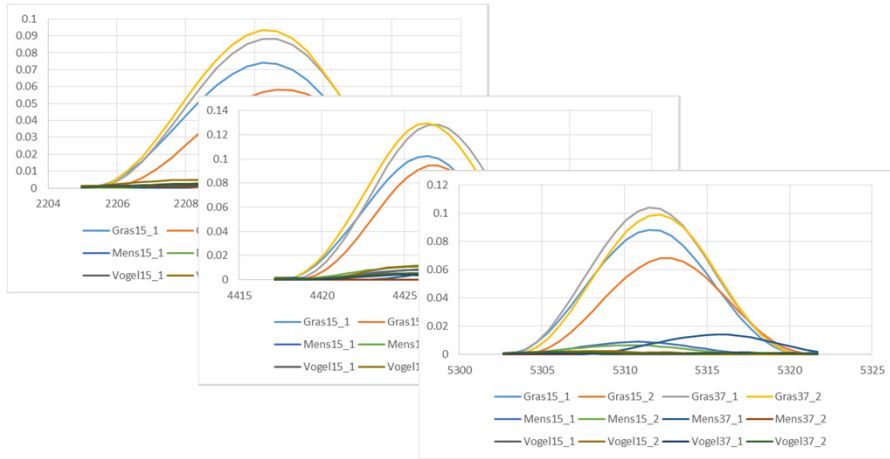
- Data werd ingelezen via MaldiQuant-pakket in R
- Data werd wortelgetransformeerd en 'gesmoothed'
- Baseline correctie, kalibratie intensiteit, uitlijnen spectra



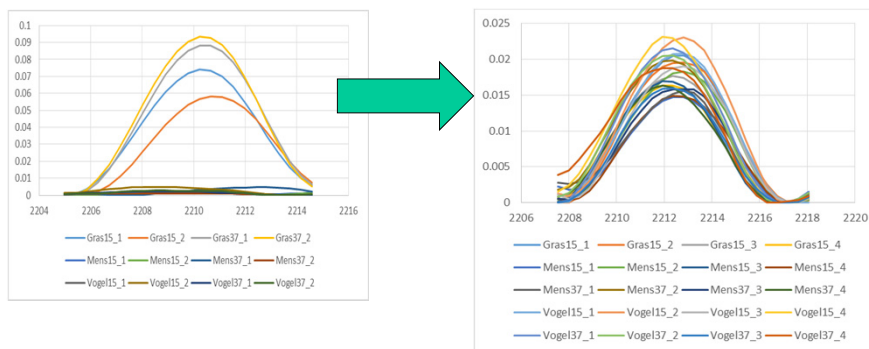
Data werden nog op massa 'gesynchroniseerd'  
Intensiteit signaal uit Mald bij type monsters -> PCA

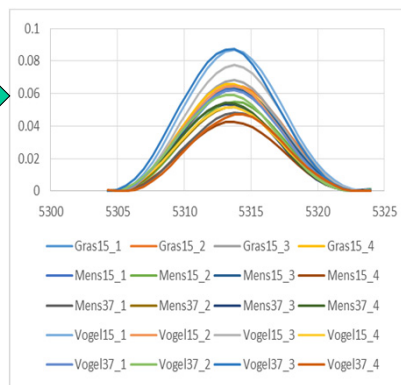
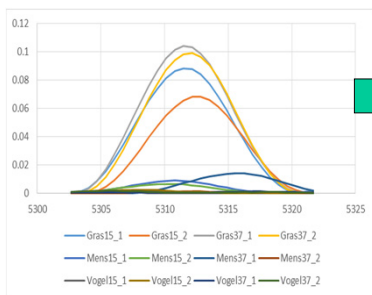
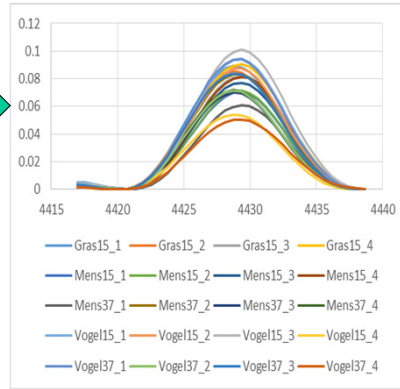
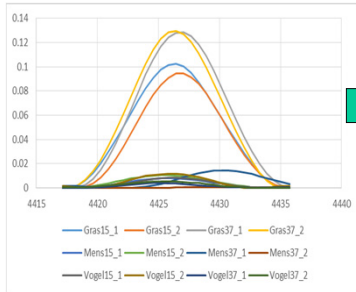


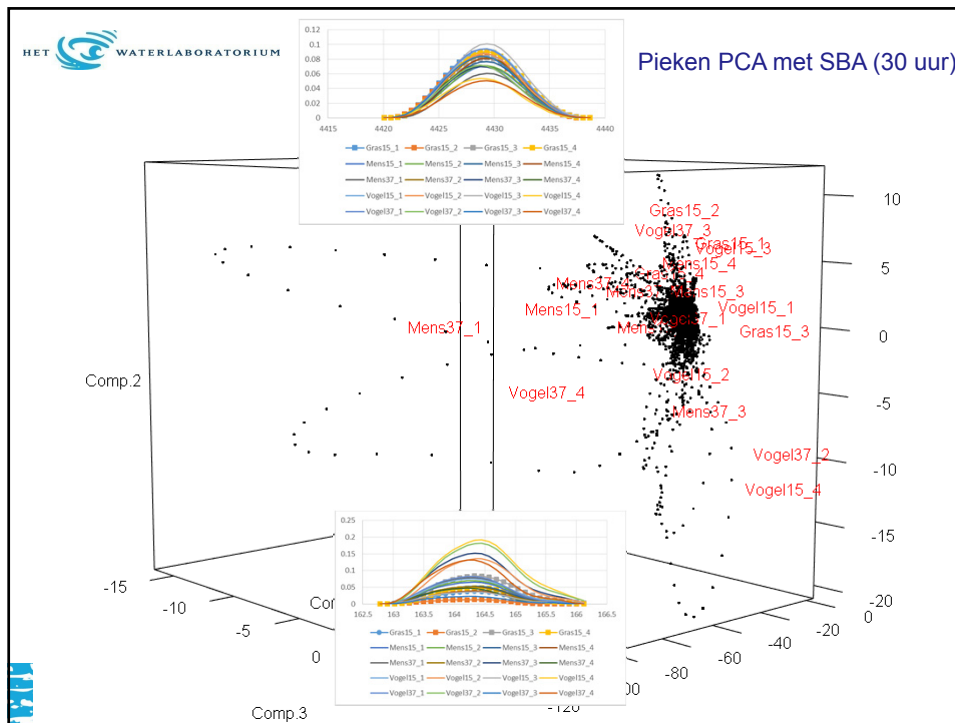
Pieken in pelletmetingen gras <-> mens,vogel



Pieken in metingen na kweek met SBA (30 uur)







HET WATERLABORATORIUM

Conclusies 'proof of principle'

Na evaluatie MALDITOF-MS spectra met MS analyse workflow:

- Er is onderscheid in *Enterococcus moraviensis* tijdens cultivatie in verschillende matrices (feces mens, feces vogel, gras) bij directe pelletmetingen met MALDITOF-MS.
- Dit onderscheid verdwijnt na een kweekfase op vaste SBA voedingsbodem
- Er geen ander kenmerk te vinden na de kweekfase op SBA voor onderscheid tussen verschillende matrices.

In relatie tot de praktijk, waarbij er **altijd** een ophopingsfase moet plaatsvinden om zo voldoende materiaal te krijgen voor de MALDITOF-MS analyse, heeft verdere MALDITOF-MS analyse van monsters na de SBA kweekfase, ter bepaling of er sprake is van een recente besmetting of een milieustam, geen zin (NOgo).

## Memo

Datum 9 december 2016  
Van Eric Penders, Sander Dijkstra  
Onderwerp MALDI-TOF-MS analyse ter discriminatie en karakterisering van milieustammen van enterococcon/*E. coli* versus enterische stammen.

### 1. Inleiding

In het kader van DPW onderzoek in 2015 is een project gestart (CCC - De Coli-Coccon Combinatie) met als rode draad het volgende microbiologische operationele knelpunt: in ieders winning/productie/distributie gebied komen periodiek ongewenste hoeveelheden coliformen en/ of enterococcon voor. Alle DPWE bedrijven hebben op verschillende fasen van de drinkwaterbereiding ervaringen met detectie, determinatie en bestrijding van de micro-organismen.

Bij constatering van een besmetting wordt de vraag gesteld of de besmetting direct afkomstig is van feces of dat de besmetting het gevolg is van nagroei of afkomstig is van een andere bron. Met deze aanvullende gegevens kunnen mogelijk betere maatregelen genomen worden. In de literatuur wordt al melding gemaakt dat er enterococcon aanwezig zijn in insecten (Martin & Mundt, 1972), op planten (Mundt, 1963a) en dieren (reptielen, vogels, warmbloedige dieren)(Mundt, 1963b). Daarbij zijn ook enkele chemische testtechnieken (zoals een litmusmelk test) ingezet om een onderscheid te kunnen maken of enterococcon direct vanuit feces van warmbloedige dieren afkomstig zijn of dat het enterococcon zijn die langdurig al in het milieu aanwezig waren en in staat waren te overleven. Recent zijn er ontwikkelingen die meer informatie bieden over de eigenschappen van de gemeten enterococcon waarbij min of meer met groeifactoren/eiwitten een cluster aangeduid kan worden waar de enterococcon vandaan komt (Weigand et al., 2014).

Met MALDI-TOF-MS is het mogelijk allerlei eiwitten in bacteriën te bepalen. In de huidige praktijk wordt met een database van Bruker (op basis van 70 eiwit- pieken die per bacteriesoort anders is) de bacteriesoorten benoemd. Met de eiwit-spectra verkregen uit MALDI-TOF-MS kan ook mogelijk een verdere evaluatie plaatsvinden, waarbij met behulp van multivariabele statistiek, clusters van eiwitten als *merker* bepaald kunnen worden waarmee onderscheid gemaakt kan worden tussen micro-organismen direct afkomstig van fecaliën of van een andere bron. Siegrist et al. (2007) en Giebel et al. (2008) presenteren gegevens waarin met de MALDI-TOF-MS een verdere karakterisering heeft plaatsgevonden van



milieustammen van *E.coli* en enterococcen. Tijdens het promotieonderzoek van Maja Taucer is gebleken dat *E. moraviensis* kan groeien op het plantenextract. In dit onderzoek wordt deze soort als model-organisme genomen in de 'proof of principle' fase.

De onderzoeksvragen die hieruit naar voren komen zijn:

### **Onderzoeksvragen**

- Is met MALDI-TOF-MS en met de gebruikelijke enterococ-methode met kweek, mogelijk onderscheid te maken tussen stammen die in het milieu een langere tijd (in)actief zijn of stammen die direct afkomstig zijn van fecaliën?
- Is met de MALDI-TOF-MS en met de gebruikelijke coliformen/*E.coli*-methode met kweek, mogelijk onderscheid te maken tussen stammen die in het milieu een langere tijd (in)actief zijn of stammen die direct afkomstig zijn van fecaliën?

## 2. Werkwijze 'Proof of principle'

### 2.1. Aanmaak extracten feces/gras

Een hoeveelheid bevroren helmgras (100,14 gram), geplukt vanuit het duingebied te Castricum (periode oktober 2014) wordt geplaatst in 2 liter steriel water afkomstig van pompstation Leiduin. Na 5 uur (ieder uur geroerd) is het extract gefiltreerd door een 0,22 µm filter en gesteriliseerd bij 121 °C gedurende 15 minuten.

Eenzelfde bewerking vindt ook plaats bij 40,68 gram verse ganzenfeces (grouwe gans). Feces van de mens (23,37 gram) kon na 5 uur in water niet gefiltreerd worden door 0,22 of 0,45 µm filter. Het extract is gesteriliseerd.

Bij de extracten van de menselijke feces en gansfeces, vindt er een centrifugestap plaats (5 minuten bij 14200 rpm), waarbij het supernatant wordt verzameld in AOC-vrije kolven (200 ml per kolf). Bij het grasextract is deze handeling niet nodig gebleken. Na de centrifugatie van het grasextract is er geen pellet aanwezig.

Ter controle op steriliteit is vanuit de kolven 10 ml monster genomen en op TSA plaat beënt. Na 24 uur is bij 37 °C bij een aantal platen een kolonie te zien. Daartoe zijn alle extracten in de kolven nog eens gepasteuriseerd bij 60 °C gedurende 30 minuten.

### 2.2. Kweekfase

Vanuit een entflesje met *Enterococcus moraviensis* (controle met MALDI-TOF-MS, gaf geen andere soort aan) is 2 ml in alle kolven gepipetteerd. De startconcentratie in extracten is 228 kve/ml.

Twee kolven van elk type extract worden geplaatst in de broedstoof bij 15 en 37 °C. Dagelijks werd steriel een monster genomen en met behulp van kweek op SBA medium (48 uur; 37 °C) de concentratie aan micro-organismen bepaald.

### 2.3. MALDI-TOF-MS analyse en dataverwerking

In het onderzoek is na 6 dagen kweek, uit een verdunning van de kweek (gekozen om 10-100 kolonies op een plaat te verkrijgen) 100µl op een SBA plaat geënt en 5 ml van een kweek in een steriel epje gepipetteerd.

Ten aanzien van pellet metingen wordt het epje gecentrifugeerd gedurende 10 minuten bij 13500 rpm. Het supernatant wordt verwijderd en de pellet wordt voorzien van 1 ml steriel MilliQ water. Na vortexen wordt het epje nogmaals 10 minuten gecentrifugeerd waarna al het supernatant wordt verwijderd (met een pipet). Vervolgens wordt de pellet opgelost in 50µl

stock oplossing (Acetonitrile 50%, water 47,5%, and 2,5% Trifluoroacetic acid; Sigma Aldrich). Van deze oplossing wordt 1µl op een positie van de targetplaat van de MALDI-TOF-MS gepipetteerd en na drogen bedekt met 1µl matrix (HCCA-matrix (2,5 mg 2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid opgelost in 250µl stock opl.; Bruker).

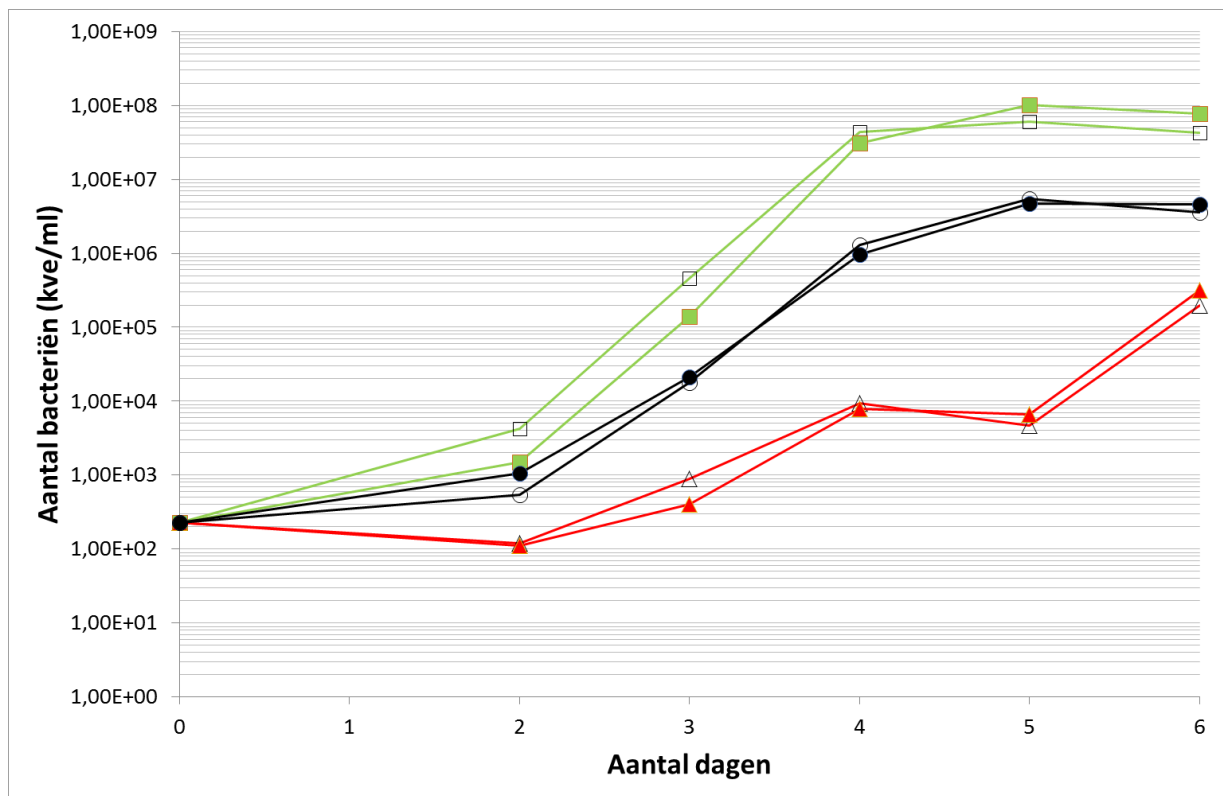
Ten aanzien van MALDI-TOF-MS metingen van kolonies afkomstig van de SBA plaat wordt uitgevoerd conform het HWL voorschrift AVS-MALDI-TOF (HWL, 2014). Metingen worden uitgevoerd met een Microflex Massaspectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Duitsland) met gebruik van FlexControl software (versie 2). De spectra worden opgenomen in de positieve lineaire modus (laser frequentie, 60 Hz; ionbron 1 voltage, 20.0 kV; ionbron 2 voltage, 16.7 kV; lens voltage, 7.0 kV; range massa, 0-20000 Da). Voor kalibratie wordt de Bruker eiwit kalibratie standaard (BTS) gebruikt. Op zijn minst worden 240 individuele laserschietingen gedaan tot het verkrijgen van een goed spectrum.

Vanuit de ruwe data van de MALDI-TOF-MS wordt met de MALDIquant module (Gibb en Strimmer, 2012) in het statistiekpakket R, de data ingelezen en gecontroleerd of er voldoende signaal aanwezig was. De signalen in de spectra worden wortel-getransformeerd, en 'gesmoothed' middels de SavitzkyGolay methode met halfwindowsize 10. Het wiskundig SavitzkyGolay filter maakt het oorspronkelijke signaal "gladder", d.w.z. vlakt snelle wisselingen af, waardoor ruis wordt uitgefilterd (Savitzky en Golay, 1964). Daarna vindt er een basislijn correctie plaats volgens de SNIP (Statistics-sensitive Non-linear Iterative Peak-clipping algorithm) methode (Ryan et al., 1988). Voor normalisatie van de spectra onderling worden ze genormaliseerd (TIC (Total Ion Current) methode, Dieterle et al., 2006). Daarna zijn de pieken in de verschillende spectra uitgelijnd via alignSpectra. De statische evaluatie van de signalen uit de spectra vindt plaats via multivariabele statistiek (princiële component analyse) in R.

### 3. Resultaten

#### 3.1. Kweek

De resultaten van de groei van *Enterococcus moraviensis* bij 15 °C in de drie verschillende extracten zijn weergegeven in Figuur 1.

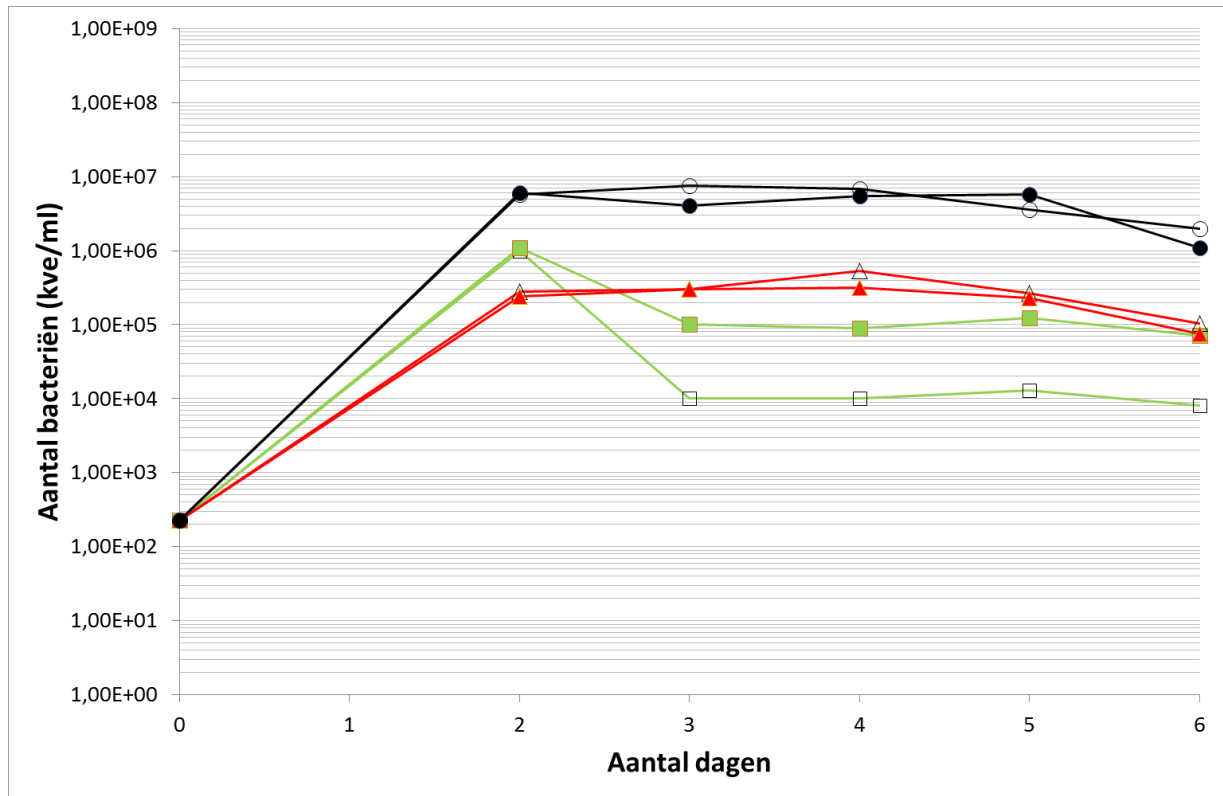


Figuur 1. Groei van *Enterococcus moraviensis* in extract van gras (□—■), extract feces mens (○—●) en extract feces gans (△—▲) bij 15 °C.

De extracten werden ook bij 37 °C gekweekt. De resultaten van groei zijn weergegeven in Figuur 2.

Bij 15 °C groeit *Enterococcus moraviensis* het beste op het extract van gras gevolgd door extract feces mens en gans. Na 5 dagen wordt er een optimum bereikt bij gras en mens terwijl bij gans dit 1 dag later het geval is. Bij 37 °C is de optimum van groei eerder bereikt. Na 2 dagen al is *Enterococcus moraviensis* aanwezig in alle extracten met een concentratie tussen

de  $10^5$  tot  $10^7$  kve/ml. Voor verder onderzoek met de MALDI-TOF-MS ten aanzien van pelletmetingen en na kweekfase op vaste SBA bodem, wordt op dag 6 materiaal genomen vanuit de kweek.



Figuur 2. Groei van *Enterococcus moraviensis* in extract van gras (□—■—), extract feces mens (○—●—) en extract feces gans (△—▲—) bij 37 °C.

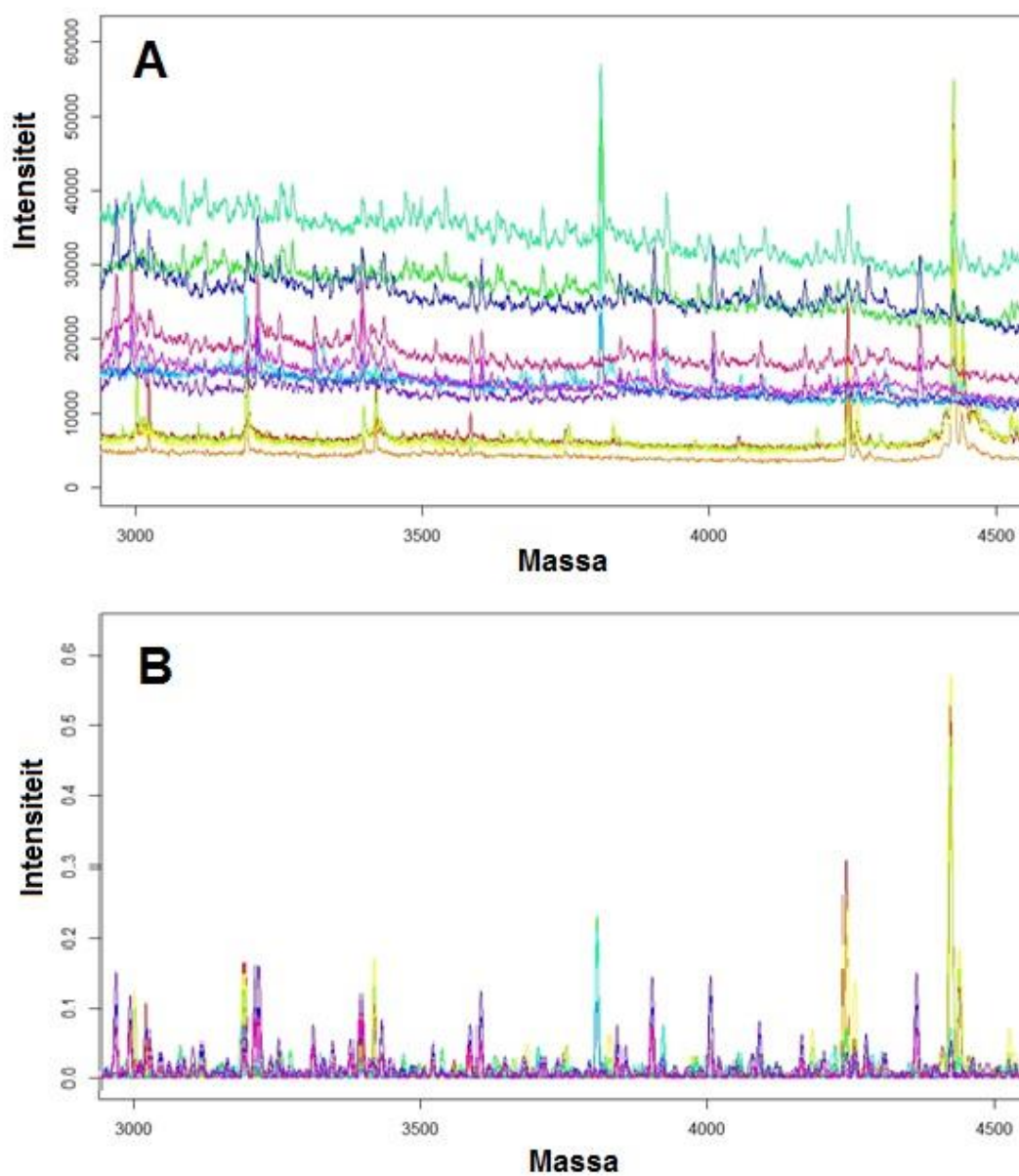
### 3.2. MALDI-TOF-MS metingen van pellets

Vanuit de MALDI-TOF-MS worden de ruwe datagegevens verkregen zoals aangegeven in Figuur 3A. In Figuur 3A is duidelijk waarneembaar dat verdere dataverwerking moet plaatsvinden om data te verkrijgen waarmee een vergelijk onderling mogelijk wordt. Na worteltransformatie van het signaal, 'smoothing', basislijn correctie, intensiteit calibratie en piekuitlijning zijn de gegevens (Figuur 3B) meer geschikt om multivariabele statistiek uit te voeren. Het aantal data dat per spectrum wordt verkregen (zo'n 30400) maakt het moeilijk om in de spectra zelf meteen te zoeken naar de verschillen tussen de extracten. Via de principiële component analyse via R is dit makkelijker en worden correlaties tussen de verschillende signalen vanuit de extract metingen bepaald en weergegeven in één figuur (Figuur 4). Wanneer er tussen de 6 extractmetingen een correlatie bestaat, is die weergegeven als een

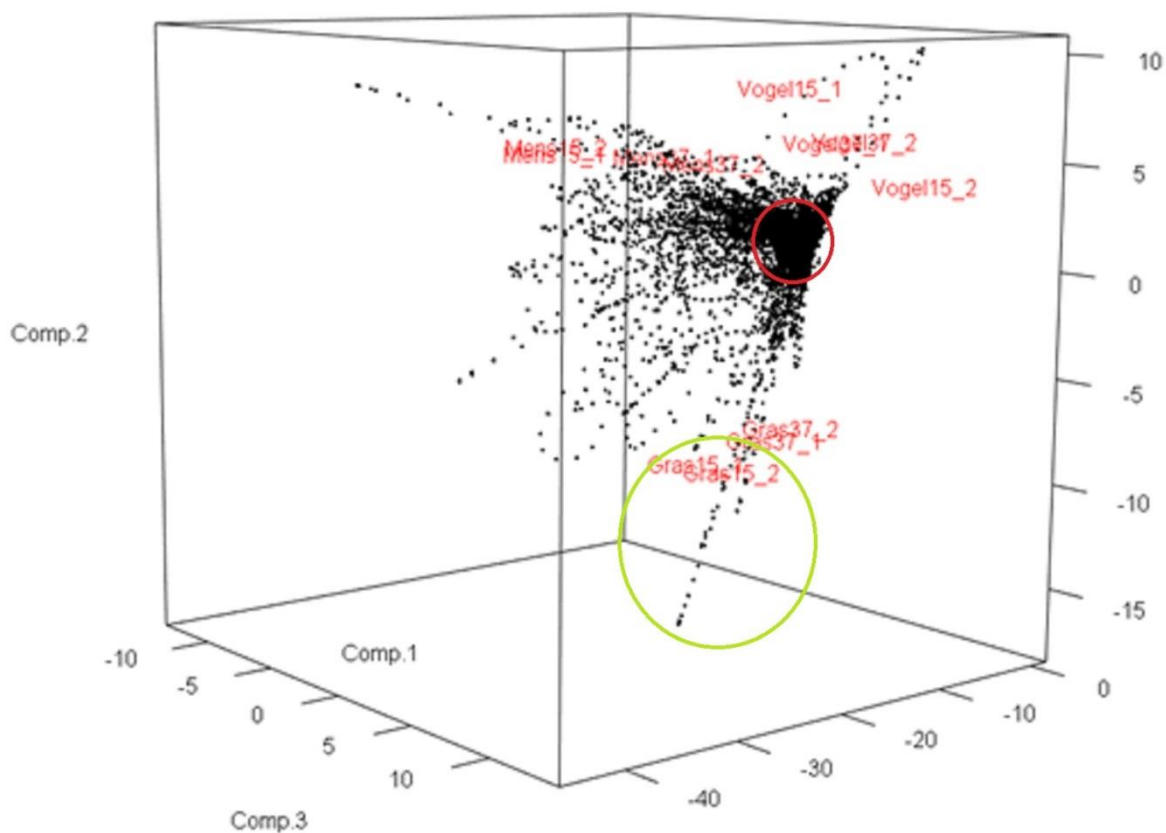
puntenwolk zoals aangegeven in rode cirkel in Figuur 4. De metingen die niet echt correleren met elkaar gaan vanuit deze puntenwolk naar buiten. Als totaal worden de type extracten (gras, feces mens, feces gans bij 2 temperaturen) onderling in de statistische ruimte geplaatst (rode benamingen in Figuur 4). Indien er een correlatie van een piek signaal bestaat met het soort extract, zijn de punten in het gebied waar het kenmerk van het extract zijn aangegeven. Als voorbeeld zijn de punten in groene cirkel in Figuur 4 eerder gecorreleerd naar grasextract dan bij de andere extracten.

Vanuit de principiële component analyse zijn in Figuur 5 de pieken aangegeven die wel voorkomen bij pellets van *Enterococcus moraviensis* vanuit grasextract maar niet bij de twee andere soorten extracten (A,B,C). Ook is er bijvoorbeeld een piek die alleen voorkomt bij het gansfeces extract en niet bij het grasextract (D).

Met MALDI-TOF-MS spectra worden dus pieken waargenomen die uniek zijn voor *Enterococcus moraviensis* als pellet verkregen na de kweek in de verschillende extracten.

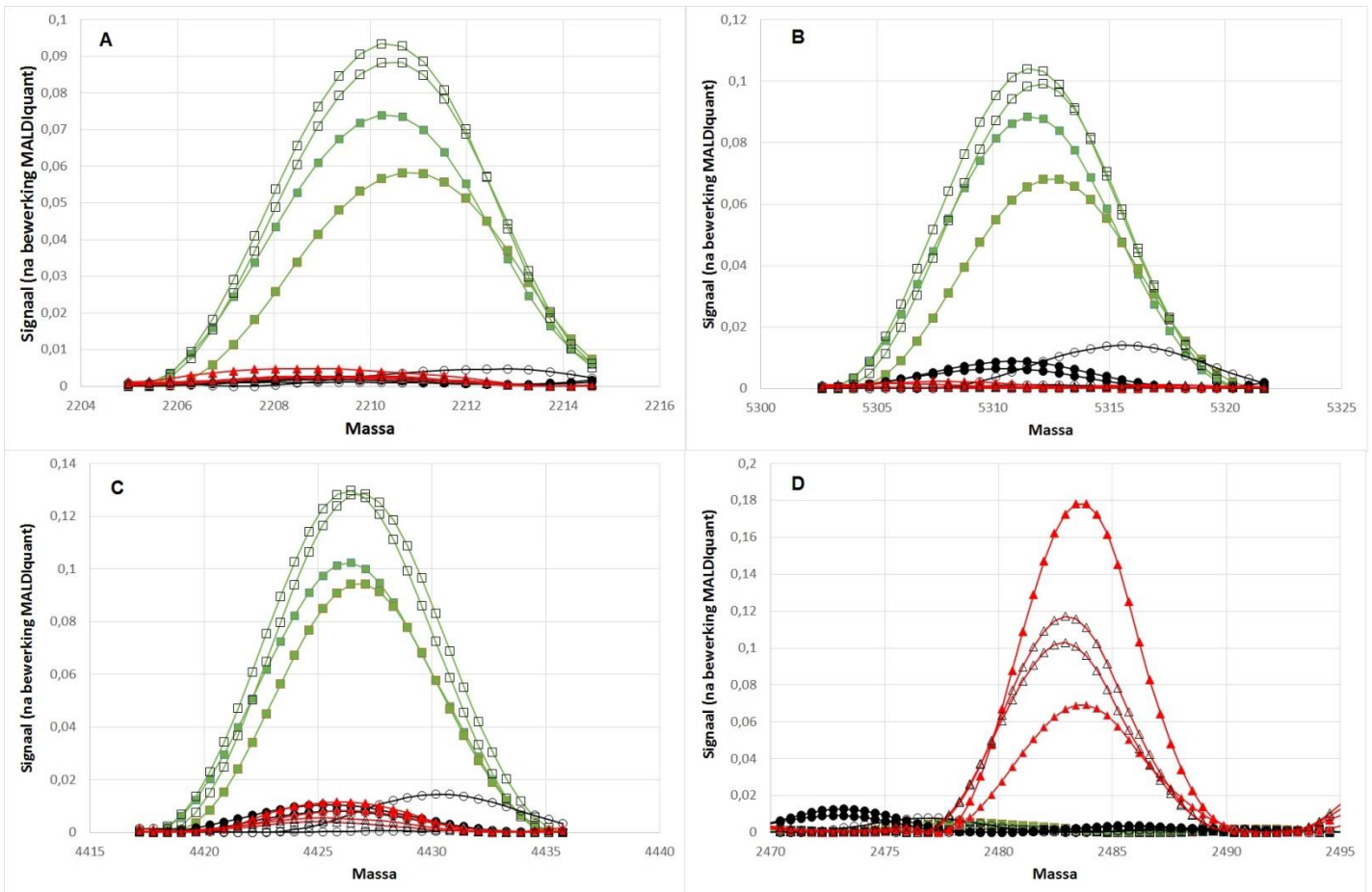


Figuur 3. Spectra van pellet metingen vanuit de MALDI-TOF-MS, ruwe data (A) en data (B) na bewerking in MALDIQuant (worteltransformatie signaal, 'smoothing', basislijn correctie, intensiteitscalibratie en uitlijning pieken) nodig voor verdere multivariabele statistiek.



Figuur 4. 3D weergave principiële component analyse (PCA) in R met spectra MALDI-TOF-MS uit pelletmetingen. De rode cirkel geeft aan dat data in spectra met elkaar correleren. De groene cirkel geeft aan dat hier data (pieken) zitten die een hogere correlatie kent met alleen het grasextract dan met mens of vogel.





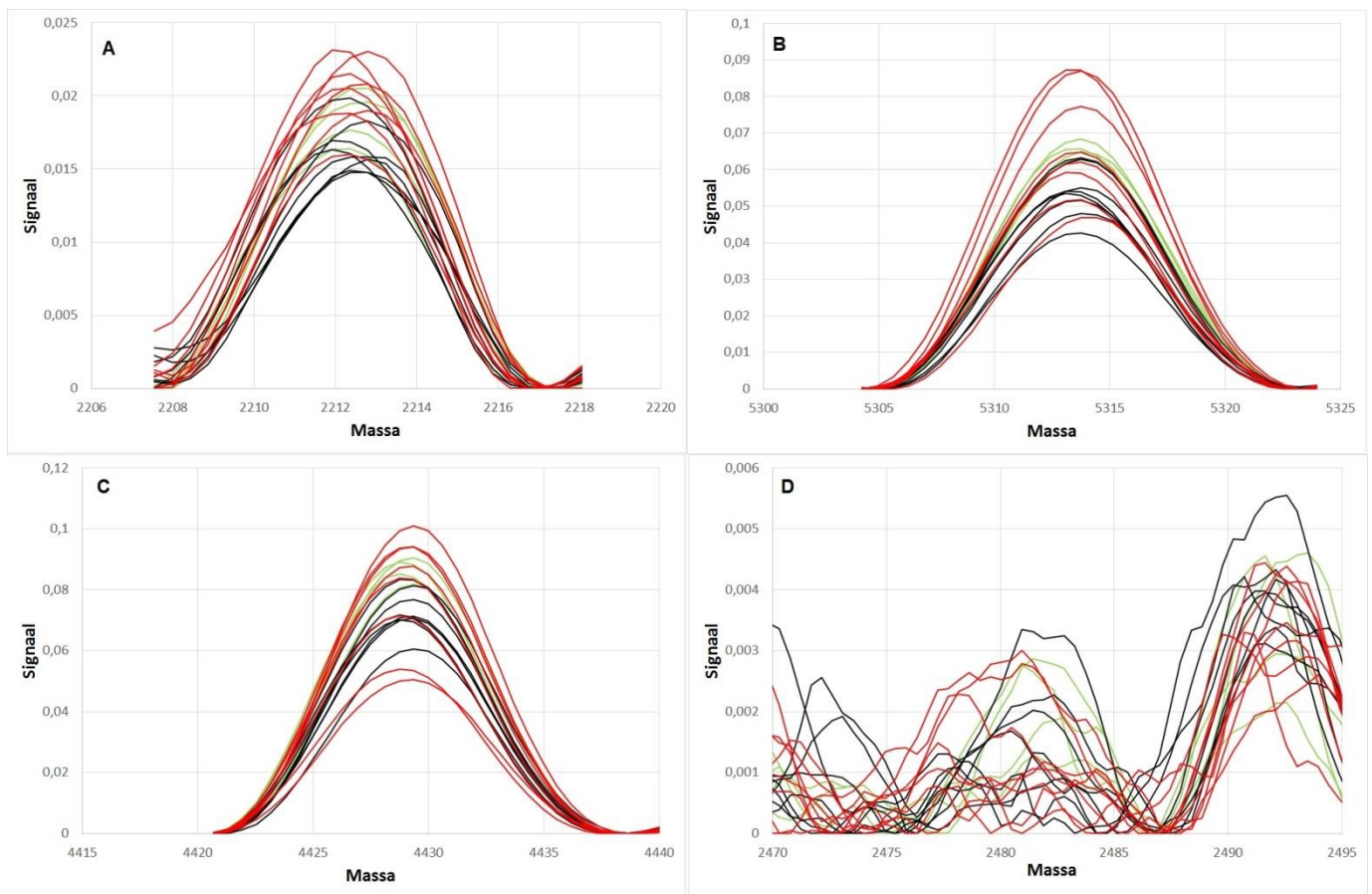
Figuur 5. Pieken in MALDI-TOF-MS spectra (duplo-meting) uit pelletmetingen die volgens principiële component analyse naar voren kwamen als een unieke eigenschap voor *Enterococcus moraviensis* in grasextract (A,B,C) en uniek voor *Enterococcus moraviensis* in feces extract uit gans (D).

Legenda: *Enterococcus moraviensis* in extract van gras (□—■), extract feces mens (○—●) en extract feces gans (△—▲).

Bij de gesloten symbolen is de kweektemperatuur 15 °C, open symbolen 37 °C.

### 3.3. MALDI-TOF-MS metingen van kolonies na SBA kweekfase

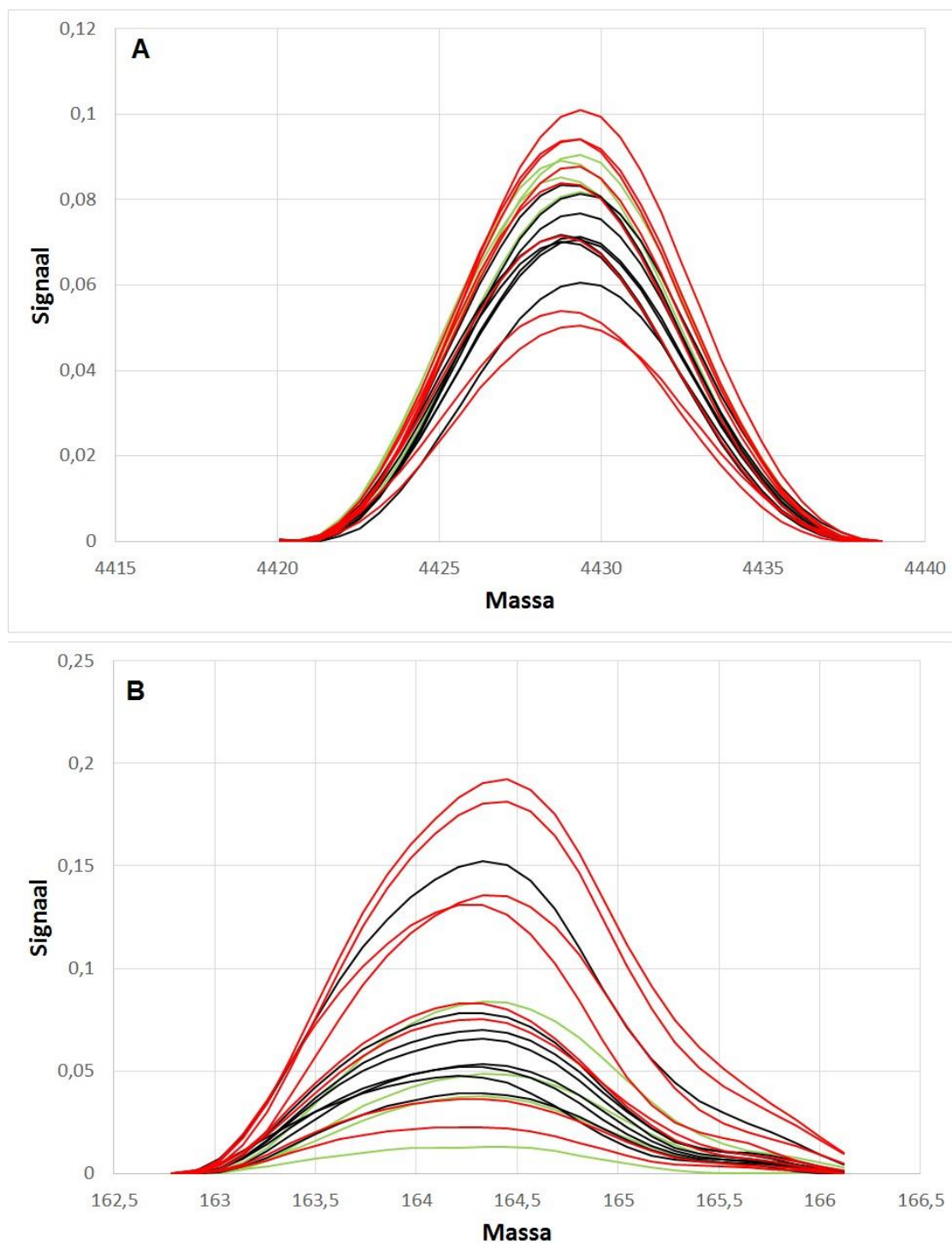
Vanuit de kweek van *Enterococcus moraviensis* in het grasextract, extract feces mens en gans, werd een hoeveelheid gepipetteerd op afzonderlijke SBA platen. In Figuur 6 worden de gegevens gepresenteerd van MALDI-TOF-MS spectra van de kolonies op de SBA platen na incubatie van 30 uur. Daarbij zijn de pieken geselecteerd op die massa's die in de pelletmetingen als uniek zijn benoemd voor *Enterococcus moraviensis* gegroeid op grasextract (A,B,C) en extract feces gans (D).



Figuur 6. MALDI-TOF-MS spectra kolonies na SBA kweekfase van monsters uit kweek grasextract (groen), extract feces mens (zwart) en feces gans (rood). Geselecteerde massa's zijn gelijk als Figuur 5.

De gegevens laten duidelijk zien dat er geen onderscheid meer is van pieken na de kweekfase met SBA in tegenstelling tot eerdere pelletmetingen. De gegevens van MALDI-TOF-MS spectra van kolonies op SBA plaat zijn ook hier verder beoordeeld met principiële component analyse (Figuur 7).





Figuur 8: MALDI-TOF-MS spectra kolonies na SBA kweekfase van monsters uit kweek grasextract (groen), extract feces mens (zwart) en feces gans (rood). A: Graskant PCA, B: Vogelkant PCA.

## 4. Conclusies

Na evaluatie van de verkregen MALDI-TOF-MS spectra met de MS analyse workflow:

- Er is onderscheid in *Enterococcus moraviensis* tijdens cultivatie in verschillende matrices (feces mens, feces vogel, gras) bij directe pelletmetingen met MALDI-TOF-MS waarbij bepaalde pieken aan massa's in het spectrum kunnen fungeren als merker.
- Dit onderscheid en de merkers verdwijnen na een kweekfase op vaste SBA voedingsbodem.
- Er is geen ander kenmerk te vinden in de MALDI-TOF-MS spectra na de kweekfase op SBA voor onderscheid van *Enterococcus moraviensis* tussen de verschillende matrices.

In relatie tot de praktijk, waarbij er altijd een ophopingsfase moet plaatsvinden om zo voldoende materiaal te krijgen om de MALDI-TOF-MS analyse te kunnen uitvoeren, is verdere MALDI-TOF-MS analyse van monsters na de SBA kweekfase, ter bepaling of er sprake is van een recente besmetting of een milieustam, niet mogelijk.

Vanuit de 'proof of principle' fase zal dit niet alleen gelden voor de enterococcen maar vermoedelijk ook voor de gebruikelijke coliformen/*E.coli*-methode met kweek.

## Literatuur

Dieterle F., A. Ross, G. Schlotterbeck, and Hans Senn (2006) Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in <sup>1</sup>H NMR metabonomics. *Analytical Chemistry* 78(13): 4281-4290.

Gibb S. and K. Strimmer. 2012. MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. *Bioinformatics* 28: 2270-2271 (arXiv:1203.5885)

Giebel, R. A., Fredenberg, W., & Sandrin, T. R. (2008). Characterization of environmental isolates of *Enterococcus* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Water research*, 42(4), 931-940.

HWL (2014) AVS-MALDI-TOF. Identificatie/Bevestiging met behulp van de MALDI-TOF techniek.

HWL (2015) AVS-DCT-FCM. De directe bepaling van het totale aantal cellen en het aantal levende cellen in water en suspensies met behulp van flowcytometrie.

Martin, J.D., Mundt, J. O. (1972) Enterococci in insects. *Applied microbiology*, 24.4: 575-580.

Mundt, J. O. (1963a) Occurrence of enterococci on plants in a wild environment. *Applied microbiology* 11.2: 141-144.

Mundt, J. O (1963b). Occurrence of enterococci in animals in a wild environment. *Applied microbiology* 11.2: 136-140.

Ryan G. , E. Clayton, W.L. Griffin, S.H. Sie, and D.R. Cousens (1988) Snip, a statistics-sensitive background treatment for the quantitative analysis of pxe spectra in geoscience applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 34(3): 396-402.

Savitzky A. and M.J.E. Golay (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*, 36(8): 1627-1964

Siegrist, T. J., Anderson, P. D., Huen, W. H., Kleinheinz, G. T., McDermott, C. M., & Sandrin, T. R. (2007). Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Journal of microbiological methods*, 68(3), 554-562.

Weigand, M. R., Ashbolt, N. J., Konstantinidis, K. T., & Santo Domingo, J. W. (2014). Genome sequencing reveals the environmental origin of enterococci and potential biomarkers for water quality monitoring. *Environmental science & technology*, 48(7), 3707-3714.

## **DPWE Enquête Coli-Coccen combinatie**

Beste Bernadette, Jos, Jos, Jamal

Een van de vraagstellingen was: "kunnen we als DPWEO bedrijven overeenstemming bereiken over het in- en uitbedrijf nemen van bedrijfsonderdelen" in de Winning, Zuivering of Distributie. Met andere woorden, welke procedure wordt gevolgd bij het in of uit bedrijf stellen van een proces onderdeel. Om een vergelijking te kunnen maken is middels een enquête onderzocht hoe dit bij de verschillende bedrijven en wellicht bij verschillende zuiveringen wordt toegepast. Jullie deden mee in het groepje "zuivering"

Deze notitie is een rapportage van de bevindingen. Het goede nieuws is dat we elkaar niet veel ontlopen! Uiteindelijk komen de belangrijkste verschillen neer op de norm-aantallen coliformen die worden gehanteerd voor het in- of uit bedrijf stellen van procesonderdelen bij groot volume monster de marges lopen hier uiteen tussen de 1-10/100L voor die soorten die als niet intestinaal worden beschouwd. Bij de wettelijk volumes (100ml) op alle soorten (coli37, coliformen en enterococcen) en de GV monsters voor (coli37 en Enterococcen) zijn wij allen even streng : 1 (één) is te veel.

Ik heb in onderstaande tabel een overzicht gemaakt van de algemene handelswijze en op onderdelen vermeld waar de verschillen liggen. Tevens worden de reacties van ieder bedrijf toegevoegd zodat jullie elkaars reactie ook specifiek kunnen inzien.

Als jullie nog wijzigingen of correctie zien, geef ze door.

Ik neem dit mee naar de begeleidingsgroep om te kijken of er op één lijn kunnen komen.

### **Opmerking**

- In de omschrijving worden Coliformen en coli 37 door elkaar gebruikt. Het betreft hier een en dezelfde parameter.
- Onder E.coli wordt verstaan: na typering als E.coli
- Onder herbemonstering wordt verstaan : monsternamen na ca 24 uur na vorige monsternamen

Groeten,

Leon



Naam	Bernadette, Jos, Jos, Jamal
Bedrijf	<b>Dunea, PWN, Waternet, Oasen</b>
Deze beschrijving is gemaakt voor	Alle zuiveringen / een specifiek onderdeel
Welke (bedrijfs)norm / (grens)waarde wordt gehanteerd bij het uit bedrijf nemen van een proces onderdeel (dit onderdeel levert daarna geen direct levering aan de drinkwatervoorziening?)	<p>DPW beperken zicht in de beantwoording tot Coliformen (Coli-37°C), E. Coli en Enterococcen. Oasen noemt ook SSRC, C.perf. en Coli-44.</p> <p>Allen hanteren de harde grens van &gt;0 voor E.coli en enterococcen bij volumes van 100 ml en groter (1, 10, 100L). De verschillen liggen bij de coliformen (37oC) (zie volgende kolom).</p> <p>Allen maken onderscheid voor in-/uit bedrijf name naarmate de zuiveringsingonderdelen meer richting het einde van zuivering gaan cq het passeren van de hoofdesinfectie.</p> <p><b>Verschillen per bedrijf</b> Dunea en Waternet melden naast directe productie ook waarden voor deelstomen/retourstromen</p> <p><b>Dunea</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nieuwe winningen &lt; 10/100 L</li> <li>- Voor de LZF's coli &lt; 10/1 L</li> <li>- Na de LZF's coli &lt; 10/100 L</li> </ul> <p>- LZF retour grenswaarden:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- E.coli + entercoc &lt; 10/100L</li> <li>- Coliformen(coli-37)&lt;100/100L</li> </ul> <p><b>PWN</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Geen grenswaarden genoemd</li> </ul> <p><b>Waternet</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bij de LZF &gt; 0 kve/100ml, of &gt; 4 kve/100L</li> <li>- Bij efluent dynasand &gt; 5 kve/L (in verband met de waarnemingen vanuit Loenen)</li> </ul> <p><b>Oasen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ook toetsing op SSRC, C.perf. en Coli-44</li> <li>- Bemonstering in 100 ml monsters</li> </ul> <p>Oasen maakt een aantekening dat bij normoverschrijding in een zuiveringsonderdeel wordt verder gezocht en dat bij een overschrijding in een verzamelstroom wordt opgeschaald naar de crisis organisatie. Verwacht wordt dat dit voor alle bedrijven geldt.</p>

Maak je hierbij onderscheid naar E.coli, coliformen, enterococcen?	Allen maken onderscheid naar E.coli/Enterococcen (>0) en Coliformen. Bij coliformen >1 kan een procesonderdeel soms in bedrijf worden gehouden
Als de (grens)waarde bij bovenstaande vraag groter is dan 0 (nul), wat is de overweging om een onderdeel door te laten lopen en niet direct uit bedrijf te nemen?	Een onderdeel blijft in bedrijf als dit niet uit bedrijf kan worden genomen, bv een pompstation, dus wanneer de leveringszekerheid in gevaar komt.  Voor retourstromen (LZF / Dynasand) gelden hogere normen omdat de stroom de zuivering op een eerder punt wordt geretourneerd.
Welk monstervolume wordt hierbij gebruikt?	DPW : wettelijk 100 mL of 100 L en Oasen : wettelijk 100 ml, bij uitzondering 20 L  Bij allen geldt dat bij 2 opeenvolgende goede monsters het procesonderdeel weer in productie wordt genomen .
Wordt bewust met klein volume of groot volume metingen gewerkt?	Ja er wordt bewust gekozen voor groot volume om op tijd een besmetting te zien of het achtergrond-signaal te weten en daarop actie ondernemen kan worden zodat minder kans bestaat op een wettelijke overschrijding.
Wordt het proces onderdeel "behandeld" (leeg maken en desinfecteren) of wordt gewacht (bij filters) tot de patient is "uitgeziekt"?	<b>Spoelen en wachten</b> Meestal wordt een zuiveringsonderdeel niet direct behandeld. (zand) Filters worden door spoelen en afwachten off-productie gezet (op de sloot)  <b>Spuien , (chloren), bemonsteren</b> (kleine) kelder worden eerder uit bedrijf genomen en gereinigd met chloor. Stilstand wordt voorkomen door onderdelen op eerste filtraat of spoelen te zetten.
Welke strategie wordt gehanteerd om het verlies aan zuiveringscapaciteit op te vangen bij buiten dienst stellen van proces onderdelen?	De zuiveringen hebben overcapaciteit waarmee de eerste nood wordt geledigd. Inkoop bij collega's is een alternatief indien capaciteit te kort schiet
Indien de totale levering van de totale zuivering in het gedrang komt, is het een overweging om chloor te doseren aan het drinkwater of gaat de zuivering dan in capaciteit terug. (liever géén water dan chloorwater)	Chloor dosering staat overal achter aan de lijst met maatregelen. Maatregelen die genomen zullen worden zijn: - Inkopen bij collega bedrijven - Desinfectie dosering (O <sub>3</sub> ) verhogen - Kookadvies - Lagere druk "Liever chloorwater (rampscenario) dan geen water"
Welke monitoring / bemonsterings strategie wordt gehanteerd om de afwijken onderdeel te monitoren?	Alle bedrijven zetten in op herhalingsmonster. Om de oorzaak te vinden worden toevoer/afvoer bemonsterd. Afhankelijk van niveau/plaats in de zuivering wordt direct of na herhaling (Oasen) overgegaan op Groot Volume metingen (1-20-100 L monsters).

<p>Indien het betreffende proces onderdeel weer aan de beterende hand is, welk criterium wordt gehanteerd om het weer volledig in bedrijf te zetten?</p>	<p>Oasen geeft hier een mooi compleet antwoord die de lading van alle bedrijven dekt:  <i>"2 goede opeenvolgende bacteriologische monsters. Vaak zijn dit 2x 100 ml. Maar als GV monsters erbij betrokken zijn dan moeten deze ook goed zijn.</i>  <i>De discussie loopt wel of het aantreffen van lage concentraties coliformen (1 of 2 in GV monster) of we dan wel gelijk moeten handelen als bij 100 ml. Of dat enkel coli niet duidt op een fecale besmetting maar wel op een afwijkende waterkwaliteit. Dit geldt ook voor niet-intestinale enterococconen. Intestinale enterococconen en E. coli worden in geen geval geaccepteerd in klein en groot volume monsters."</i></p> <p><b>Verschillen per bedrijf</b>  Ook hier zien we weer een verschil in niveau tussen de bedrijven, zoals ook bij de eerste vraag beantwoord. Voor Coliformen worden dus verschillen in grens gezien aan het einde van de zuivering</p> <p><b>Dunea</b> : &lt; 10/100 L  <b>PWN</b> : 1-3 keer schoon (in GV?) maar maakt een aantekening dat bij uitzondering op de zandfilters wordt gemaakt als er geen aanleiding lijkt te zijn  <b>Waternet</b> : &lt; 5/100L  <b>Oasen</b> : 1-2 / 20L</p>
<p>Wordt hier dezelfde grenswaarde gehanteerd als hierboven eerder genoemd?</p>	<p>ja</p>
<p>Indien een andere waarde wordt genoemd, wat is hiervoor de reden?</p>	<p><b>Dunea</b> : -  <b>PWN</b> : Sommige procesonderdelen zoals na de zandfilters en winstrangen kunnen erg fluctueren in aantallen indicator organismen. Hier kiezen wij ervoor dat meer dan 1 keer geen indicator wordt gemeten om te voorkomen dat na bijzetten snel erna het procesonderdeel weer uit bedrijf genomen moet worden.  <b>Waternet</b> : -  <b>Oasen</b> : Discussie loopt voor coliformen en niet-intestinale enterococconen.</p>
<p>Wordt een proces onderdeel ook weer in bedrijf genomen als de waarde wel groter is dan 0, maar het verwachte totaal (agv verdunning, bv bij meerdere filters) onder de detectiegrens uit zal komen?  Bv. Uit een filter komt 2 kve/100L, er zijn 10 filters, dus we verwachten geen hits op het verzamelde water.</p>	<p><b>Dunea</b> : -  <b>PWN</b> : Nee, behalve deze zomer bij coliformen van de zandfilters. We kunnen daarbij geen aanleiding en oorzaak vinden. Dit wordt volgend jaar verder onderzocht of wij hier de oorzaak van kunnen vinden.  <b>Waternet</b>: Ja, hoewel er (volgens ondergetekende) naar aanleiding van recent groot volume bevindingen na krabben van LZF de norm aangescherpt kan worden tot &gt; 0 kve/100L. LZF filters hebben na krabben een doorspoeling tijd nodig en inlooptijd. Is (nu) vermoedelijk langer dan als er wordt gewerkt. (In onderzoek).  <b>Oasen</b> : Nee, niet op basis van pakkans. Mogelijk wel op basis van risico-inschatting. Discussie zoals hierboven beschreven voor coliformen en niet-intestinale enterococconen.</p>

**CCC**



27 juni 2016

**water**net

**CCC DPWE-O**

De Coli-Coccen Combinatie,  
Voor een eenduidige interpretatie  
van Groot Volume monsters!

BG Waterkwaliteit + OASEN  
27 juni 2016

**water**net

## Agenda

- Aanleiding
- Aanpak
  
- Onderbouwing van het voorstel –  
risicoafweging obv argumenten
  
- Handelingsperspectief OT's

waternet

## Conclusie

- Ja, wij zijn roomser dan de Paus!
  - Voorzorgsprincipe/better safe than sorry
  
- We zijn gekomen tot een eenduidige interpretatie van GV (Bact. vd Coligroep)
  - Communicatie naar de OT's
  - Communicatie naar ILT

waternet

## Aanleiding

- BG inventarisatie tbv 2015
  - Diverse onderwerpen rond *E. coli*, Bacteriën van de Coligroep, Enterococconen

- Rode draad:

Hoe moeten we omgaan met deze materie?

Fecaal vs Natuurlijk Help!!  
Typering Opschalen GROEI AMVD  
Source tracking Nagroei? 10<sup>-4</sup> infectierisico

**Ervaringen uitwisselen !!**

Bronnen Verwijdering Modellen

waternet

## Doel

*" Uitwisselen van ervaringen ....  
... alsmede het verdiepen van de detectie  
methodiek voor soort determinatie .  
... meetstrategie (groot volumeonderzoek)  
... eensluitend advies ... "*

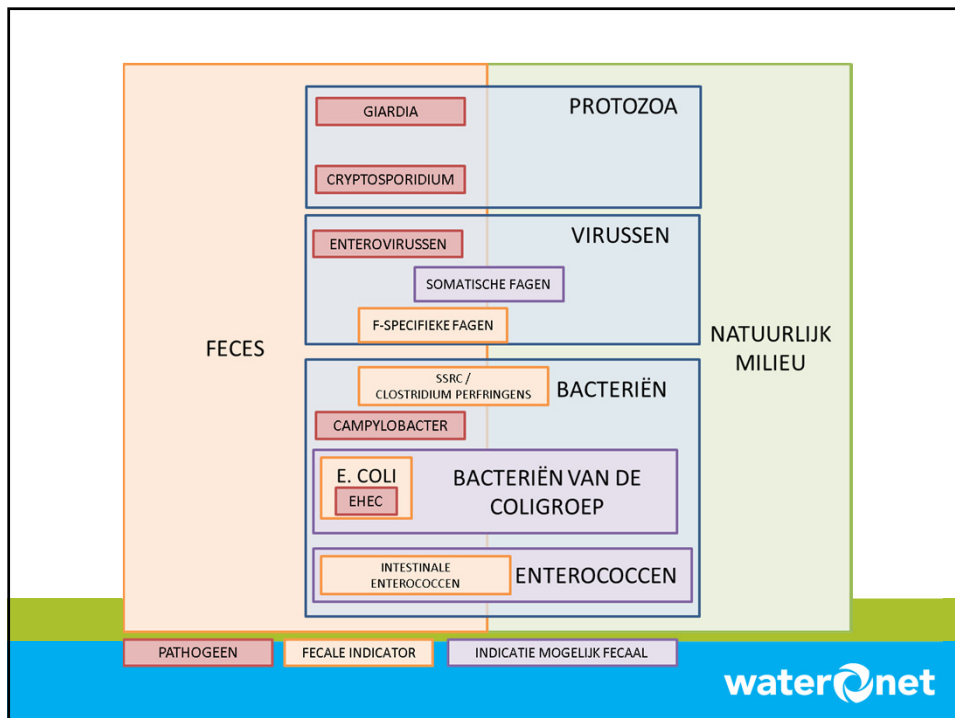
- 2 workshops
- 1 onderzoeksvorstel

waternet

## Project items - workshops

- 2 Workshops : delen van (negatieve) ervaringen
  - Besmettingen, oplossingen, teleurstellingen
- Voorbeelden :
  - Niet schoonkrijgen drains (*E. moraviensis*)
  - Traceren besmetting Coliformen
  - Interpretatie Groot Volume metingen
  - Verwijdering (on)verzadigde zone
- Microbiologie Inside : typering, statistiek, duiding

waternet

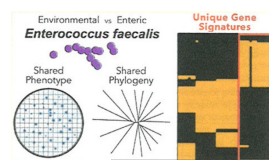


waternet

## Project items - Onderzoek

Bij constatering van een besmetting wordt de vraag gesteld of de besmetting direct afkomstig is van **feces** of dat de besmetting het gevolg is van **nagroei** of afkomstig is van een andere bron. Met deze aanvullende gegevens kunnen mogelijk betere maatregelen genomen worden.

**Kan op basis van de Eiwit samenstelling van een kolonie de herkomst worden bepaald?**

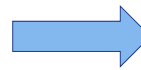


ENVIRONMENTAL  
Science & Technology

pubs.acs.org/est

Genome Sequencing Reveals the Environmental Origin of Enterococci and Potential Biomarkers for Water Quality Monitoring

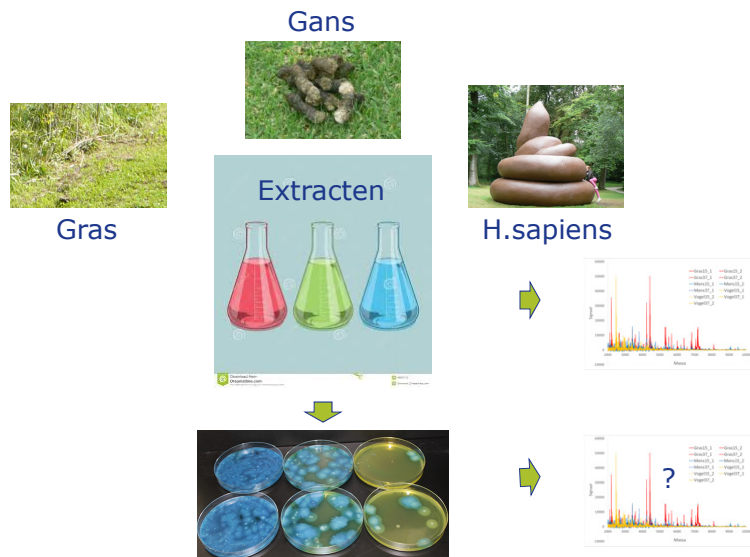
Michael R. Weigand,<sup>1</sup> Nicholas J. Ashbolt,<sup>1,2</sup> Konstantinos T. Konstantinidis,<sup>6,7,8,9</sup> and Jorge W. Santo Domingo<sup>6,7</sup>



Eiwitten/enzymen?  
Ander metabolisme?



waternet

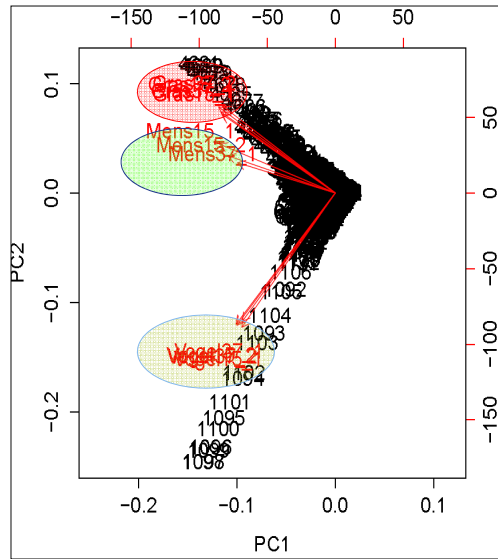


waternet



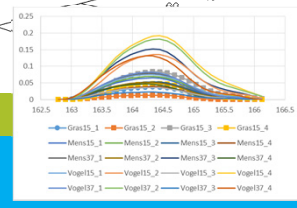
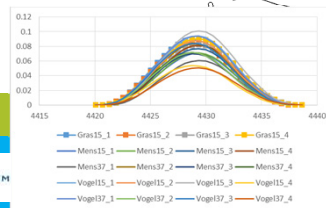
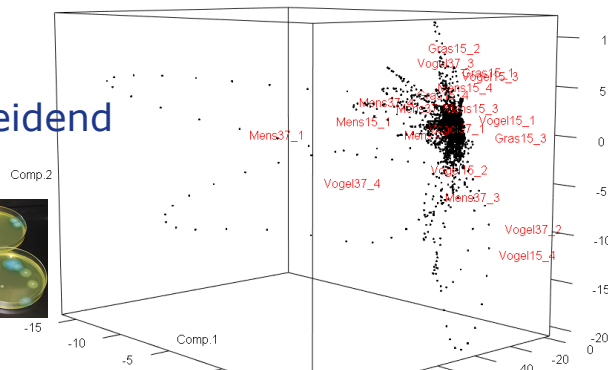
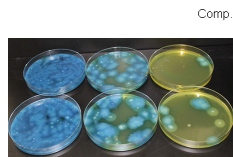
# Spectrum Extract

Goed onderscheidend  
(Multi.var.stat)



# Spectrum SBA plaat

Niet onderscheidend



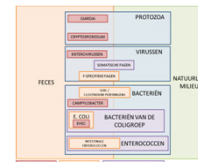
## Vervolg workshops

- Weinig verschil in operationele aanpak igv besmetting bij DPWE-O
- Grootste verschil bleek interpretatie meting in Groot Volume monster (10-100L)
- Voorstel om te komen tot een eensluitende advies BvdC



waternet

## Groot Volume monsters



- Achtergrond : meetstrategie ihkv AMVD
- Bepaling van het  $10^{-4}$  infectie risico
  - *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, Entervirussen
- E. coli is modelparameter voor de verwijdering van *Campylobacter*
- Bepaling van E. coli = bepaling bacterie van de coligroep (coliform)
- Dus bij tijd en wijle vinden we BvdColigroep → wat betekent dit?

waternet

## Meetresultaat 1 kvd/ 100L

- Is dit een probleem? (Rode Zone / DW)
- Wat zegt de wet : afwezig in 100 ml monster
  - Herhaling inzetten
  - Direct melden indien *E. coli* of Enterococ.
  - Corrigerende maatregelen - kookadvies
- Vergroten van het volume vergroot de pakkans
- Wij meten met 100 L een factor 1000 nauwkeuriger

waternet

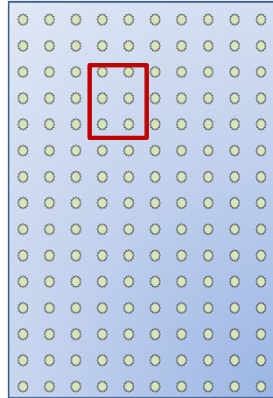
## Vergelijk DPWE (BvdC)

- BvdC is een ongewenst kwaliteitseffect
- Iedereen doet nader onderzoek
- Verschil in sterkte van acteren
  - Situationeel, uit bedrijf nemen
  - Eerst herhalen dan acteren vs direct actie
- Verschil in trigger niveau (1-4-10)
- Verschil bij GV (hoezo 100L?)

waternet

## Hoe zijn (indicator) organismen verdeeld in het water?

150 organismen in 2500 liter (25 X monstervolume)



## Afwegingen bij de beoordeling

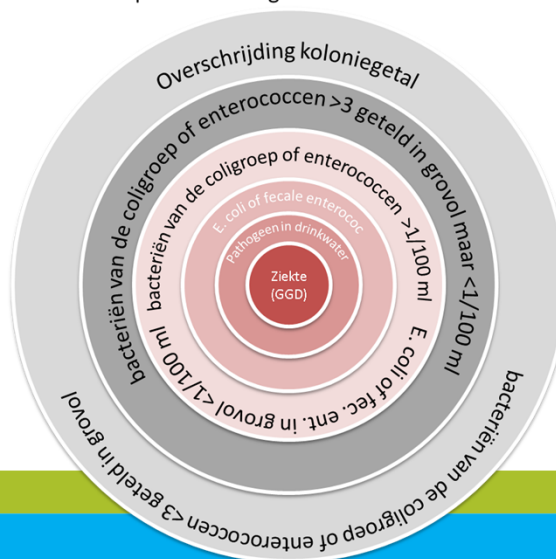
- Bacteriën zijn niet homogeen verdeeld
- $1=3$  is statistisch verantwoord
- Een Bacterie van de coligroep kan van natuurlijk herkomst zijn
- Er zijn BvdC die nagroeien
- We meten op een detectieniveau 3-log lager dan het wettelijk volume

## Handelingsperspectief OT DPWE

- BvdC is een indicatie van een ontwikkeling
- Soorttypering (MALDI) kan ondersteunen
- Bij 1-3 kvd/100L (GV) milde aanpak
  - Herhaling, belendende onderdelen, uitzieken, spoelen
- Bij >4 sterkere actie
  - uit bedrijf, reinigen, desinfecteren

waternet

Risico-niveaus van resultaten metingen in drinkwater/rode zone  
grijs: nader onderzoek  
roze-rood: opschalen ivm gezondheidsrisico



waternet

## Conclusie

- Ja, wij zijn roomser dan de Paus!
  - Voorzorgsprincipe/better safe than sorry
- We zijn gekomen tot een eenduidige interpretatie van GV (Bact. vd Coligroep)
  - Communicatie naar de OT's
  - Communicatie naar ILT

waternet

Dank voor uw aandacht!  
BG Waterkwaliteit

waternet