

BTO 2019.005 | Maart 2019

## **BTO** rapport

Effect van desinfectie op  
detectie van  
indicatororganismen  
met RT-PCR



# BTO

## Effect van desinfectie op detectie van indicatororganismen met RT-PCR

BTO 2019.005 | Maart 2019

### Opdrachtnummer

402045/085

### Projectmanager

Michiel Hootsmans

### Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische veiligheid

### Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

### Auteur(s)

Leo Heijnen en Ronald Italiaander

### Verzonden aan

BTO themagroep, Expertgroep RT-PCR en Vitens

**Jaar van publicatie**  
2019

**Meer informatie**  
Leo Heijnen  
T  
E

**Keywords**

Postbus 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

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



BTO 2019.005 | Januari 2019 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

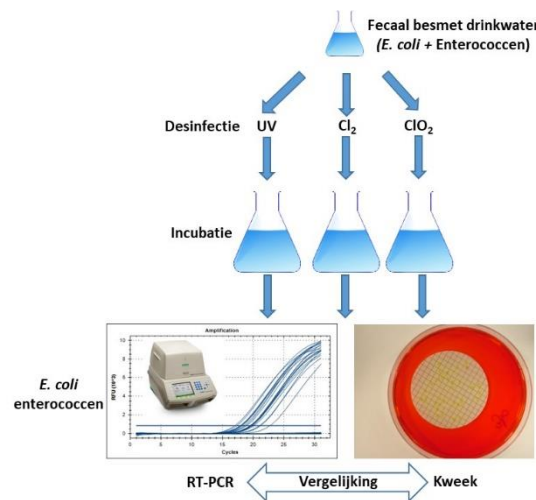
Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

## BTO Managementsamenvatting

### Gebruik van desinfectiemethoden kan incidenteel leiden tot verschillen tussen kweek- en RT-PCR-resultaten bij detectie van indicatororganismen

**Auteur(s)** Ing. Leo Heijnen en Ing. Ronald Italiaander

De recent goedgekeurde RT-PCR-methode detecteert in bepaalde situaties fecale indicatoren die met de reguliere kweekmethoden niet worden aangetoond, met name bij het gebruik van desinfectiestappen in de zuivering. Via praktijkmetingen en laboratoriumexperimenten is aangetoond dat deze detectie met RT-PCR van RNA van geïnactiveerde organismen kan optreden bij het gebruik van UV of van lage concentraties  $\text{Cl}_2$  of  $\text{ClO}_2$ . Het is niet te verwachten dat detectie van indicatororganismen ook zal plaatsvinden na gebruik van hogere concentraties  $\text{Cl}_2$ , zoals bij het spoelen van leidingen na calamiteiten en zeker niet bij de langere contacttijden zoals in de Hygiëncode Drinkwater zijn opgenomen. RT-PCR kan in alle situaties goed worden gebruikt om *afwezigheid* van indicatororganismen aan te tonen.



Schematische weergave van het uitgevoerde onderzoek: effect van desinfectie op het aantonen van *E. coli* en enterococci met RT-PCR

**Belang:** inzicht in het optreden van verschillen tussen kweek en RT-PCR voor juiste beoordeling

Als indicator voor de aanwezigheid van een fecale verontreiniging in drinkwater worden *E. coli* en enterococci gedetecteerd door middel van een kweek. Drinkwaterbedrijven en -laboratoria hebben veel geïnvesteerd in de ontwikkeling, implementatie en validatie van alternatieve methoden om de aanwezigheid van fecale verontreinigingen sneller vast te stellen. Gebruik van RT-PCR maakt het mogelijk de

aanwezigheid van het RNA van *E. coli* en enterococci selectief en snel aan te tonen: met RT-PCR is het analyseresultaat na ca. 4-6 uur beschikbaar. Dit maakt snelle reactiemogelijk na calamiteiten of bij besmettingen na ingrepen in het leidingnet en beperkt gezondheidsrisico's voor de consument. Na validatie van de RT-PCR-methode heeft Inspectie Leefomgeving en Transport (ILT) tijdelijke goedkeuring verleend voor het gebruik van de RT-PCR als alternatieve methode voor detectie van *E. coli*.

Bij toepassing van de RT-PCR-methode in de praktijk van drinkwaterbedrijf Evides blijken *E. coli* en enterococci in een deel van de monsters aantoonbaar, terwijl de reguliere kweekmethoden in deze monsters geen indicatororganismen aantonen. Mogelijk wordt RNA van *E. coli* en enterococci nog aangetoond nadat de indicatororganismen al zijn geïnactiveerd door desinfectiestappen in de zuivering, zoals UV en chloordioxide. Om een juiste interpretatie van meetresultaten mogelijk te maken, is onderzocht welk effect desinfectiestappen (UV, ClO<sub>2</sub> en Cl<sub>2</sub>) hebben op het resultaat van RT-PCR-analyses.

#### Aanpak: praktijkmetingen en laboratoriumexperimenten

Om inzicht te krijgen in de verschillen tussen kweek- en RT-PCR resultaten zijn:

- Analyses uitgevoerd op monsters uit verschillende stappen van zuiveringen van Evides waarin UV en ClO<sub>2</sub> als desinfectiestappen worden toegepast;
- Laboratoriumexperimenten uitgevoerd op kunstmatig besmette watermonsters, waarbij desinfectiestappen zijn toegepast onder gecontroleerde omstandigheden.

#### Resultaten: UV en lage concentraties ClO<sub>2</sub> en Cl<sub>2</sub> hebben weinig effect op RT-PCR

Metingen in de zuivering van Berenplaat en laboratoriumexperimenten laten zien dat desinfectie met UV of met een lage concentratie (0,4 mg/l) ClO<sub>2</sub> ervoor zorgt dat er geen fecale indicatoren meer detecteerbaar zijn met kweek, maar nog wel met RT-PCR. Het toepassen van Cl<sub>2</sub> in concentraties zoals gebruikt worden na calamiteiten voor het desinfecteren van besmette leidingen (5 mg/l) zorgt bij een korte contacttijd (30 minuten) ervoor dat kweekbare indicatoren verdwijnen en dat het signaal met RT-PCR vrijwel verdwijnt. Bij gebruik van een lagere concentratie Cl<sub>2</sub> (0,5 mg/l) en ClO<sub>2</sub> in een concentratie van 0,4 mg/l blijven indicatororganismen detecteerbaar met RT-PCR, maar niet met kweek.

Dit betekent dat niet-kweekbare indicatoren wel kunnen worden gedetecteerd met RT-PCR in zuiveringen waar UV en/of ClO<sub>2</sub> wordt toegepast

voor desinfectie en in zuiveringen met chlorering in lage concentraties. De mate waarin detectie plaatsvindt zal afhangen van de fysieke verwijdering van indicatororganismen vóór de desinfectiestap en van de daaruit resulterende concentratie indicatororganismen die de UV- of ClO<sub>2</sub>-desinfectiestap bereikt.

#### Toepassing: RT-PCR geschikt voor detectie afwezigheid indicatororganismen,

Bij het gebruik van RT-PCR voor detectie van indicatororganismen kan, in bepaalde situaties, detectie met RT-PCR plaatsvinden in monsters waarin geen kweekbare indicatoren worden aangetoond. Deze detectie met RT-PCR kan optreden bij het gebruik van UV of lage concentraties Cl<sub>2</sub> of ClO<sub>2</sub> voor desinfectie. Het is niet te verwachten dat detectie van indicatororganismen zal plaatsvinden na gebruik van hogere concentraties Cl<sub>2</sub>, zoals bij het spoelen van leidingen na calamiteiten en zeker niet bij de langere contacttijden zoals in de Hygiëncode Drinkwater zijn opgenomen. Dit betekent dat RT-PCR kan worden gebruikt om afwezigheid van indicatororganismen aan te tonen. Bij het aantonen van indicatororganismen met RT-PCR is het van belang om kennis over de toegepaste desinfectiemethoden op het water te laten meewegen bij de interpretatie van de analyseresultaten. In gevallen waarin UV of lage concentraties ClO<sub>2</sub> in de zuivering worden gebruikt als desinfectiestap, wordt geadviseerd om een aanvullende kweekanalyse uit te voeren om inzicht te krijgen in de kweekbaarheid van de aangetoonde indicatororganismen. Verder onderzoek zal moeten aantonen met welke frequenties en in welke praktijksituaties RT-PCR de niet-kweekbare indicatororganismen wel kan detecteren. Als basis voor dit onderzoek kunnen de metingen worden gebruikt die voor elke productielocatie worden gedaan in het kader van de AMVD (Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater), aangevuld met metingen aan afgeleverde water.

#### Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Effect van desinfectie op detectie van indicatororganismen met RT-PCR* (BTO 2019.005).



# Inhoud

<b>Inhoud</b>	<b>2</b>
<b>1 Achtergrond</b>	<b>3</b>
1.1 Totstandkoming en uitvoering van het project	4
<b>2 Materiaal en methoden</b>	<b>5</b>
2.1 Analyse van monsters uit de zuivering	5
2.2 Samenstellen van experimenteel besmette monsters	5
2.3 Effect van UV op detectie indicatororganismen met RT-PCR	5
2.4 Effect van vrij chloor op detectie indicatororganismen met RT-PCR	7
2.5 Effect van chloordioxide op detectie indicatororganismen met RT-PCR	8
2.6 RT-PCR	9
2.7 Kweekmethoden	10
<b>3 Resultaten</b>	<b>12</b>
3.1 Kweek-PCR	12
3.2 Metingen in de zuivering van Berenplaat en referentiezouiveringen	13
3.3 Effect van toepassing van desinfectiemethoden op RT-PCR	16
<b>4 Conclusies en discussie</b>	<b>29</b>
4.1 Metingen in de zuivering	29
4.2 Effect van desinfectie met UV op RT-PCR	30
4.3 Effect van desinfectie met chloor op RT-PCR	31
4.4 Effect van desinfectie met chloordioxide op RT-PCR	32
<b>5 Referenties</b>	<b>34</b>

# 1 Achtergrond

Detectie van *E. coli* en enterococci is wettelijk voorgeschreven als indicator voor de aanwezigheid van een fecale verontreiniging in drinkwater. Momenteel wordt de aanwezigheid van deze indicatororganismen routinematig bepaald met tijdrovende kweekmethoden. Door de drinkwaterbedrijven en -laboratoria is veel geïnvesteerd in de ontwikkeling, implementatie en validatie van methoden waarmee de aanwezigheid van het RNA van *E. coli* en enterococci, door gebruik te maken van RT-PCR, selectief en snel kan worden aangetoond. Met de keuze voor 16S rRNA (ribosomaal RNA) detectie is het, vanwege de grote hoeveelheid van dit RNA in elke cel, mogelijk gebleken om zeer gevoelig te meten. Het analyseresultaat is met deze methoden na ca. 4-6 uur beschikbaar waardoor snelle reactie na calamiteiten mogelijk is en gezondheidsrisico's en economische verliezen kunnen worden beperkt. Bovendien is met deze nieuwe methoden een besparing op de analysekosten te verwachten doordat automatisering op langere termijn mogelijk lijkt.

Sinds 23 april 2018 is door Inspectie Leefomgeving en Transport (ILT) tijdelijke goedkeuring verleend voor het gebruik van de RT-PCR als alternatieve methode voor detectie van *E. coli* waarbij een positieve uitslag van de RT-PCR dient te worden bevestigd door het uitvoeren van een kweek. Bij het toepassen van de RT-PCR na calamiteiten of ingrepen in het leidingnet blijkt ca. 95% van de onderzochte monsters (n=1318) met zowel kweek als RT-PCR negatief (Heijnen 2017) en is een groter deel van de monsters positief met RT-PCR (ca. 4%) dan met kweek (ca. 1%).

In de praktijk van drinkwaterbedrijf Evides blijken *E. coli* en enterococci in een onverwacht groot deel van de monsters aantoonbaar met RT-PCR, terwijl in deze monsters geen indicatororganismen worden aangetoond met de reguliere kweekmethode. Dit kwam aan het licht na de calamiteit in de gemeente Vlaardingen (eind 2017) waar een besmetting werd geconstateerd in het gedistribueerde drinkwater afkomstig van productielocatie Berenplaat (geproduceerd uit oppervlaktewater). Na het nemen van maatregelen werden met RT-PCR langduriger indicatororganismen aangetoond dan met kweek. Bovendien werden met RT-PCR incidenteel *E. coli* en enterococci aangetoond in het afgeleverde water van productielocatie Berenplaat. Mogelijk dat het RNA van *E. coli* en enterococci nog wordt aangetoond nadat deze indicatororganismen zijn geïnactiveerd door desinfectiestappen zoals UV en/of chloor(dioxide). Dit zou in zijn algemeenheid kunnen betekenen dat met de RT-PCR-methode in bepaalde situaties fecale indicatoren worden gedetecteerd die met de kweekmethode niet zichtbaar zijn. Mogelijk dat het RNA van de geïnactiveerde indicatororganismen nog detecteerbaar is na het toepassen van chloor na calamiteiten en het toepassen van UV en/of chloordioxide in de zuivering. Deze waarneming zou mogelijk de toepassing van RT-PCR als snelle methode voor detectie van fecale verontreinigingen kunnen beperken. Het is daarom van belang om inzicht te krijgen in het effect van desinfectiestappen (UV, ClO<sub>2</sub> en Cl<sub>2</sub>) op het resultaat van RT-PCR analyses en de relatie met kweek. Om dit inzicht te krijgen zijn er: 1) metingen uitgevoerd op het water tijdens verschillende stappen van de zuivering en 2) laboratoriumexperimenten uitgevoerd waarbij onder gecontroleerde omstandigheden het effect van desinfectiestappen (UV, Cl<sub>2</sub> en ClO<sub>2</sub>) op RT-PCR en kweek is onderzocht. De resultaten van dit onderzoek zullen inzicht geven of en in welke situaties er verschillen zijn tussen RT-PCR en kweek.



### 1.1 Totstandkoming en uitvoering van het project

De oorsprong van dit project is gelegen in de nasleep van de calamiteiten in de gemeente Vlaardingen aan het einde van 2017. Na het nemen van uitgebreide maatregelen bij de besmetting van het gedistribueerde drinkwater bleken *E. coli* en enterococconen na verloop van tijd niet meer detecteerbaar met de kweekmethoden maar bleken deze indicatororganismen nog wel aanwezig op basis van resultaten van analyses met RT-PCR. Na diverse analyses van het uitgaande water van productiebedrijf Berenplaat, uitgevoerd door Aqualab Zuid, bleek dit water incidenteel positief met RT-PCR voor *E. coli* en/of enterococconen terwijl in deze monsters met kweek niets werd aangetoond. Deze resultaten gaven aanleiding tot verder onderzoek om beter inzicht te krijgen in de oorzaak en herkomst van monsters die positief zijn met RT-PCR en waarin geen indicatororganismen worden aangetoond met kweek. Hiervoor is toen een analyseprogramma uitgevoerd door Aqualab Zuid (Liesbeth Vissers en Jörn Pilon), Evides (Henk Ketelaars en Arnoud Wessel) en KWR (Ronald Italiaander, Leo Heijnen en Gertjan Medema). De resultaten van dit gezamenlijk uitgevoerde onderzoek zijn beschreven in paragraaf 3.1. De verkregen resultaten maakten duidelijk dat er aanleiding was om het effect van verschillende desinfectiestappen op het resultaat van analyses met RT-PCR verder te onderzoeken. Vanwege het bredere belang van het goed kennen van de eigenschappen van RT-PCR analyses is dit onderzoek in BTO-verband uitgevoerd.

## 2 Materiaal en methoden

### 2.1 Analyse van monsters uit de zuivering

Om inzicht te krijgen in de herkomst van RT-PCR positieve monsters in het gezuiverde drinkwater van productiebedrijf (pb) Berenplaat zijn er door Aqualab Zuid bij verschillende productiebedrijven van Evides watermonsters verzameld. Tijdens elke monsternamen zijn monsters in duplo genomen waarvan er één is getransporteerd naar Aqualab Zuid en één naar KWR. In Tabel 1 is een overzicht gegeven van de bemonsterde locaties en de data waarop monsters zijn verzameld.

Tabel 1. Monsternamen locaties

monsterpunt	Productiebedrijf	Locatie	Monsterdata					
			29-1	31-1	2-2	5-2	7-2	9-2
PBPL19LDXX	Berenplaat	Ruw Water	29-1	31-1	2-2	5-2	7-2	9-2
PBPL47INFUV1	Berenplaat	Influent UV straat 1	29-1	31-1	2-2	5-2	7-2	9-2
PBPL47INFUV2	Berenplaat	Influent UV straat 2	29-1	31-1	2-2	5-2	7-2	9-2
PBPL50EFFUV1	Berenplaat	Effluent UV straat 1	29-1	31-1	2-2	5-2	7-2	9-2
PBPL50EFFUV2	Berenplaat	Effluent UV straat 2	29-1	31-1	2-2	5-2	7-2	9-2
PBPL80HD2-1	Berenplaat	Uitgaand water pompstation 2.1	29-1	31-1	2-2	5-2	7-2	9-2
PBPL80HD2-2	Berenplaat	Uitgaand water pompstation 2.1	29-1	31-1	2-2	5-2	7-2	9-2
PBHK75R1BURI	Baanhoek	Gezuiverd Grondwater	29-1	31-1		5-2	7-2	
PBHK76AFVR1B	Baanhoek	Gezuiverd Oppervlaktewater	29-1	31-1		5-2	7-2	
PBRA80UITG	Braakman	Gezuiverd Oppervlaktewater	29-1	31-1		5-2	7-2	
PHUY451-10	Huijbergen	Gezuiverd Grondwater	29-1	31-1		5-2	7-2	

Binnen 24 uur na monsternamen zijn analyses met kweek ingezet en is er RNA geïsoleerd t.b.v. de uitvoering van RT-PCR analyses.

### 2.2 Samenstellen van experimenteel besmette monsters

Voor het samenstellen van experimenteel besmette monsters zijn kleine hoeveelheden rioolwatereffluent toegevoegd aan drinkwater. Er is gekozen voor rioolwatereffluent, en niet voor bijvoorbeeld in het laboratorium gekweekte *E. coli* en enterococci, om daarmee een besmetting na te bootsen waarin de conditie van de indicatororganismen het meeste lijkt op de conditie die ook bij besmettingen onder praktijksituaties kunnen voorkomen. Effluent is toegevoegd aan drinkwater tot een *E. coli* en enterococci concentratie van  $\pm 10$  KVE/100 ml.

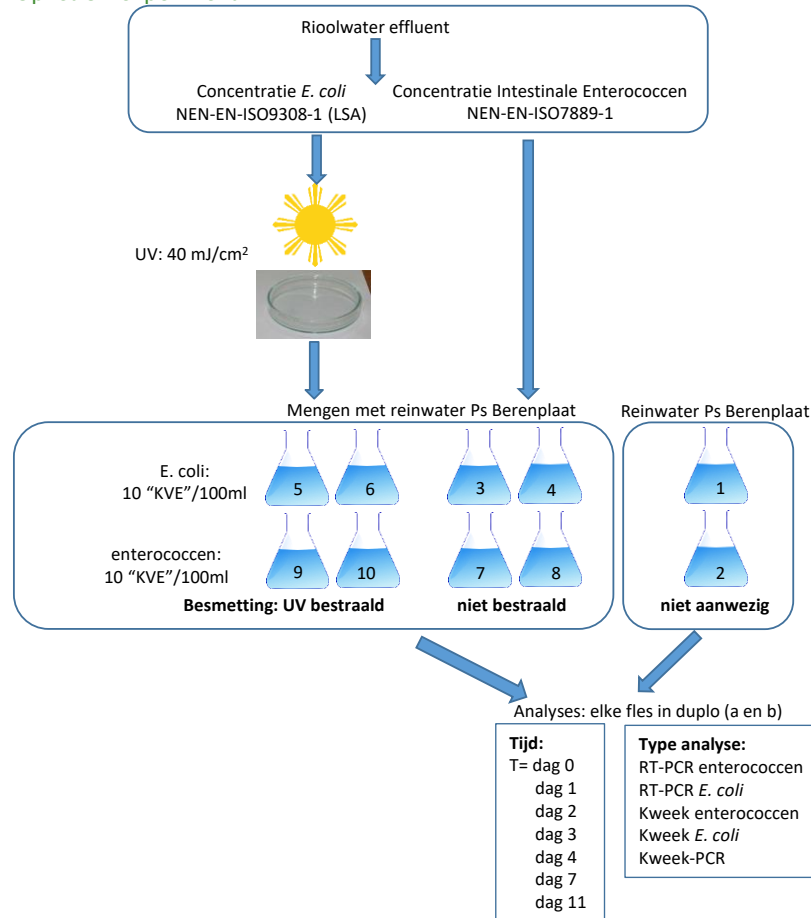
Deze lage concentratie is gekozen omdat:

- Deze nog relatief eenvoudig detecteerbaar is en omdat deze concentratie nog ruim boven de onderste analysegrens van de methode ligt.
- Deze in de buurt ligt van concentraties die kunnen optreden in praktijksituaties.
- Dan slechts een zeer klein volume rioolwatereffluent hoeft te worden toegevoegd aan het drinkwater. Hierdoor is te verwachten dat het effect van deze toevoeging beperkt is.

### 2.3 Effect van UV op detectie indicatororganismen met RT-PCR

Om het effect van UV op detectie van *E. coli* en enterococci te onderzoeken zijn er experimenten uitgevoerd op kunstmatig besmette drinkwatermonsters. De globale opzet van deze experimenten is weergegeven in Figuur 1.

Figuur 1. Opzet UV experiment



Rioolwatereffluent, afkomstig van RWZI Nieuwegein, is gebruikt om drinkwater van productiebedrijf (pb) Berenplaat te besmetten. De concentratie *E. coli* en enterococcen in het effluent is eerst bepaald met de standaard kweekmethoden. Het effluent is 5x verdund met drinkwater van Berenplaat en vervolgens is een volume van 70 ml bestraald met middendruk UV licht. Voor UV bestraling is een dosis toegepast van 40 mJ/cm<sup>2</sup> waarbij gebruik gemaakt is van de collimated beam met hierin een middendruk UV lamp zoals eerder beschreven (Harmsen 2004). Aansluitend is het UV bestraalde effluent toegevoegd aan twee flessen met Berenplaat water (fles 5 en 6) tot een concentratie van ±10 KVE/100 ml *E. coli* en twee andere flessen (fles 9 en 10) tot een concentratie van ±10 KVE/100 ml enterococcen. Niet bestraald effluent is toegevoegd aan twee flessen (fles 3 en 4) tot een concentratie van ±10 KVE/100 ml *E. coli* en twee andere flessen (fles 7 en 8) tot een concentratie van ±10 KVE/100 ml enterococcen. Ter controle zijn twee flessen met water van pb Berenplaat meegenomen waaraan geen rioolwatereffluent is toegevoegd (fles 1 en 2). Analyses zijn uitgevoerd op duplomonsters vanuit elke fles waarbij 100 ml is gefiltreerd voor detectie van:

- *E. coli* en enterococcen met RT-PCR
- *E. coli* en enterococcen met de standaard kweekmethoden
- *E. coli* en enterococcen met kweek-PCR.

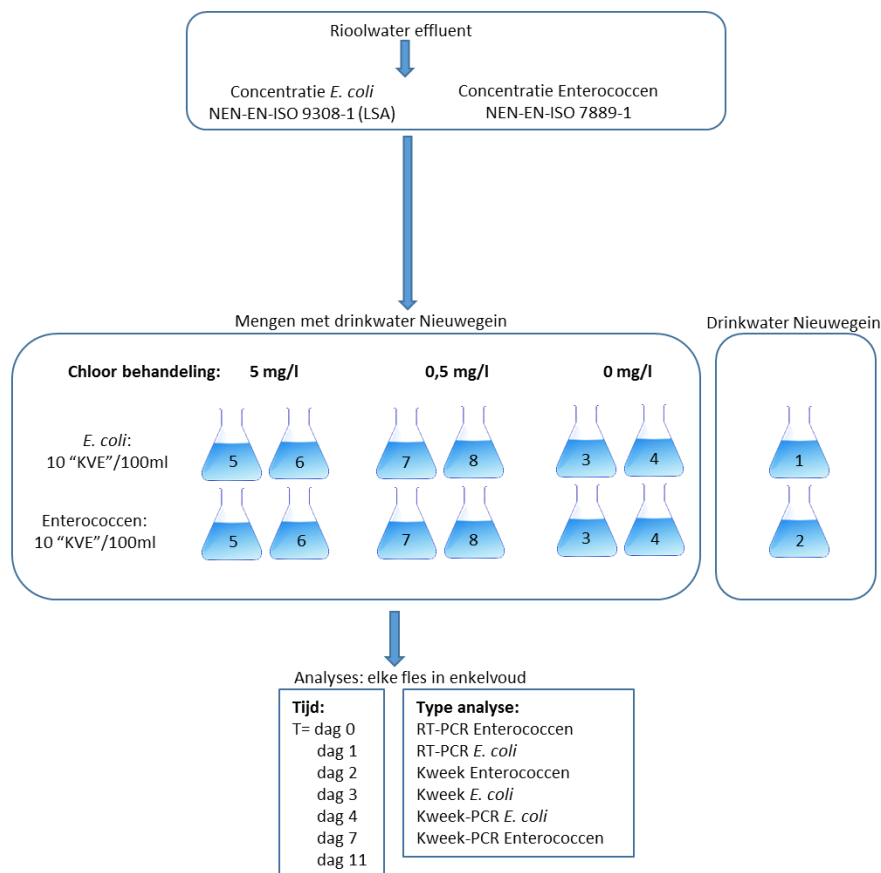
Bovenstaande analyses zijn direct na het samenstellen van de monsters (t=dag 0) uitgevoerd en na 1, 2, 3, 4, 7 en 11 dagen incubatie van de watermonsters in het donker bij 15°C in een incubator.

Water van pb Berenplaat is verzameld op 20 september 2018, vervolgens in 10-voud getest (monsters van 100 ml) met RT-PCR en bewaard bij 4°C tot het samenstellen van de mengmonsters op 1 oktober 2018. Een monster rioolwatereffluent is genomen op 28 september 2018, de kweek voor het bepalen van de concentratie *E. coli* en enterococci is ingezet op de dag van monstername.

#### 2.4 Effect van vrij chloor op detectie indicatororganismen met RT-PCR

Om het effect van vrij chloor ( $\text{Cl}_2$ ) op detectie van *E. coli* en enterococci te onderzoeken zijn er experimenten uitgevoerd op kunstmatig besmette drinkwatermonsters. De globale opzet van deze experimenten is weergegeven in Figuur 2.

Figuur 2. Opzet chloor experiment



Omdat uit het experiment met UV is gebleken dat het drinkwater afkomstig van pb Berenplaat met RT-PCR af en toe een zwak positief signaal geeft is in dit experiment gebruik gemaakt van drinkwater uit Nieuwegein, afkomstig van pb Tull en 't Waal. Rioolwatereffluent, afkomstig van RWZI Nieuwegein en bemonsterd op 19 oktober 2018, is gebruikt om drinkwater te besmetten. De concentratie *E. coli* en enterococci in het effluent is direct bepaald met de standaard kweekmethoden. Het rioolwatereffluent is 5x verdund met drinkwater en vervolgens gedoseerd aan de flessen 3 t/m 8 (drinkwater bemonsterd op 22 oktober 2018) tot een concentratie van  $\pm 10$  KVE/100 ml *E. coli* of enterococci. Aan flessen 5 en 6 is 5 mg/l vrij chloor toegevoegd en aan flessen 7 en 8 is 0,5 mg/l vrij chloor toegevoegd. Na 30 minuten (pH 7,9, temp. 20°C) is het chloor geneutraliseerd met natriumthiosulfaat. De concentratie vrij chloor is iedere 5 minuten bepaald tussen t=0 min. en t=30 min. en

ook na neutralisatie. Ter controle zijn twee flessen met drinkwater Nieuwegein meegenomen waaraan geen rioolwatereffluent is toegevoegd (fles 1 en 2). Analyses zijn uitgevoerd vanuit elke fles waarbij 100 ml is gefiltreerd voor detectie van:

- *E. coli* en enterococci met RT-PCR
- *E. coli* en enterococci met de standaard kweekmethoden
- *E. coli* en enterococci met kweek-PCR

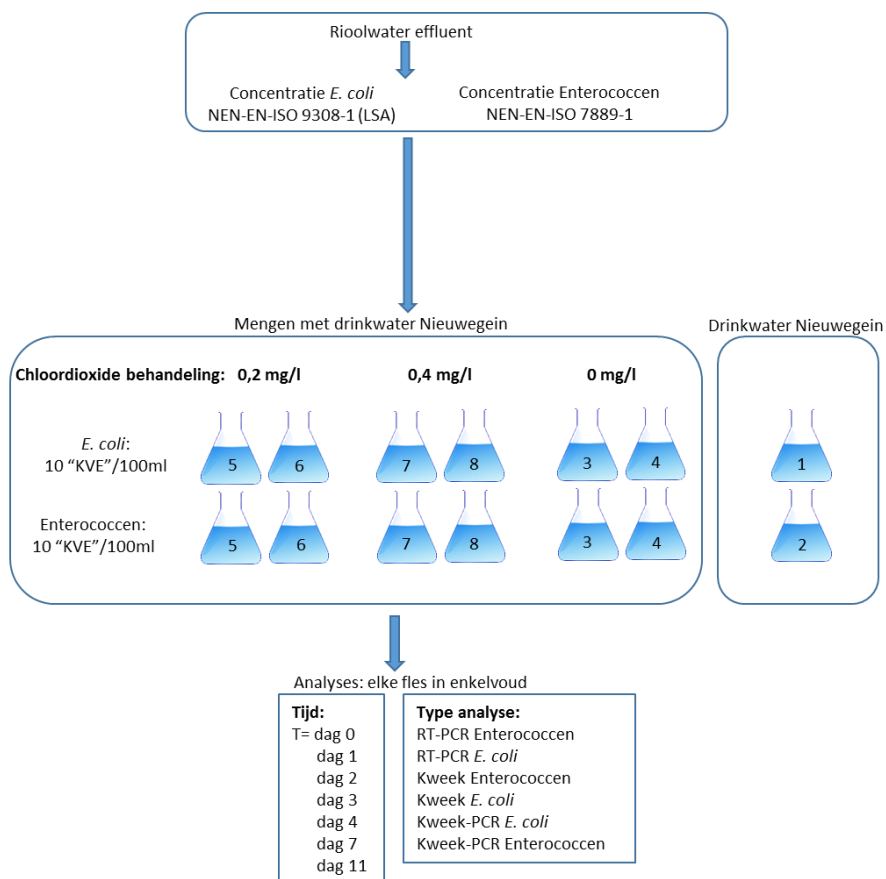
Bovenstaande analyses zijn direct na het samenstellen van de monsters (t=dag 0) uitgevoerd en na 1, 2, 3, 4, 7 en 11 dagen incubatie van de watermonsters in het donker bij 15 °C in een incubator.

Dosering van vrij chloor in het experiment is uitgevoerd met een NaOCl oplossing (afkomstig van Acros Organics, met 5% vrij chloor en gemeten conform NEN-EN-ISO 7393-1).

### 2.5 Effect van chloordioxide op detectie indicatororganismen met RT-PCR

Het effect van chloordioxide (ClO<sub>2</sub>) op detectie van *E. coli* en enterococci is onderzocht door experimenten uit te voeren op kunstmatig besmette drinkwatermonsters. De globale opzet van deze experimenten is weergegeven in Figuur 3.

Figuur 3. Opzet chloordioxide experiment



Rioolwatereffluent, afkomstig van RWZI Nieuwegein en bemonsterd op 9 november 2018, is gebruikt om drinkwater Nieuwegein te besmetten. De concentratie *E. coli* en enterococci in het effluent is direct bepaald met de standaard kweekmethoden. Het

rioolwatereffluent is 5x verdund met drinkwater en vervolgens gedoseerd aan de flessen 3 t/m 6 (drinkwater bemonsterd op 12 november 2018) en aan de flessen 7 en 8 (drinkwater bemonsterd op 13 november 2018) tot een concentratie van  $\pm 10$  KVE/100 ml *E. coli* of enterococci. Aan flessen 5 en 6 is 0,2 mg/l  $\text{ClO}_2$  toegevoegd en aan flessen 7 en 8 is 0,4 mg/l  $\text{ClO}_2$  toegevoegd (pH 7,9, temp. 20°C). De hoeveelheid chloordioxide (besteld bij Air-Aqua.com, <https://www.air-aqua.nl/nl/supertab-chloordioxide-20x-1-gram-10> en opgelost in ultrapuur water) welke is toegevoegd is bepaald aan de hand van de metingen (HPT 240 kit van Hach en de Shimadzu UV-2550 Spectrofotometer) na dosering van  $\text{ClO}_2$  aan drinkwater (3.3.3.1). Ter controle zijn twee flessen met drinkwater meegenomen waaraan geen rioolwatereffluent is toegevoegd (fles 1 en 2). Analyses zijn uitgevoerd vanuit elke fles waarbij 100 ml is gefiltreerd voor detectie van:

- *E. coli* en enterococci met RT-PCR
- *E. coli* en enterococci met de standaard kweekmethoden
- *E. coli* en enterococci met kweek-PCR

Bovenstaande analyses zijn direct na het samenstellen van de monsters (t=dag 0) uitgevoerd en na 1, 2, 3, 4 en 7 dagen incubatie van de watermonsters in het donker bij 15 °C in een incubator.

## 2.6 RT-PCR

Details over de toegepaste RT-PCR-methoden zijn eerder beschreven (Heijnen 2017, Heijnen 2018), een korte beschrijving van de belangrijke onderdelen van de methode is hieronder weergegeven.

### 2.6.1 Isolatie van RNA

Het isoleren van RNA is uitgevoerd volgens het eerder beschreven protocol (Heijnen 2018) waarbij voor elke analyse een volume van 100 ml is gefiltreerd en eerst een enzymatische behandeling met Lysozym is toegepast om de celwand van de bacteriële cellen af te breken. Vervolgens zijn de reagentia van de Nuclisens kit van Biomerieux gebruikt voor het zuiveren van de nucleïnezuren waarbij het semi-automatische KingFisher ML systeem is gebruikt voor het uitvoeren van de stappen voor het wassen van de magnetische beads en de extractie van het RNA. Bij elke monsterserie is een blanco controlemonster meegenomen. Bij dit blanco monster is RNA geïsoleerd na filtratie van 100 ml "ultra pure" DNase en RNase vrij water ("PCR water").

### 2.6.2 Detectie met RT-PCR

Voor het uitvoeren van RT-PCR reacties zijn de reagentia van Bioline gebruikt. Van deze reagentia is bekend dat de verontreiniging met nucleïnezuur van *E. coli* en enterococci minimaal is. Bij het gebruik van Bioline reagentia wordt eerst een cDNA reactie uitgevoerd met de Bioline Sensifast cDNA synthesis kit waarmee een cDNA copy van het RNA wordt gesynthetiseerd. Vervolgens wordt een specifieke qPCR reactie uitgevoerd met de Bioline Sensimix II probe mix voor detectie van *E. coli* en enterococci. Op elk RNA-monster is één cDNA reactie uitgevoerd, vervolgens zijn op elk cDNA monster duplo PCR-reacties uitgevoerd voor detectie van *E. coli* en enterococci. Voor het beoordelen van de analyseresultaten wordt gebruik gemaakt van de Ct waarden. De Ct waarde wordt bepaald door het aantal PCR-cycli dat nodig is om een detecteerbare hoeveelheid fluorescentiesignaal te genereren tijdens de PCR. De aanwezigheid van meer RNA resulteert daarbij in een lagere Ct waarde.

### 2.6.2.1 Detectie van *E. coli* met RT-PCR

Voor detectie van *E. coli* is gebruik gemaakt van de standaardmethode zoals eerder beschreven (Heijnen 2017). Bij het beoordelen van de resultaten is gebruik gemaakt van twee criteria om te beoordelen of *E. coli* aanwezig is in een watermonster:

- Het verschil in Ct waarde tussen het geanalyseerde monster en het blanco controlemonster is >2 PCR cycli. De noodzaak voor het gebruik van dit criterium wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van sporen van nucleïezuren (RNA en/of DNA) in de gebruikte reagentia waardoor blanco monsters vaak positief worden met, vanwege de lage concentratie, hoge Ct waarden (Ct>37).
- De Ct waarde van het geanalyseerde monster is <37 cycli.

### 2.6.2.2 Detectie van enterococcon met RT-PCR

Voor detectie van enterococcon is een mengsel van primers in één reactie voor detectie van vier enterococcon soorten toegepast. Deze methode is eerder beschreven in: (Heijnen 2018).

Bij het beoordelen van de resultaten is gebruik gemaakt het volgende criterium om te beoordelen of enterococcon aanwezig zijn in een watermonster:

- De Ct waarde van het geanalyseerde monster is <37 cycli.

## 2.7 Kweekmethoden

Voor het bepalen van de concentratie *E. coli* is de kweekmethode op LSA (Lauriel Sulfaat Agar) platen toegepast (gelijkwaardig aan NEN-EN-ISO 9308-1) en voor enterococcon de standaard kweekmethode NEN-EN-ISO 7889-2. Bij de analyse van praktijkmonsters uit de zuivering van Berenplaat en referentiezuiveringen (paragraaf 3.1) zijn aanvullende analyses uitgevoerd op CCA (CHROMagar: NEN-EN-ISO 9308-1) en TSA/TGA (NEN 6261) platen voor detectie van *E. coli*. Voor deze analyses is een volume van 100 ml geconcentreerd d.m.v. membraanfiltratie.

### 2.7.1 Kweek-PCR

Voor de detectie van *E. coli* en enterococcon met kweek-PCR is 100 ml monster gefiltreerd. Het filter is overgebracht in een potje met 10 ml Nutrient Broth (deksel dusdanig gesloten dat uitwisseling van zuurstof nog mogelijk is) en overnacht (16-24 uur) geïncubeerd bij 36 °C in een donkere incubator. Vervolgens is uit 500 µl Nutrient Broth DNA geïsoleerd door de cellen eerst te centrifugeren en vervolgens DNA te isoleren uit de verkregen pellet met behulp van de InstaGene™ Matrix kit van Bio-Rad Laboratories. Het DNA is geanalyseerd met PCR op de aanwezigheid van *E. coli* en enterococcon. Voor het uitvoeren van de PCR's is gebruik gemaakt van de Biorad iQ supermix en de primers die ook worden gebruikt voor de RT-PCR.

Voor de interpretatie van de resultaten is gebruik gemaakt van criteria om te beoordelen of kweekbare *E. coli* of enterococcon aanwezig zijn in een onderzocht watermonster. Aangezien er bij de start van deze studie geen ervaring was met de kweek-PCR methode zijn deze criteria vastgesteld op basis van de resultaten en theoretische aannames. Uitgebreid onderzoek zal nodig zijn om de prestatiekenmerken van deze methoden goed te leren kennen en beoordelingscriteria nauwkeurig te bepalen. Van de toegepaste Biorad iQ supermix is uit eerder onderzoek bekend dat deze mix, vergeleken met de mix van Biorad, een hogere concentratie DNA van *E. coli* bevat. Hierdoor worden bij het gebruik van deze mix lagere Ct waarden gemeten in monsters waarin geen *E. coli* cellen aanwezig zijn. Aangezien het detecteren van kweekbare indicatororganismen het doel is van het toepassen van kweek-PCR is te verwachten dat groei zal zorgen voor een toename van de hoeveelheid DNA van de indicatoren resulterend in een afname van de Ct waarde. Voor het beoordelen van de resultaten van kweek-PCR analyses is gebruik gemaakt van de volgende criteria

*criterium voor E. coli:*

- Monster wordt beschouwd als positief als:
  - Het verschil tussen Ct waarde van het onderzochte monster en de Ct waarde van het besmette controlemonsters (met riooleffluent en zonder desinfectie) minder dan 10 cycli is.
    - Er is voor deze waarde gekozen omdat een verschil van 10 cycli theoretisch een concentratieverschil van een factor 1000 representeert (3,3 cycli per factor 10). Vanwege de zeer beperkte ervaring met deze methode is dit criterium nog zeer arbitrair, aanvullend onderzoek is noodzakelijk om criteria objectief vast te stellen.

 *criterium voor enterococcen:*

- De eerste kweek-PCR resultaten voor detectie van enterococcen (paragraaf 3.1) lieten zien dat enterococcen minder goed groeien in het gebruikte medium en dat de methode daardoor minder geschikt is voor het detecteren van kweekbare enterococcen. Monster wordt beschouwd als positief wanneer  $Ct < 37$  cycli.



## 3 Resultaten

### 3.1 Kweek-PCR

Deze methode is toegevoegd omdat hiermee de aanwezigheid van kweekbare *E. coli* en enterococcon extra gevoelig aangetoond kan worden. Het is mogelijk dat de waargenomen verschillen tussen resultaten verkregen met RT-PCR en resultaten met kweek veroorzaakt worden door cellen die nog wel levensvatbaar maar niet meer kweekbaar zijn onder de selectiedruk van de toegepaste kweekplaten. Daarom is in dit onderzoek deze kweek-PCR methode toegepast waarbij eerst een niet-selectieve voorkweek in een rijk vloeibaar medium (Nutrient Broth) is gebruikt voor het vermeerderen van de *E. coli* en enterococcon cellen. Vervolgens is DNA geïsoleerd uit het medium van de voorkweek en is op dit DNA een PCR uitgevoerd.

Omdat er nog geen ervaring met kweek-PCR methoden voor detectie van *E. coli* en enterococcon is opgedaan, is eerst een experiment uitgevoerd waarbij aan steriel leidingwater *E. coli* en enterococcon (*E. faecium*) zijn toegevoegd in een concentratie van ongeveer 5 KVE/100 ml. Hiervoor zijn Vitroids™ van Sigma-Aldrich gebruikt. Dit kunstmatig besmette monster is in 5-voud getest met kweek-PCR. Ter controle is een niet geïncubeerd monster (bewaard in de koeling bij 4 °C zodat de cellen zich niet vermeerderden) en een monster Nutrient Broth zonder gefiltreerd monster met *E. coli* en enterococcon geanalyseerd. Tevens is het monster in 2-voud geanalyseerd met de standaard (ISO)kweekmethoden voor *E. coli* en enterococcon om de toegevoegde concentratie te bepalen. De resultaten van de kweek-PCR analyses zijn samengevat in Tabel 2.

De kunstmatig besmette monsters laten in alle gevallen een positief signaal met de kweek-PCR zien voor zowel *E. coli* (met lage gemiddelde Ct-waarde van 15,89) als enterococcon (met hogere gemiddelde Ct-waarde van 29,83). De aanmerkelijk lagere Ct waarde voor detectie van *E. coli* is waarschijnlijk het gevolg van efficiënte groei van *E. coli* tijdens de overnacht incubatie in Nutrient Broth terwijl de vermeerdering van enterococcon in dit medium en gedurende de toegepaste incubatietijd minder is. Het monster wat bewaard is bij 4 °C en het Nutrient Broth zonder monster geven voor enterococcon geen signaal met RT-PCR. Deze monsters geven met RT-PCR voor *E. coli* wel een signaal met een hoge Ct waarde (39,2) in het monster waaraan geen besmet water is toegevoegd en een lagere Ct waarde (34,2) in het besmette monster wat is geïncubeerd bij 4°C. Het signaal kan verklaard worden doordat er in de gebruikte PCR-mix sporen van *E. coli* DNA aanwezig zijn (Heijnen and Medema 2006). De kweekmethoden bevestigen de initieel beoogde concentratie van ongeveer 5 KVE/100 ml.

Tabel 2. Resultaten van analyses met Kweek-PCR

	Kweek-PCR		Kweek	
	<i>E. coli</i>	Enterococcen (Ct)	<i>E. coli</i>	Enterococcen (KVE/100 ml)
Besmet water in Nutrient Broth o/n bij 36 °C	16,1	30,1	-	-
	16,0	28,5	-	-
	16,0	29,5	-	-
	15,4	33,0	-	-
	16,0	28,1	-	-
Besmet water in Nutrient Broth o/n bij 4 °C	34,3	N/A	-	-
Nutrient Broth o/n bij 36 °C	39,2	N/A	-	-
Besmet water kweek op LSA platen			5	
Besmet water kweek op S&B platen				2 9

Deze analyses laten zien dat met kweek-PCR lage concentraties *E. coli* (5 KVE/100ml), na incubatie, aangetoond kunnen worden. Als gevolg van celdeling zijn de Ct waarden laag. De minder efficiënte deling van enterococcen gedurende een overnacht incubatie in Nutriënt Broth zorgt ervoor dat de Ct waarden voor enterococcen aanmerkelijk hoger zijn. Deze methode lijkt hierdoor zeer geschikt voor het aantonen van kweekbare *E. coli* en minder geschikt voor het aantonen van kweekbare enterococcen.

### 3.2 Metingen in de zuivering van Berenplaat en referentieuiveringen

Om inzicht te krijgen in de herkomst van RT-PCR positieve monsters in het gezuiverde drinkwater van productiebedrijf (pb) Berenplaat is er door Evides, Aqualab Zuid en KWR gezamenlijk onderzoek uitgevoerd. Bij dit onderzoek zijn er tussen 29 januari tot 9 februari 2018 door Aqualab Zuid en KWR analyses uitgevoerd op water afkomstig van verschillende locaties. Er is daarbij gekozen om analyses uit te voeren op water afkomstig van verschillende stappen in de zuivering van pb Berenplaat en een aantal referentielocaties.

Hiervoor zijn de volgende locaties geselecteerd:

- Zuivering van pb Berenplaat: drie monsters per week gedurende twee weken
  - Het ruwe water (monsterpunt: PBPL19LDXX)
  - De aanvoer van UV straten 1 en 2 (monsterpunt: PBPL47INFUV1 en PBPL47INFUV2)
  - Het effluent van UV straten 1 en 2 (monsterpunten: PBPL50EFFUV1 en PBPL50EFFUV2)
  - Het uitgaande water van twee pompstations (monsterpunten: PBPL80HD2-1 van pompstation 2.1 en PBPL80HD2-2 van pompstation 2.2)
- Referentielocaties: twee monsters per week gedurende twee weken
  - Gezuiverd grondwater van pb Baanhoek (monsterpunt: PBHK75R1BURI)
  - Gezuiverd oppervlaktewater van pb Baanhoek (monsterpunt: PBHK76AFVR1B)
  - Gezuiverd oppervlaktewater van pb Braakman (monsterpunten: PBRA80UITG van gebouw 25 en PBRA80UITG26 van gebouw 26)
  - Gezuiverd grondwater van pb Huijbergen (Monsterpunt: PHUY451-10)

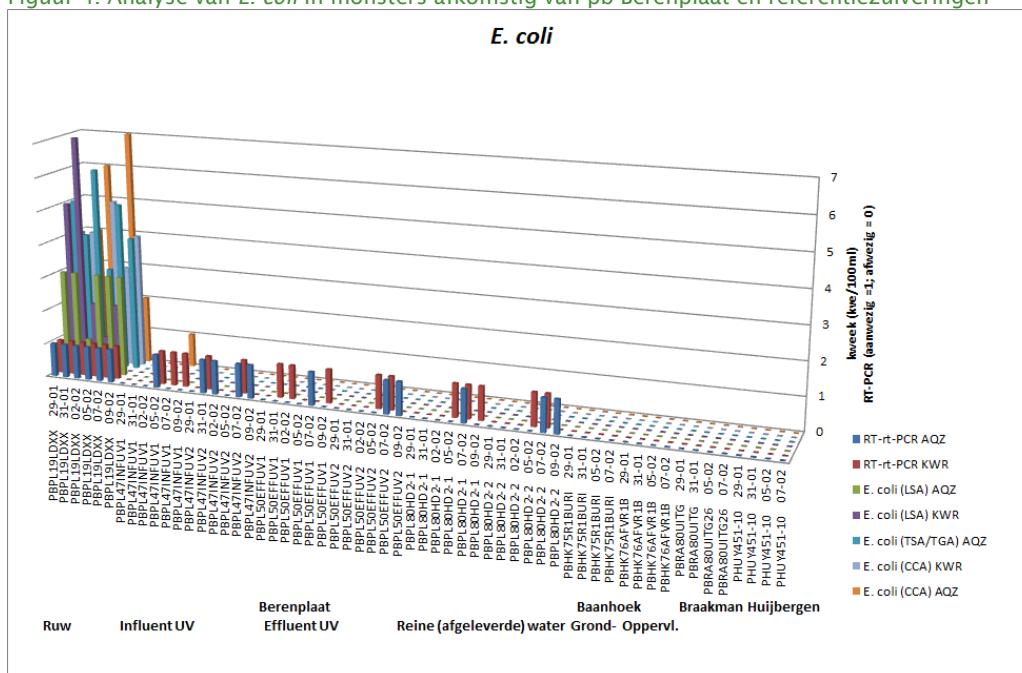
Op alle verzamelde monsters zijn analyses uitgevoerd bij KWR en Aqualab Zuid (AQZ). Beide laboratoria hebben de volgende analyses uitgevoerd:

- RT-PCR: *E. coli* en enterococci
- Kweek:
  - *E. coli*:
    - Standaard kweek op LSA platen (KWR en AQZ)
    - Alternatieve kweek op:
      - CCA platen (chromogeen medium met minder selectiedruk bij KWR en AQZ)
      - TSA/TGA en CCA bij AQZ
  - Enterococci: S&B

Voor alle analyses is een volume van 100 ml gefiltreerd.

De resultaten van de analyses voor detectie van *E. coli* zijn samengevat in Figuur 4 en de analyses voor detectie van enterococci in Figuur 5.

Figuur 4. Analyse van *E. coli* in monsters afkomstig van pb Berenplaat en referentiezuiveringen

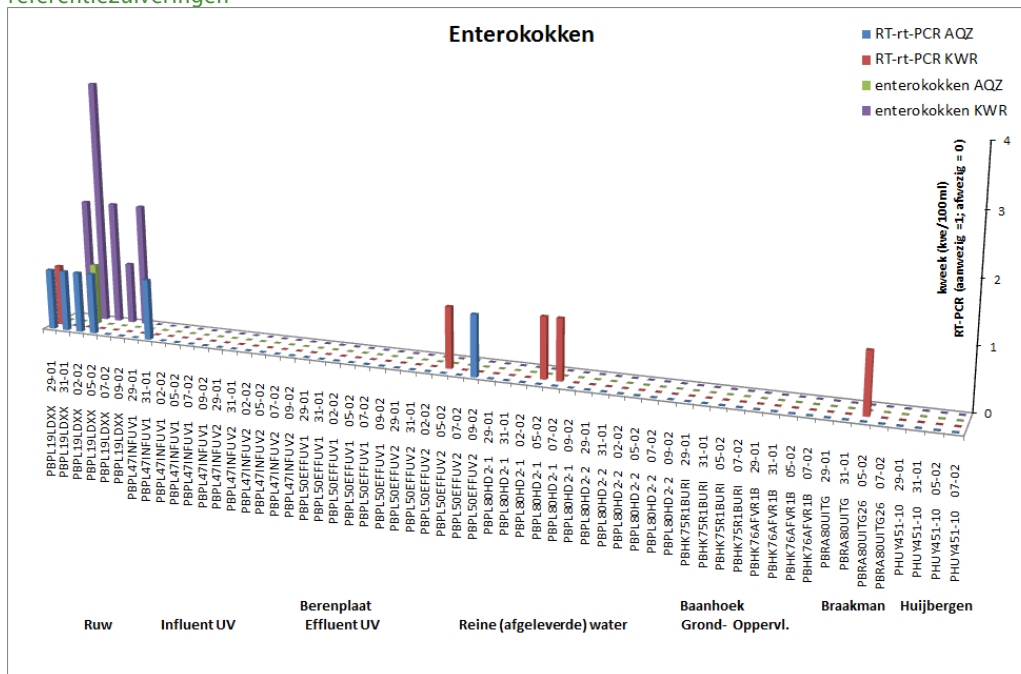


De resultaten van bovenstaande analyses laten zien dat:

- In het ruwe water van pb Berenplaat:
  - *E. coli* wordt aangetoond door beide laboratoria met zowel kweek als RT-PCR in alle ruw watermonsters.
- In het influent van de UV van pb Berenplaat:
  - Wordt *E. coli* met kweek aangetoond in één monster door AQZ, KWR toont met kweek geen *E. coli* aan.
  - Wordt *E. coli* met RT-PCR door AQZ en KWR aangetoond in vijf monsters.
- In het effluent van de UV van pb Berenplaat:
  - Wordt door beide laboratoria geen *E. coli* aangetoond met kweek.
  - Wordt in drie monsters *E. coli* aangetoond met RT-PCR door AQZ en in vijf monsters door KWR.
- In het reine water van pb Berenplaat:
  - Wordt door beide laboratoria geen *E. coli* aangetoond met kweek
  - Wordt in vijf monsters *E. coli* met RT-PCR aangetoond door AQZ en in drie monsters door KWR.
- In de referentiezuiveringen:

- Wordt door beide laboratoria geen *E. coli* aangetoond met kweek
- Wordt door beide laboratoria geen *E. coli* aangetoond met RT-PCR

Figuur 5. Analyse van enterokokken in monsters afkomstig van pb Berenplaat en referentiezuiveringen



De resultaten van bovenstaande analyses laten zien dat:

- In het ruwe water van pb Berenplaat:
  - Worden Enterococci door KWR met kweek aangetoond in vijf monsters. Bij AQZ worden in één monster enterococci gedetecteerd.
  - Met RT-PCR worden enterococci door KWR aangetoond in vier monsters, door AQZ in één monster.
- In het influent van de UV van pb Berenplaat:
  - Worden door beide laboratoria geen enterococci aangetoond met kweek.
  - Worden door beide laboratoria geen enterococci aangetoond met RT-PCR.
- In het effluent van de UV van pb Berenplaat:
  - Worden door beide laboratoria geen enterococci aangetoond met kweek.
  - Worden door beide laboratoria enterococci aangetoond in één monster m.b.v. de RT-PCR.
- In het reine water van pb Berenplaat:
  - Worden door beide laboratoria geen enterococci aangetoond met kweek.
  - Worden alleen door KWR enterococci aangetoond in twee monsters met RT-PCR.
- In de referentiezuiveringen:
  - Worden door beide laboratoria geen enterococci aangetoond met kweek
  - Worden door KWR enterococci aangetoond met RT-PCR in één monster van het reine water van Braakman.

Uit deze metingen kunnen de volgende samenvattende conclusies worden getrokken:

- In de zuivering van Berenplaat:

- Bereiken kweekbare *E. coli*'s (en geen enterococcen) de desinfectiestap met UV. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de beperkte aanwezigheid van fysieke barrières (filtratie) voor de verwijdering van bacteriële verontreinigingen uit het ruwe water en het gebruik van UV als belangrijkste desinfectiestap aan het einde van de zuivering.
- Zijn er geen kweekbare *E. coli*'s (en enterococcen) meer aanwezig na de desinfectiestap met UV
- Blijft detectie van *E. coli*, en in mindere mate enterococcen, mogelijk met RT-PCR na de desinfectiestap met UV
- In het afgeleverde water van de onderzochte referentiezuiveringen:
  - Worden geen *E. coli*'s of enterococcen aangetoond met kweek en RT-PCR
    - In één monster van de zuivering van Braakman worden enterococcen (en geen *E. coli*) aangetoond. Het is niet duidelijk in hoeverre deze eenmalige waarneming het gevolg is van de aanwezigheid van enterococcen in dit monster of een technisch probleem bij deze analyse. Uitgebreider onderzoek zal inzicht kunnen geven in hoeverre deze eenmalige detectie van enterococcen werkelijk het gevolg is van het passeren van RT-PCR signaal door de zuivering.

### 3.3 Effect van toepassing van desinfectiemethoden op RT-PCR

#### 3.3.1 Desinfectie met UV

Om het effect van desinfectie met UV op de detecteerbaarheid van *E. coli* en enterococcen met RT-PCR te onderzoeken zijn er kunstmatig besmette monsters samengesteld door een kleine hoeveelheid rioolwatereffluent te mengen met drinkwater. Hierbij zijn monsters samengesteld waarbij het drinkwater is besmet met rioolwatereffluent na bestraling van het effluent met UV en monsters waarbij het drinkwater is besmet met rioolwatereffluent wat niet met UV bestraald is (Figuur 1). De UV dosis welke wordt gebruikt in de praktijk van productiebedrijf Berenplaat (40 mJ/cm<sup>2</sup>) is gebruikt als desinfectiedosis en er is (net als bij Berenplaat), gebruik gemaakt van middendruk UV<sup>1</sup>.

##### 3.3.1.1 Testen van drinkwater van productiebedrijf Berenplaat

In water afkomstig van productiebedrijf Berenplaat worden in praktijksituaties incidenteel *E. coli* en enterococcen aangetoond met RT-PCR in het afgeleverde water waarin met kweek geen *E. coli* en enterococcen werden gedetecteerd. Mogelijk dat de samenstelling van dit water zorgt voor beperkte afbraak van het 16S rRNA in UV geïnactiveerde cellen waardoor *E. coli* en enterococcen langer detecteerbaar zijn met RT-PCR. Om goed inzicht te krijgen in verschillen die kunnen optreden tussen detectie van *E. coli* en enterococcen met kweek en RT-PCR is gekozen om voor dit experiment het drinkwater van Berenplaat te gebruiken. Vanwege het gebruik van water van Berenplaat is het mogelijk dat in het afgeleverde water *E. coli* en enterococcen gedetecteerd worden met RT-PCR en is het van belang om eerst vast te stellen dat het water dat gebruikt wordt voor de experimenten geen signaal geeft met RT-PCR. Hiervoor zijn er RT-PCR analyses in duplo uitgevoerd op 10 porties van 100 ml Berenplaat water. Bij deze analyses werd met RT-PCR geen signaal verkregen voor *E. coli* of enterococcen in de 10 geanalyseerde monsters. Hierdoor waren er geen problemen te verwachten met eventueel achtergrondsignaal met RT-PCR t.g.v. het gebruik van

Berenplaat drinkwater en is besloten om dit water te gebruiken voor het samenstellen van kunstmatig besmette monsters.

### 3.3.1.2 Samenstellen monsters

Om te bepalen hoeveel effluent moet worden toegevoegd is de concentratie *E. coli* en enterococci in het effluent eerst bepaald met de standaard kweekmethoden (*E. coli* concentratie:  $9,4 \times 10^2$  KVE/ml; enterococci concentratie:  $1,6 \times 10^2$  KVE/ml). Het effluent is 5x verdund en vervolgens is een volume van 70 ml bestraald met UV licht met een dosis van  $40 \text{ mJ/cm}^2$  m.b.v. de collimated beam zoals eerder beschreven (Harmsen 2004). Aansluitend is het bestraalde effluent toegevoegd aan twee flessen met Berenplaat water tot een concentratie van  $\pm 10$  KVE/100 ml bestraalde *E. coli* en twee andere flessen tot een concentratie van  $\pm 10$  KVE/100 ml bestraalde enterococci. Tevens is niet bestraald effluent toegevoegd aan twee flessen tot een *E. coli* concentratie van  $\pm 10$  KVE/100 ml en twee andere flessen tot een enterococci concentratie van  $\pm 10$  KVE/100 ml. Bij deze experimentele opzet is de concentratie effluent 108  $\mu\text{l}$  per liter Berenplaat water in flessen met  $\pm 10$  KVE/100 ml *E. coli* en 624  $\mu\text{l}$  effluent per liter Berenplaat water in flessen met  $\pm 10$  KVE/100 ml enterococci. Ter controle zijn twee flessen met water van Pb Berenplaat meegenomen waaraan geen rioolwatereffluent is toegevoegd.

### 3.3.1.3 Analyseresultaten

Analyses zijn uitgevoerd voor detectie van *E. coli* en enterococci met RT-PCR, kweek en kweek-PCR op monsters in duplo van 100 ml direct na het samenstellen van de monsters (t=dag 0). Aansluitend zijn de monsters geïncubeerd bij 15°C in een donkere incubator en zijn er opnieuw analyses uitgevoerd na 1, 2, 3, 4, 7 en 11 dagen incubatie. In Tabel 3 zijn de resultaten van de analyses voor *E. coli* en in Tabel 4 de resultaten van de analyses voor enterococci samengevat.

Tabel 3. Analyseresultaten *E. coli*

	Water 1a	Water 1b	Water 2a	Water 2b	Water 3a	Water 3b	Water 4a	Water 4b	Water 5a	Water 5b	Water 6a	Water 6b	
	Drinkwater				Drinkwater + <i>E. coli</i> uit rioleffluent				Drinkwater + <i>E. coli</i> uit rioleffluent UV bestraald				
RT-PCR (Ct)	Dag 0	38,6	34,6	34,2	37,1	28,8	27,7	29,0	27,1	29,7	27,2	29,3	27,4
	Dag 1	>39,6	39,6	>38,6	37,1	28,9	27,6	28,2	29,4	30,1	29,4	30,3	29,2
	Dag 2	39,3	>39,7	>38,7	>39,4	28,4	31,4	29,2	29,6	29,4	31,0	32,9	29,7
	Dag 3	N/A	>39,7	33,0	34,4	26,8	27,5	28,0	33,7	39,6	28,0	29,8	29,3
	Dag 4	N/A	N/A	35,8	N/A	31,4	30,8	30,7	29,9	35,1	29,9	31,2	28,4
	Dag 7	N/A	38,9	39,3	37,0	28,9	30,0	28,9	34,2	29,3	30,6	30,2	28,6
	Dag 11	>39,1	N/A	36,4	>37,2	29,3	32,2	29,7	32,3	29,9	30,4	30,5	32,0
	Kweek (KVE/100 ml)	Dag 0	0,0	0,0	0,0	0,0	13	8	11	14	0,0	0,0	0,0
Dag 1		0,0	0,0	0,0	0,0	14	16	14	12	0,0	0,0	0,0	0,0
Dag 2		0,0	0,0	0,0	0,0	14	19	8	18	0,0	0,0	0,0	0,0
Dag 3		0,0	0,0	0,0	0,0	14	19	18	13	0,0	0,0	0,0	0,0
Dag 4													
Dag 7		0,0	0,0	0,0	0,0	6	8	1	6	0,0	0,0	0,0	0,0
Dag 11		0,0	0,0	0,0	0,0	11	5	4	3	0,0	0,0	0,0	0,0
Kweek-PCR (Ct)		Dag 0	39,8	38,8	37,6	N/A	16,4	18,8	16,6	16,8	39,7	N/A	N/A
	Dag 1	N/A	N/A	N/A	N/A	15,7	15,8	15,4	15,7	38,1	38,2	39,1	39,0
	Dag 2												
	Dag 3												
	Dag 4												
	Dag 7	37,5	38,8	39,2	39,5	11,5	14,7	15,2	13,0	36,4	38,3	34,4	37,2
	Dag 11	38,1	N/A	39,5	38,5	13,2	17,1	16,3	15,8	38,2	N/A	37,8	37,2

*N/A is niet aangetoond. In monsters waarin geen E. coli werd gedetecteerd zijn weergegeven in groen en monsters waarin wel E. coli werd gedetecteerd zijn weergegeven in oranje. De weergegeven Ct waarden zijn de gemiddelde waarden van twee RT-PCR reacties. Als slechts met één van de beide RT-PCR reacties een signaal werd gedetecteerd dan is het gemiddelde weergegeven als >Ct waarde van de reactie waarmee wel signaal werd verkregen. Op de monsters van dag 4 is geen kweek en de monsters van dag 2, 3 en 4 geen kweek-PCR uitgevoerd*

Bovenstaande resultaten laten zien dat de watermonsters waaraan rioolwatereffluent is toegevoegd besmet zijn met een gemiddelde *E. coli* concentratie van 11 KVE/100 ml

(gemiddelde van de metingen op dag 0). Na 11 dagen incubatie van het besmette water is er nog steeds kweekbare *E. coli* aanwezig maar is de concentratie teruggelopen tot ca. 5 KVE/100 ml. In het drinkwater waaraan geen rioolwatereffluent en het water waaraan UV bestraald rioolwatereffluent is toegevoegd wordt met kweek geen *E. coli* aangetoond. Bij het gebruik van RT-PCR voor detectie van *E. coli* in het drinkwater zonder rioolwatereffluent is in zes van de 28 onderzochte monsters (21%) *E. coli* aangetoond. Mogelijk dat deze, niet kweekbare, *E. coli*'s de zuivering van Berenplaat passeren zoals ook is waargenomen na de calamiteit in Vlaardingen en in de in 3.1 beschreven metingen. Deze waarneming is opmerkelijk omdat vóór het begin van het experiment 10 porties van 100 ml van het water zijn onderzocht waarbij in geen van de onderzochte monsters *E. coli* werd aangetoond (3.3.1.1). In alle monsters waaraan niet-UV-bestraald rioolwatereffluent en in 27 van de 28 monsters waaraan UV-bestraald rioolwatereffluent is toegevoegd wordt *E. coli* gedetecteerd met RT-PCR. Hiermee wordt aangetoond dat het RNA uit UV-geïnactiveerde *E. coli* nog detecteerbaar is tot minimaal 11 dagen na bestraling. Gedurende de incubatietijd van 11 dagen lijkt er een lichte toename van de Ct waarden van de RT-PCR en is er zeer weinig verschil zichtbaar tussen de Ct waarden bij de monsters waaraan rioolwatereffluent en de monsters waaraan UV-geïnactiveerd rioolwatereffluent is toegevoegd. Met kweek-PCR wordt alleen *E. coli* aangetoond in alle watermonsters die besmet zijn met rioolwatereffluent wat geen UV bestraling heeft ondergaan. In alle andere monsters worden Ct waarden waargenomen die veel hoger (> 10 cycli) zijn dan de Ct waarden in de monsters die besmet zijn met kweekbare *E. coli* waarmee wordt vastgesteld dat in deze monsters geen vermeerdering van *E. coli* heeft plaats gevonden. De analyses met kweek-PCR geven hiermee geen aanwijzingen voor de aanwezigheid van UV bestraalde *E. coli* die niet kweekbaar zijn op LSA platen maar wel kunnen vermeerderen onder niet-selectieve kweekomstandigheden (Nutrient Broth).

Tabel 4. Analyseresultaten enterococcen

		Water 1a	Water 1b	Water 2a	Water 2b	Water 7a	Water 7b	Water 8a	Water 8b	Water 9a	Water 9b	Water 10a	Water 10b
		Drinkwater				Drinkwater + Enterococcen uit rioleffluent				Drinkwater + Enterococcen uit rioleffluent UV bestraald			
RT-PCR (Ct)	Dag 0	N/A	N/A	N/A	N/A	34,2	35,5	36,6	35,1	35,5	36,9	36,0	33,2
	Dag 1	N/A	N/A	N/A	N/A	34,9	39,1	33,6	33,8	36,2	34,4	35,2	34,9
	Dag 2	N/A	N/A	N/A	N/A	33,9	36,4	38,1	38,4	34,7	35,7	35,6	34,7
	Dag 3	N/A	N/A	N/A	N/A	35,3	38,2	N/A	N/A	36,0	38,0	36,0	N/A
	Dag 4	N/A	N/A	N/A	N/A	37,5	35,4	37,9	36,7	N/A	37,7	N/A	35,9
	Dag 7	N/A	N/A	N/A	N/A	36,6	N/A	38,5	36,9	35,7	34,8	36,5	38,3
	Dag 11	N/A	N/A	N/A	N/A	34,0	37,3	35,4	37,2	39,5	N/A	N/A	33,9
	Kweek (KVE/100 ml)	Dag 0	0,0	0,0	0,0	0,0	10	11	6	9	0,0	0,0	0,0
Dag 1		0,0	0,0	0,0	0,0	7	10	5	13	0,0	0,0	0,0	0,0
Dag 2		0,0	0,0	0,0	0,0	8	5	9	5	0,0	0,0	0,0	0,0
Dag 3		0,0	0,0	0,0	0,0	0	4	1	6	0,0	0,0	0,0	0,0
Dag 4													
Dag 7		0,0	0,0	0,0	0,0	7	4	4	1	0,0	0,0	0,0	0,0
Dag 11		0,0	0,0	0,0	0,0	2	2	3	2	0,0	0,0	0,0	0,0
Kweek-PCR (Ct)	Dag 0	N/A	N/A	N/A	N/A	37,2	40,0	N/A	36,3	N/A	N/A	N/A	N/A
	Dag 1	N/A	N/A	N/A	N/A	36,8	31,3	35,7	37,1	N/A	N/A	N/A	N/A
	Dag 2												
	Dag 3												
	Dag 4												
	Dag 7	N/A	N/A	N/A	N/A	38,2	32,6	N/A	35,2	N/A	N/A	N/A	N/A
Dag 11	N/A	N/A	N/A	N/A	32,0	35,9	N/A	33,4	N/A	N/A	N/A	N/A	

*N/A is niet aangetoond. In monsters waarin geen enterococcen werden gedetecteerd zijn weergegeven in groen en monsters waarin wel enterococcen werden gedetecteerd zijn weergegeven in oranje. De weergegeven Ct waarden zijn de gemiddelde waarden van twee RT-PCR reacties. Als slechts met één van de beide RT-PCR reacties een signaal werd gedetecteerd dan is het gemiddelde weergegeven als >Ct waarde van de reactie waarmee wel signaal werd verkregen. Op de monsters van dag 4 is geen kweek en de monsters van dag 2, 3 en 4 geen kweek-PCR uitgevoerd.*

De enterococcen analyses laten zien dat de watermonsters waaraan rioolwatereffluent is toegevoegd besmet zijn met een gemiddelde enterococcen concentratie van 9 KVE/100 ml (gemiddelde van de metingen op dag 0). Na 11 dagen incubatie van het

besmette water is de concentratie kweekbare enterococci teruggelopen tot ca. 2 KVE/100 ml. In het water waaraan geen rioolwatereffluent en het water waaraan UV-bestraald rioolwatereffluent is toegevoegd wordt met kweek geen enterococci aangetoond. Bij het gebruik van RT-PCR voor detectie van enterococci in het water zonder rioolwatereffluent worden geen enterococci aangetoond. In 25 van de 28 monsters waaraan niet-UV-bestraald rioolwatereffluent en in 22 van de 28 monsters waaraan UV-bestraald rioolwatereffluent is toegevoegd worden enterococci gedetecteerd met RT-PCR. Ondanks de aanwezigheid van, op S&B platen, kweekbare enterococci worden enterococci dus niet in alle besmette monsters aangetoond met RT-PCR en in veel van de monsters zijn de aanwezige enterococci detecteerbaar maar zijn de Ct waarden zeer hoog (>37). Mogelijk is dit het gevolg van de toegepaste RT-PCR methode welke gericht is op detectie van vier enterococci soorten (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae* en *E. durans*) waardoor mogelijk niet alle, uit het rioolwatereffluent gekweekte enterococci, efficiënt worden gedetecteerd met RT-PCR. Deze experimenten laten zien dat ook het RNA uit UV-geïnactiveerde enterococci nog detecteerbaar is tot minimaal 11 dagen na bestraling. Met kweek-PCR worden enterococci alleen aangetoond in een deel van de watermonsters (12 van de 16) die besmet zijn met rioolwatereffluent wat geen UV bestraling heeft ondergaan. In alle andere monsters wordt geen signaal met kweek-PCR gevonden.

***Samengevat kunnen uit deze experimenten de volgende conclusies worden getrokken:***

- In drinkwater waaraan verdund rioolwatereffluent met een concentratie van *E. coli* van ca. 11 KVE/100 ml of een concentratie enterococci van ca. 9 KVE/100 ml is toegevoegd:
  - Worden *E. coli*'s en enterococci aangetoond met kweek gedurende minimaal 11 dagen.
    - De concentratie kweekbare *E. coli* loopt gedurende deze 11 dagen terug tot ca. 5 KVE/100 ml.
    - De concentratie kweekbare enterococci loopt gedurende deze 11 dagen terug tot ca. 2 KVE/100 ml.
  - Worden *E. coli*'s en enterococci aangetoond met RT-PCR gedurende minimaal 11 dagen.
  - Worden *E. coli*'s en enterococci aangetoond met kweek-PCR gedurende minimaal 11 dagen.
- In drinkwater waaraan UV bestraald (40 mJ/cm<sup>2</sup>) verdund rioolwatereffluent is toegevoegd:
  - Worden geen *E. coli*'s en enterococci aangetoond met kweek.
  - Worden *E. coli*'s en enterococci aangetoond met RT-PCR gedurende minimaal 11 dagen.
  - Zijn er, op basis van de Ct waarden van de RT-PCR reacties, geen duidelijke aanwijzingen voor afbraak van RNA gedurende de incubatietijd van minimaal 11 dagen.
  - Worden geen *E. coli*'s en enterococci aangetoond met kweek-PCR.

### 3.3.2 Desinfectie met chloor

Om het effect van desinfectie met chloor op de detecteerbaarheid van *E. coli* en enterococci met RT-PCR te onderzoeken zijn er besmette monsters samengesteld door een kleine hoeveelheid rioolwatereffluent te mengen met drinkwater Nieuwegein. Aan de flessen 5 en 6 en flessen 7 en 8 is chloor toegevoegd in twee concentraties. Aan flessen 3 en 4 is geen chloor toegevoegd en aan flessen 1 en 2 is geen rioolwatereffluent toegevoegd (Figuur 2). Er is gekozen voor het onderzoeken van

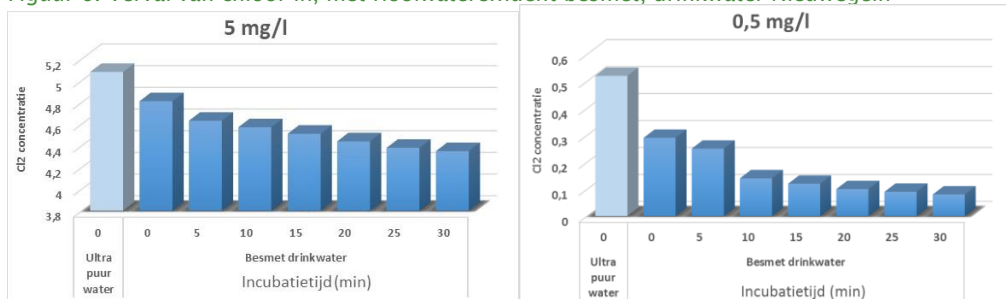


dosering van twee concentraties (5 mg/l en 0,5 mg/l) waarbij de concentratie 5 mg/l de concentratie simuleert welke wordt toegepast bij het schoonmaken van leidingen na calamiteiten en de concentratie van 0,5 mg/l de concentratie simuleert welke kan worden toegepast bij het distribueren van gechloreerd drinkwater.

### 3.3.2.1 Vervalcurve van chloor in drinkwater

Omdat uit eerder onderzoek bekend is dat drinkwater (met een kleine hoeveelheid rioolwatereffluent) mogelijk al een (groot) deel van het toegevoegde vrije chloor wegvangt ('chloorvraag'), is voorafgaand aan het eigenlijke experiment een 'verval experiment' uitgevoerd (pH 7,9, temp. 20°C). Hieruit is gebleken dat het drinkwater van Nieuwegein met een toevoeging van een klein volume rioolwatereffluent (zoals gebruikt in het UV experiment) een geringe 'chloorvraag' heeft, maar dat er gedurende de 30 minuten vrij chloor aanwezig was (zie Figuur 6). Dosering van vrij chloor in het experiment is uitgevoerd met een NaOCl oplossing.

Figuur 6. Verval van chloor in, met rioolwatereffluent besmet, drinkwater Nieuwegein



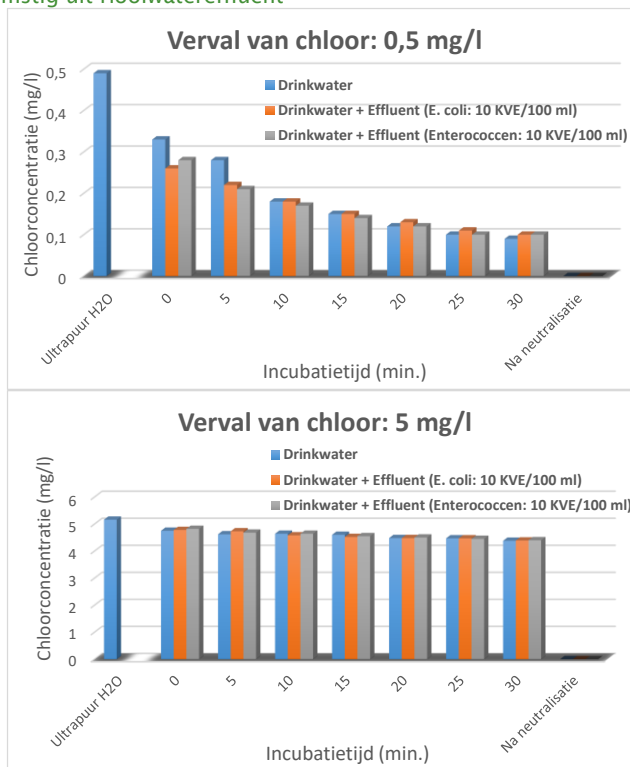
### 3.3.2.2 Samenstellen monsters

Rioolwatereffluent, afkomstig van RWZI Nieuwegein en bemonsterd op 19 oktober 2018, is gebruikt om drinkwater uit Nieuwegein experimenteel te besmetten. De concentratie *E. coli* en enterococci in het effluent is direct bepaald met de standaard kweekmethoden. Het rioolwatereffluent is 5x verdund met drinkwater en vervolgens gedoseerd aan de flessen 3 t/m 8 (drinkwater bemonsterd op 22 oktober 2018) tot een concentratie van  $\pm 10$  KVE/100 ml *E. coli* of enterococci (respectievelijk 3,6 ml en 6,9 ml 5x verdund rioolwatereffluent toegevoegd). Aan flessen 5 en 6 is 5 mg/l vrij chloor toegevoegd en aan flessen 7 en 8 is 0,5 mg/l vrij chloor toegevoegd. De concentratie vrij chloor is iedere 5 minuten bepaald tussen t=0 min. en t=30 min. en na 30 minuten is het chloor geneutraliseerd met natriumthiosulfaat. Ter controle zijn twee flessen met drinkwater meegenomen waaraan geen rioolwatereffluent is toegevoegd (fles 1 en 2).

### 3.3.2.3 Analyseresultaten

Analyses zijn uitgevoerd voor detectie van *E. coli* en enterococci met RT-PCR, kweek en kweek-PCR op monsters in enkelvoud van 100 ml direct na het samenstellen van de monsters en behandeling met chloor (t=dag 0). Aansluitend zijn de monsters geïncubeerd bij 15°C in een donkere incubator en zijn er opnieuw analyses uitgevoerd na 1, 2, 3, 4, 7 en 11 dagen incubatie. Chloormetingen zijn uitgevoerd om inzicht te krijgen in de concentraties chloor tijdens de contacttijd van 30 minuten en na neutralisatie met natriumthiosulfaat, de resultaten van deze metingen zijn in Figuur 7 weergegeven.

Figuur 7. Verval van chloor in drinkwatermonsters Nieuwegein met en zonder *E. coli* of enterococcen afkomstig uit rioolwatereffluent



De resultaten van metingen van het ultrapuur water, wat geen chloorvraag heeft, laten zien dat er inderdaad 0,5 mg/l of 5 mg/l vrij chloor is toegevoegd. Dosering van 0,5 mg/l of 5 mg/l vrij chloor aan drinkwater Nieuwegein met en zonder toevoeging van rioolwatereffluent resulteert in een chloorvraag van respectievelijk ongeveer 0,2 mg/l en 0,4 mg/l vrij chloor. De afname van het beschikbare vrij chloor in de monsters loopt in de tijd voor zowel de monsters waaraan 0,5 mg/l vrij chloor als de monsters waaraan 5 mg/l gedoseerd is af. Na 30 minuten is er in de monsters waaraan 0,5 mg/l is gedoseerd in alle monsters nog  $\pm 0,1$  mg/l vrij chloor meetbaar en na neutralisatie is geen vrij chloor meer meetbaar. Bij de monsters waaraan 5 mg/l vrij chloor is gedoseerd is na 30 minuten nog  $\pm 4,4$  mg/l vrij chloor meetbaar en na neutralisatie is ook geen vrij chloor meer meetbaar. Bovenstaande analyses laten zien dat in alle monsters waaraan chloor is toegevoegd een afnemende concentratie vrij chloor aanwezig is gedurende de contacttijd van 30 minuten.

Na inactivatie met chloor zijn periodieke analyses met RT-PCR, kweek en kweek-PCR uitgevoerd. In Tabel 5 zijn de resultaten van deze analyses voor *E. coli* en in Tabel 6 de resultaten van de analyses voor enterococcen samengevat.

Tabel 5. Analyseresultaten *E. coli*

		Fles 1 drinkwater Nieuwegein	Fles 2 Nieuwegein	Fles 3 Drinkwater + <i>E. coli</i> uit rioleffluent	Fles 4 Drinkwater	Fles 5 Drinkwater + <i>E. coli</i> uit rioleffluent +5 mg/l vrij Cl <sub>2</sub>	Fles 6 Drinkwater + <i>E. coli</i> uit rioleffluent +0,5 mg/l vrij Cl <sub>2</sub>	Fles 7 Drinkwater + <i>E. coli</i> uit rioleffluent +0,5 mg/l vrij Cl <sub>2</sub>	Fles 8 Drinkwater
RT-PCR (Ct)	Dag 0	N/A	>38,4	29,1	24,9	N/A	33,9	37,1	31,6
	Dag 1	N/A	N/A	24,5	24,0	>39,4	>39,6	36,0	33,4
	Dag 2	>39,4	39,3	27,2	26,4	>39,4	N/A	35,6	34,6
	Dag 3	>38,7	>39,0	27,5	24,7	>37,7	>38,3	35,2	33,3
	Dag 4	N/A	38,7	26,4	24,6	N/A	>39,5	34,5	32,0
	Dag 7	>39,8	>39,8	26,9	26,5	>38,2	N/A	35,1	34,7
	Dag 11	>40,0	>38,7	29,6	30,8	N/A	>38,5	39,2	34,7
Kweek (KVE/100 ml)	Dag 0	0	0	107	76	0	0	0	0
	Dag 1	0	0	64	92	0	0	0	0
	Dag 2	0	0	83	60	0	0	0	0
	Dag 3	0	0	79	74	0	0	0	0
	Dag 4								
	Dag 7	0	0	27	40	0	0	0	0
	Dag 11								
Kweek-PCR (Ct)	Dag 0	37,4	36,3	11,6	10,6	37,0	37,6	33,6	37,7
	Dag 1	36,4	36,7	12,7	13,7	35,0	35,7	36,8	36,3
	Dag 2	37,3	36,8	14,4	14,8	37,0	N/A	36,7	N/A
	Dag 3	36,5	37,1	14,2	14,6	29,1	35,1	33,7	36,7
	Dag 4								
	Dag 7	37,5	38,1	15,3	14,3	37,5	39,0	N/A	39,0
	Dag 11								

N/A is niet aangetoond. In monsters waarin geen *E. coli* werd gedetecteerd zijn weergegeven in groen en monsters waarin wel *E. coli* werd gedetecteerd zijn weergegeven in oranje. De weergegeven Ct waarden zijn de gemiddelde waarden van twee RT-PCR reacties. Als slechts met één van de beide RT-PCR reacties een signaal werd gedetecteerd dan is het gemiddelde weergegeven als >Ct waarde van de reactie waarmee wel signaal werd verkregen. Op de monsters van dag 4 en 11 is geen kweek en geen kweek-PCR uitgevoerd.

De *E. coli* kweek resultaten laten zien dat de watermonsters besmet zijn met een *E. coli* concentratie van gemiddeld  $\pm 90$  KVE/100 ml. Dit is ruim hoger dan de initieel beoogde concentratie van  $\pm 10$  KVE/100 ml. Het is niet duidelijk waardoor deze hogere concentratie veroorzaakt is. Na 7 dagen is de concentratie kweekbare *E. coli* afgenomen naar gemiddeld 34 KVE/100 ml. In het drinkwater waaraan geen rioolwatereffluent is toegevoegd en in de met 5 mg/l of 0,5 mg/l vrij chloor behandelde drinkwatermonsters met rioolwatereffluent zijn geen kweekbare *E. coli* aangetoond. Met RT-PCR is in beide drinkwatermonsters (flessen 1 en 2) op alle analysedagen geen *E. coli* aangetoond. In de monsters met drinkwater waaraan rioolwatereffluent is gedoseerd (flessen 3 en 4), is wel op alle dagen *E. coli* aangetoond met RT-PCR. In de met 5 mg/l vrij chloor behandelde drinkwatermonsters met rioolwatereffluent (flessen 5 en 6) is alleen op dag 0 in fles 6 *E. coli* gedetecteerd met RT-PCR. De drinkwatermonsters met rioolwatereffluent welke behandeld zijn met 0,5 mg/l vrij chloor (flessen 7 en 8) gaven in 12 van de 14 analyses (85,7%) een positief RT-PCR signaal voor *E. coli*. Het is bij de met 0,5 mg/l chloor behandelde monsters opvallend dat de Ct waarden van de RT-PCR reacties t.g.v. de chloorbehandeling flink toenemen (gemiddeld ca. 8 cycli). Deze resultaten geven aan dat de lage dosis chloor van 0,5 mg/l en korte contacttijd de kweekbaarheid van *E. coli* volledig laat verdwijnen en ook resulteert in een zeer sterke afname van de concentratie RNA in de monsters. Deze afname is niet voldoende om de monsters als negatief te beschouwen bij het gebruik van RT-PCR.

Met kweek-PCR worden de onbehandelde monsters waaraan rioolwatereffluent is toegevoegd op alle dagen positief bevonden voor *E. coli*. In de overige monsters (drinkwater zonder rioolwatereffluent en drinkwater met rioolwatereffluent behandeld met 5 mg/l en 0,5 mg/l vrij chloor) zijn de Ct waarden duidelijk hoger dan de Ct waarden van besmette monsters waarbij geen behandeling met chloor is toegepast zodat niet te verwachten is dat in deze monsters groei van *E. coli* heeft plaats

gevonden. In één monster (fles 5, dag 3) wordt een relatief lage Ct waarde gevonden van 29,1 cycli. Deze Ct waarde is wel duidelijk hogere dan de Ct waarden van de monsters afkomstig uit fles 3 en 4, het is daarom niet waarschijnlijk maar er kan niet worden uitgesloten, dat in dit monster vermeerdering van *E. coli* heeft plaats gevonden.

Tabel 6. Analyseresultaten enterococcen

		Fles 1 drinkwater Nieuwegein	Fles 2 Nieuwegein	Fles 3 Drinkwater + enterococcen uit riooleffluent	Fles 4 Nieuwegein	Fles 5 Drinkwater + enterococcen uit riooleffluent +5 mg/l vrij Cl <sub>2</sub>	Fles 6 Nieuwegein	Fles 7 Drinkwater + enterococcen uit rioleffluent +0,5 mg/l vrij Cl <sub>2</sub>	Fles 8 Nieuwegein
RT-PCR (Ct)	Dag 0	N/A	N/A	32,2	39,5	N/A	N/A	>39,0	>38,9
	Dag 1	N/A	N/A	32,7	32,9	N/A	N/A	N/A	38,6
	Dag 2	N/A	N/A	31,6	33,7	N/A	N/A	N/A	37,4
	Dag 3	N/A	N/A	34,6	33,1	N/A	N/A	N/A	N/A
	Dag 4	N/A	N/A	32,3	35,5	N/A	N/A	38,9	N/A
	Dag 7	N/A	N/A	33,9	36,6	N/A	N/A	39,2	39,0
	Dag 11	N/A	N/A	36,2	N/A	N/A	N/A	38,4	39,6
Kweek (KVE/100 ml)	Dag 0	0	0	14	10	0	0	0	0
	Dag 1	0	0	12	10	0	0	0	0
	Dag 2	0	0	6	9	0	0	0	0
	Dag 3	0	0	7	7	0	0	0	0
	Dag 4								
	Dag 7	0	0	6	5	0	0	0	0
	Dag 11								
Kweek-PCR (Ct)	Dag 0	N/A	N/A	37,0	39,9	N/A	N/A	N/A	N/A
	Dag 1	N/A	N/A	N/A	37,7	N/A	N/A	N/A	N/A
	Dag 2	N/A	N/A	34,3	34,1	N/A	N/A	N/A	N/A
	Dag 3	N/A	N/A	36,1	31,6	N/A	N/A	N/A	N/A
	Dag 4								
	Dag 7	N/A	N/A	34,1	34,1	N/A	N/A	N/A	N/A
	Dag 11								

N/A is niet aangetoond. In monsters waarin geen enterococcen werd gedetecteerd zijn weergegeven in groen en monsters waarin wel enterococcen werd gedetecteerd zijn weergegeven in oranje. De weergegeven Ct waarden zijn de gemiddelde waarden van twee RT-PCR reacties. Als slechts met één van de beide RT-PCR reacties een signaal werd gedetecteerd dan is het gemiddelde weergegeven als >Ct waarde van de reactie waarmee wel signaal werd verkregen. Op de monsters van dag 4 en 11 is geen kweek en geen kweek-PCR uitgevoerd.

De enterococcen kweekmethode laat zien dat de drinkwatermonsters (fles 3 en 4) waaraan rioolwatereffluent is toegevoegd besmet zijn met een concentratie van gemiddeld 12 KVE/100 ml. Na 7 dagen incubatie is de concentratie kweekbare enterococcen afgenomen met 50% tot een concentratie van 6 KVE/100 ml. In het drinkwater waaraan geen rioolwatereffluent is toegevoegd en in de met 5 mg/l en 0,5 mg/l vrij chloor behandelde drinkwatermonsters met rioolwatereffluent zijn geen enterococcen gekweekt. Met de RT-PCR zijn in de drinkwatermonsters zonder rioolwatereffluent (flessen 1 en 2) geen enterococcen aangetoond. In bijna alle onbehandelde monsters waarbij rioolwatereffluent (flessen 3 en 4) aan het drinkwater is toegevoegd, zijn enterococcen met RT-PCR gedetecteerd. Alleen in het monster op dag 7 van fles 4 zijn geen enterococcen gevonden met RT-PCR. De drinkwatermonsters met rioolwatereffluent welke behandeld zijn met 5 mg/l vrij chloor (flessen 5 en 6) zijn allemaal negatief met RT-PCR. Wanneer de drinkwatermonsters met een toevoeging van rioolwatereffluent behandeld worden met 0,5 mg/l vrij chloor (flessen 7 en 8) zijn alle monsters negatief voor enterococcen met RT-PCR bij het toepassen van het criterium zoals beschreven in paragraaf 2.6.2.2 (positief bij Ct waarde <27). Echter, in 50% van deze monsters wordt nog signaal met de RT-PCR gevonden met Ct waarden tussen 37,4 en 39,6. Deze hoge Ct waarden impliceren dat in deze monsters nog zeer lage concentraties enterococcen RNA aanwezig zijn. Deze lage concentraties enterococcen RNA worden ook na 11 dagen incubatie nog gedetecteerd met RT-PCR.

Met kweek-PCR worden alleen enterococci aangetoond in monsters waaraan rioleffluent en geen chloor is toegevoegd.

***Samengevat kunnen uit de experimenten met chloor als desinfectiemethode de volgende conclusies worden getrokken:***

- In drinkwater waaraan verdund rioleffluent met een concentratie van *E. coli* van ca. 90 KVE/100 ml of een concentratie enterococci van ca. 12 KVE/100 ml is toegevoegd:
  - Worden *E. coli* en enterococci aangetoond met kweek gedurende minimaal 7 dagen.
  - De concentratie kweekbare *E. coli* loopt gedurende deze 7 dagen terug tot ca. 34 KVE/100 ml.
  - De concentratie kweekbare enterococci loopt gedurende deze 7 dagen terug tot ca. 6 KVE/100 ml.
  - Worden *E. coli* en enterococci aangetoond met RT-PCR gedurende minimaal 11 dagen.
  - Worden *E. coli* en enterococci aangetoond met kweek-PCR gedurende minimaal 11 dagen.
- In, met rioleffluent, besmet drinkwater waaraan chloor is toegevoegd met een concentratie van 5 mg/l en een contacttijd van 30 minuten:
  - Worden geen *E. coli* en enterococci aangetoond met kweek en kweek-PCR.
  - Worden vrijwel geen (één van 16 monsters is positief) *E. coli*'s aangetoond met RT-PCR.
  - Worden geen enterococci aangetoond met RT-PCR.
- In, met rioleffluent, besmet drinkwater waaraan chloor is toegevoegd voor desinfectie met een concentratie van 0,5 mg/l en een contacttijd van 30 minuten:
  - Worden geen *E. coli* en enterococci aangetoond met kweek en kweek-PCR.
  - Worden *E. coli* aangetoond met RT-PCR.
    - Gedurende de incubatietijd van 11 dagen
    - Met, t.o.v. monsters zonder chloordesinfectie, sterk verhoogde Ct waarden wat aangeeft dat chloor bij deze concentratie veel effect heeft op de concentratie detecteerbaar RNA.
  - Worden geen enterococci aangetoond met RT-PCR.

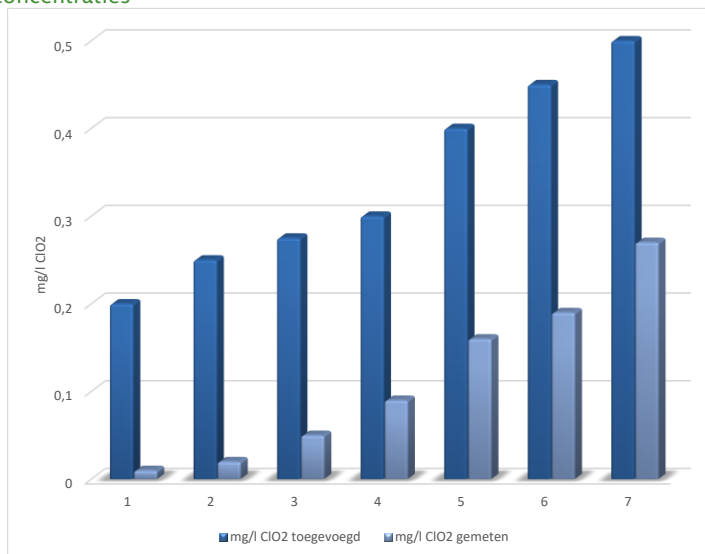
### **3.3.3 Desinfectie met chloordioxide**

Om het effect van desinfectie met chloordioxide (ClO<sub>2</sub>) op de detecteerbaarheid van *E. coli* en enterococci met RT-PCR te onderzoeken zijn er experimenteel besmette monsters samengesteld door een kleine hoeveelheid rioleffluent te mengen met drinkwater. Aan de flessen 5 en 6 en flessen 7 en 8 is chloordioxide toegevoegd tot de gewenste concentratie. Aan flessen 3 en 4 is geen chloordioxide toegevoegd en aan flessen 1 en 2 is geen rioleffluent toegevoegd (Figuur 3).

#### **3.3.3.1 Metingen chloordioxide concentratie in drinkwater**

Experimenten in het verleden hebben duidelijk gemaakt dat wanneer chloordioxide gedoseerd wordt aan drinkwater, de meetbare concentratie lager uitvalt. Chloordioxide metingen zijn direct uitgevoerd om te bepalen hoeveel ClO<sub>2</sub> teruggevonden wordt nadat dit is toegevoegd aan drinkwater Nieuwegein (bemonsterd en uitgevoerd op 12 oktober 2018). De resultaten van dit experiment zijn weergegeven in Tabel 7.

Tabel 7. Chloordioxide concentratie in drinkwater Nieuwegein toevoeging verschillende concentraties



Op basis van deze resultaten is gekozen om 0,2 en 0,4 mg/l ClO<sub>2</sub> te doseren aan de monsters zodat concentraties gerealiseerd worden welke in de praktijk ook worden toegepast (bij pb Baanhoek worden concentraties van 0,04-0,18 mg/l ClO<sub>2</sub> gebruikt).

### 3.3.3.2 Samenstellen monsters

Rioolwatereffluent, afkomstig van RWZI Nieuwegein en bemonsterd op 9 november 2018, is gebruikt om drinkwater Nieuwegein kunstmatig te besmetten. De concentratie *E. coli* en enterococci in het effluent is direct bepaald met de standaard kweekmethoden. Het rioolwatereffluent is 5x verdund met drinkwater en vervolgens gedoseerd aan de flessen 3 t/m 6 (drinkwater bemonsterd op 12 november 2018) tot een concentratie van ±10 KVE/100 ml *E. coli* of enterococci (respectievelijk 0,6 ml en 5,2 ml 5x verdund rioolwatereffluent toegevoegd). Aan de flessen 7 en 8 is ook dezelfde hoeveelheid rioolwatereffluent 5x verdund gedoseerd maar flessen 7 en 8 zijn drinkwater bemonsterd op 13 november 2018. Aan flessen 5 en 6 is chloordioxide toegevoegd tot een concentratie van 0,2 mg/l. Na 30 minuten is het chloordioxide geneutraliseerd met natriumthiosulfaat. Aan de flessen 7 en 8 is één dag later (dag 1) chloordioxide toegevoegd tot een concentratie van 0,4 mg/l en na 30 minuten geneutraliseerd met natriumthiosulfaat. Ter controle zijn twee flessen met drinkwater meegenomen waaraan geen rioolwatereffluent is toegevoegd (fles 1 en 2).

### 3.3.3.3 Analyseresultaten

Analyses zijn uitgevoerd voor detectie van *E. coli* en enterococci met RT-PCR, kweek en kweek-PCR op monsters in enkelvoud van 100 ml direct na het samenstellen van de monsters (t=dag 0). Aansluitend zijn de monsters geïncubeerd bij 15°C in een donkere incubator en zijn er opnieuw analyses uitgevoerd na 1, 2, 3, 4, en 7 dagen incubatie. In Tabel 8 zijn de resultaten van de analyses voor *E. coli* en in Tabel 9 de resultaten van de analyses voor enterococci samengevat.

Tabel 8. Analyseresultaten *E. coli*

		Fles 1 Drinkwater	Fles 2 Drinkwater	Fles 3 Drinkwater + <i>E. coli</i> uit rioleffluent	Fles 4 Drinkwater + <i>E. coli</i> uit rioleffluent	Fles 5 Drinkwater + <i>E. coli</i> uit rioleffluent +0,2 mg/L ClO <sub>2</sub>	Fles 6 Drinkwater + <i>E. coli</i> uit rioleffluent +0,2 mg/L ClO <sub>2</sub>	Fles 7* Drinkwater + <i>E. coli</i> uit rioleffluent +0,4 mg/L ClO <sub>2</sub>	Fles 8* Drinkwater + <i>E. coli</i> uit rioleffluent +0,4 mg/L ClO <sub>2</sub>
RT-PCR (Ct)	Dag 0	N/A	>39,7	30,5	29,1	29,7	30,2		
	Dag 1	>39,6	38,0	29,5	28,2	28,9	27,9	29,5	30,4
	Dag 2	N/A	>39,8	28,4	28,8	29,8	28,3	28,9	29,5
	Dag 3	N/A	>38,1	31,1	30,9			30,7	30,4
	Dag 4	>39,2	N/A	29,8	29,2	34,5	29,1	29,3	29,8
	Dag 7	N/A	>39,9	35,9	33,3	34,5	34,9	29,4	29,6
Kweek (KVE/100 ml)	Dag 0	0	0	15	10	0	0	0	0
	Dag 1	0	0	9	6	0	0	0	0
	Dag 2	0	0	2	7	0	0	0	0
	Dag 3	0	0	5	4	0	0	0	0
	Dag 4								
	Dag 7	0	0	5	4	0	0	0	0
Kweek-PCR (Ct)	Dag 0	38,1	N/A	14,3	15,1	N/A	39,2		
	Dag 1	36,8	38,0	15,6	15,4	37,4	38,8	37,1	N/A
	Dag 2	38,2	37,9	15,1	18,3	38,0	37,7	39,1	36,6
	Dag 3								
	Dag 4								
	Dag 7	37,1	37,2	15,9	16,2	N/A	37,5	36,9	37,1

\*Flessen 7 en 8 zijn op dag 1 van het experiment gestart. In werkelijkheid zijn de resultaten van flessen 7 en 8 dus na 1 dag minder incubatie dan in de tabel staat. N/A is niet aangetoond. In monsters waarin geen *E. coli* werd gedetecteerd zijn weergegeven in groen en monsters waarin wel *E. coli* werd gedetecteerd zijn weergegeven in oranje. De weergegeven Ct waarden zijn de gemiddelde waarden van twee RT-PCR reacties. Als slechts met één van de beide RT-PCR reacties een signaal werd gedetecteerd dan is het gemiddelde weergegeven als >Ct waarde van de reactie waarmee wel signaal werd verkregen. Op de monsters van dag 3 (fles 5 en 6) en 11 is geen RT-PCR, op de monsters van dag 4 en 11 is geen kweek en op de monsters van dag 3, 4 en 11 is geen kweek-PCR uitgevoerd.

De kweekresultaten laten zien dat de watermonsters besmet zijn met een gemiddelde *E. coli* concentratie van  $\pm 13$  KVE/100 ml. Na 7 dagen is de concentratie kweekbare *E. coli* afgenomen naar gemiddeld  $\pm 5$  KVE/100 ml. In het drinkwater waar geen rioolwatereffluent aan is toegevoegd en in zowel de met 0,2 mg/l als 0,4 mg/l chloordioxide behandelde drinkwatermonsters met rioolwatereffluent zijn geen kweekbare *E. coli* aangetoond. Met de RT-PCR is in de drinkwatermonsters (flessen 1 en 2) op alle analysedagen geen *E. coli* aangetoond. In de monsters met drinkwater waaraan rioolwatereffluent is gedoseerd (flessen 3 en 4), is op alle dagen *E. coli* aangetoond met RT-PCR. Ook is er in zowel de met 0,2 mg/l als 0,4 mg/l chloordioxide behandelde drinkwatermonsters met rioolwatereffluent (flessen 5 t/m 8) *E. coli* gedetecteerd met RT-PCR. Een behandeling met 0,2 mg/l of 0,4 mg/l chloordioxide van een drinkwatermonster met  $\pm 13$  KVE/100ml is effectief genoeg om geen *E. coli* meer te kweken, maar niet effectief genoeg om met RT-PCR geen signaal te verkrijgen. Met kweek-PCR worden alleen de onbehandelde monsters waaraan rioolwatereffluent is toegevoegd op alle dagen positief bevonden voor *E. coli*. In de overige monsters, drinkwater zonder rioolwatereffluent en de behandelde (5 mg/l en 0,5 mg/l vrij chloor) monsters drinkwater met rioolwatereffluent, zijn de Ct waarden dusdanig veel hoger dat er hier geen sprake kan zijn van vermeerdering van *E. coli*.

Tabel 9. Analyseresultaten enterococcen

Drinkwater		Fles 1 Drinkwater	Fles 2 Drinkwater	Fles 3 Drinkwater + enterococcen uit riooleffluent	Fles 4 Drinkwater + enterococcen uit riooleffluent	Fles 5 Drinkwater + enterococcen uit riooleffluent +0,2 mg/L ClO <sub>2</sub>	Fles 6 Drinkwater + enterococcen uit riooleffluent +0,2 mg/L ClO <sub>2</sub>	Fles 7* Drinkwater + enterococcen uit riooleffluent +0,4 mg/L ClO <sub>2</sub>	Fles 8* Drinkwater + enterococcen uit riooleffluent +0,4 mg/L ClO <sub>2</sub>
RT-PCR (Ct)	Dag 0	N/A	N/A	33,9	36,7	34,4	33,9		
	Dag 1	N/A	N/A	32,0	33,7	34,0	34,9	33,1	35,0
	Dag 2	N/A	N/A	33,8	34,6	34,9	35,7	34,1	34,7
	Dag 3	N/A	N/A	34,7	35,6			35,6	32,9
	Dag 4	N/A	N/A	34,9	37,0	35,2	32,0	36,7	32,1
	Dag 7	N/A	N/A	>39,3	38,5	35,8	36,2	N/A	33,3
Kweek (KVE/100 ml)	Dag 0	0	0	5	9	7	11	0	0
	Dag 1	0	0	9	11	10	6	0	0
	Dag 2	0	0	8	12	10	3	1	0
	Dag 3								
	Dag 4								
	Dag 7	0	0	7	7	0	7	0	0
Kweek-PCR (Ct)	Dag 0	N/A	N/A	31,0	31,6	26,9	32,4		
	Dag 1	N/A	N/A	34,2	36,4	N/A	30,2	N/A	N/A
	Dag 2	N/A	N/A	34,1	35,8	38,1	33,1	N/A	N/A
	Dag 3								
	Dag 4								
	Dag 7	N/A	N/A			30,3	38,0	N/A	N/A

\*Flessen 7 en 8 zijn op dag 1 van het experiment gestart. In werkelijkheid zijn de resultaten van flessen 7 en 8 dus na 1 dag minder incubatie dan in de tabel staat. N/A is niet aangetoond. In monsters waarin geen enterococcen werd gedetecteerd zijn weergegeven in groen en monsters waarin wel enterococcen werd gedetecteerd zijn weergegeven in oranje. De weergegeven Ct waarden zijn de gemiddelde waarden van twee RT-PCR reacties. Als slechts met één van de beide RT-PCR reacties een signaal werd gedetecteerd dan is het gemiddelde weergegeven als >Ct waarde van de reactie waarmee wel signaal werd verkregen. Op de monsters van dag 3 (fles 5 en 6) en 11 is geen RT-PCR, op de monsters van dag 4 en 11 is geen kweek en op de monsters van dag 3, 4 en 11 is geen kweek-PCR uitgevoerd.

De enterococcen kweekmethode laat zien dat de drinkwatermonsters (fles 3 en 4) waaraan rioolwatereffluent is toegevoegd besmet zijn met een gemiddelde concentratie van ±7 KVE/100 ml. Na 7 dagen incubatie is de concentratie kweekbare enterococcen niet afgenomen. In het drinkwater waar geen rioolwatereffluent aan is toegevoegd zijn geen enterococcen gekweekt. In de drinkwatermonsters met rioolwatereffluent behandeld met 0,2 mg/l chloordioxide (fles 5 en 6) worden op dag 0 gemiddeld ±9 KVE/100 ml enterococcen gekweekt en na 7 dagen is dit afgenomen tot gemiddeld ±4 KVE/100 ml. Behandeling met 0,4 mg/l chloordioxide (fles 7 en 8) van drinkwatermonsters met rioolwatereffluent laat zien dat nog in één monster een enkele enterococ gekweekt wordt. Met de RT-PCR enterococcen zijn in de monsters drinkwater zonder rioolwatereffluent (flessen 1 en 2) geen enterococcen aangetoond. In alle onbehandelde monsters waarbij aan het drinkwater rioolwatereffluent (flessen 3 en 4) is toegevoegd, zijn enterococcen met RT-PCR gedetecteerd. De drinkwatermonsters met rioolwatereffluent welke behandeld zijn met 0,2 mg/l chloordioxide (flessen 5 en 6) waren allen positief met RT-PCR. Op dag 7 in fles 7 na zijn ook in de drinkwatermonsters met rioolwatereffluent behandeld met 0,4 mg/l chloordioxide (flessen 7 en 8) enterococcen met RT-PCR gedetecteerd. Net als bij de detectie van *E. coli* met RT-PCR, is een behandeling van besmet drinkwater met 0,2 mg/l of 0,4 mg/l chloordioxide niet toereikend om geen positief RT-PCR signaal voor enterococcen te verkrijgen. Kweek-PCR laat zien dat er in de drinkwatermonsters zonder rioolwatereffluent geen enterococcen gedetecteerd worden. In de drinkwatermonsters met rioolwatereffluent is dit wel het geval op dag 0, 1 en 2. Na 4 dagen worden er geen enterococcen gedetecteerd. In de met 0,2 mg/l chloordioxide behandelde drinkwatermonsters waaraan rioolwatereffluent is toegevoegd (flessen 5 en 6) zijn alleen op dag 1 in fles 5 geen enterococcen aangetoond met kweek-PCR. Drinkwatermonsters met rioolwatereffluent en behandeld met 0,4 mg/l chloordioxide



(fles 7 en 8) waren op alle gemeten momenten negatief voor enterococchen met de kweek-PCR methode.

***Samengevat kunnen uit de experimenten met chloordioxide als desinfectiemethode de volgende conclusies worden getrokken:***

- In drinkwater waaraan verdund rioolwatereffluent met een concentratie van *E. coli* van ca. 13 KVE/100 ml of een concentratie enterococchen van ca. 7 KVE/100 ml is toegevoegd:
  - Worden *E. coli* en enterococchen aangetoond met kweek gedurende minimaal 7 dagen.
  - Worden *E. coli* en enterococchen aangetoond met RT-PCR gedurende minimaal 7 dagen.
  - Worden *E. coli* en enterococchen aangetoond met kweek-PCR gedurende minimaal 7 dagen.
- In, met rioolwatereffluent, besmet drinkwater waaraan chloordioxide is toegevoegd met een concentratie van 0,2 mg/l en een contacttijd van 30 minuten:
  - Worden geen *E. coli* aangetoond met kweek en kweek-PCR.
  - Wordt *E. coli* aangetoond met RT-PCR gedurende minimaal 7 dagen
  - Worden enterococchen aangetoond kweek en kweek-PCR.
    - De toegepaste desinfectiedosis is niet voldoende geweest om alle enterococchen te inactiveren.
  - Worden enterococchen aangetoond met RT-PCR gedurende minimaal 7 dagen
- In, met rioolwatereffluent, besmet drinkwater waaraan chloordioxide is toegevoegd voor desinfectie met een concentratie van 0,4 mg/l en een contacttijd van 30 minuten:
  - Worden geen *E. coli* aangetoond met kweek en kweek-PCR.
  - Wordt *E. coli* aangetoond met RT-PCR gedurende minimaal 7 dagen.
  - Worden vrijwel geen enterococchen aangetoond met kweek en kweek-PCR.
    - In één monster worden enterococchen gekweekt met een concentratie van 1 KVE/100 ml
  - Worden enterococchen aangetoond met RT-PCR gedurende minimaal 7 dagen.
- De toepassing van chloordioxide veroorzaakt, bij de analyseresultaten van RT-PCR, geen duidelijke toename van de Ct waarden wat aangeeft dat de toepassing van chloordioxide bij de toegepaste concentraties en contacttijden geen effect heeft op de concentratie detecteerbaar RNA.

## 4 Conclusies en discussie

### 4.1 Metingen in de zuivering

De metingen met RT-PCR en kweekmethoden uitgevoerd op het water van productiebedrijf Berenplaat laten zien dat kweekbare *E. coli* aanwezig is in het ruwe oppervlaktewater en in deze zuivering incidenteel de UV installatie bereiken. Na de UV desinfectiestap wordt geen kweekbare *E. coli* meer waargenomen. Als er in het water van Berenplaat RT-PCR wordt toegepast voor het meten van *E. coli* en enterococci dan worden deze indicatororganismen ook regelmatig aangetoond in het water na de UV installatie en incidenteel ook in het uitgaande reine water waaraan in de laatste zuiveringsstap ook nog een lage concentratie chloordioxide is toegevoegd. Deze waarnemingen worden, door zowel Aqualab Zuid als KWR, gedaan op duplo watermonsters zodat niet waarschijnlijk is dat dit het gevolg is van methodische verschillen in de experimentele uitvoering tussen deze laboratoria. Het aantonen van indicatororganismen in het uitgaande reine water van Berenplaat met RT-PCR en niet met kweek bevestigt de resultaten van routinematige metingen welke zijn uitgevoerd in de periode na de problemen in Vlaardingen aan het einde van 2017 waarbij indicatororganismen werden aangetoond met RT-PCR in het uitgaande reine water. Om een indruk te krijgen van de eventuele doorslag van RT-PCR door de zuivering zijn ook metingen uitgevoerd bij productiebedrijf Braakman. Bij de zuivering van Braakman is, net als bij Berenplaat, de fysieke verwijdering van fecale verontreinigingen door filtratieprocessen gering maar berust een groot deel van de microbiologische veiligheid op inactivatie met UV en het toepassen van  $\text{ClO}_2$  aan het einde van de zuivering. In de reine watermonsters afkomstig van Braakman wordt geen *E. coli* gedetecteerd met RT-PCR maar in één monster wordt wel een signaal waargenomen voor enterococci. Wellicht dat in deze zuivering ook incidenteel doorslag plaats vindt van, uit het oppervlaktewater afkomstige, geïnactiveerde (niet kweekbare) enterococci. Deze enkele waarneming is echter gedaan bij onderzoek van een beperkt aantal monsters. Uitgebreider onderzoek is nodig om een goed beeld te krijgen van het passeren van geïnactiveerde, met RT-PCR detecteerbare, indicatororganismen door de zuivering van Braakman. Ook het vergelijken van meetresultaten verkregen vanuit de AMVD kan inzicht geven in hoeverre kweekbare fecale indicatororganismen bij Braakman (waar ook UV desinfectie als primaire desinfectiestap wordt toegepast), zoals bij Berenplaat het geval is, de UV reactor bereiken. In de onderzochte watermonsters afkomstig van grondwaterzuiveringen (Baanhoek en Huijbergen) worden met RT-PCR (en kweek) geen *E. coli* en enterococci aangetoond. Geconcludeerd kan worden dat *E. coli* en enterococci cellen de zuivering van Berenplaat kunnen passeren en na passage nog detecteerbaar zijn met RT-PCR maar niet meer kweekbaar zijn. Het is, met de vanuit dit onderzoek beschikbare data, nog niet duidelijk of dit vooral optreedt in de zuivering van Berenplaat of dat dit te verwachten is in het reine water van meerdere zuiveringen waarbij fecaal besmet oppervlaktewater wordt gezuiverd. Uitgebreid onderzoek van watermonsters afkomstig van diverse oppervlaktewaterzuiveringen zal hier meer duidelijkheid over geven. Daarnaast kunnen metingen, welke zijn verricht in het kader van de AMVD (Analyse microbiologische veiligheid drinkwater), inzicht geven bij welke zuiveringen indicatororganismen de UV reactor bereiken en er te verwachten is dat RT-PCR positieve watermonsters de zuivering kunnen verlaten zonder dat er kweekbare indicatororganismen in deze monsters aanwezig zijn.

## 4.2 Effect van desinfectie met UV op RT-PCR

De uitgevoerde experimenten waarbij UV is toegepast voor het desinfecteren van indicatororganismen, afkomstig uit rioolwatereffluent, laten zien dat de toegepaste dosis van 40 mJ/cm<sup>2</sup> ervoor zorgt dat de aanwezige *E. coli* en enterococci niet meer kweekbaar zijn. Met RT-PCR zijn *E. coli* en enterococci nog detecteerbaar gedurende een periode van minimaal 11 dagen na UV bestraling. Gedurende de incubatieperiode neemt de concentratie, met RT-PCR gemeten 16S RNA, niet af (op basis van de Ct waarden van de RT-PCR) waardoor te verwachten is dat *E. coli* en enterococci ook nog langer dan 11 dagen detecteerbaar zullen zijn met RT-PCR. Dit geeft aan dat er weinig effect is van de UV bestraling op de detecteerbaarheid van het 16S ribosomaal RNA met RT-PCR. Vergelijkbare resultaten zijn verkregen in een recente studie naar het effect van UV op de detecteerbaarheid van het DNA (Nocker, Shah et al. 2018) of het RNA (Zhang, Ye et al. 2015, Zhang, Guo et al. 2018) van *E. coli* in watermonsters met respectievelijk PCR of RT-PCR. Ook in deze studies werd gevonden dat er zelfs bij bestraling met hogere doses UV (172 en 302 mJ/cm<sup>2</sup>) weinig tot geen effect te meten was op de detecteerbaarheid van het bacterieel DNA of RNA.

Het is opvallend dat het 16S rRNA lange tijd zeer stabiel (>11 dagen) is in de UV bestraalde *E. coli* en enterococci, dit is waarschijnlijk het gevolg van het werkingsmechanisme van UV bestraling. Bestraling met UV blijkt alleen effect te hebben op de nucleïnezuren (DNA en RNA) en kweekbaarheid, maar geen effect op de permeabiliteit van de celmembraan (Cho, Kim et al. 2010) waardoor de nucleïnezuren beschermd blijven tegen enzymatische afbraak. Doordat UV geen effect heeft op de membraanpermeabiliteit zijn methoden waarbij kleurstoffen, zoals PMA of EMA in combinatie met PCR (Nocker, Sossa et al. 2007), waarmee deze permeabiliteit wordt gebruikt als merker voor levensvatbaarheid, niet bruikbaar om onderscheid te maken tussen levensvatbare en niet-levensvatbare cellen bij toepassing van UV (Weigel, Nguyen et al. 2017).

Ondanks dat bestraling met UV effect heeft op de bacteriële nucleïnezuren wordt er in de uitgevoerde experimenten geen effect waargenomen op de resultaten van de RT-PCR analyses. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de toegepaste dosis UV. Deze lage dosis is onvoldoende om de schade zichtbaar te maken met RT-PCR maar voldoende om een einde te maken aan de kweekbaarheid van de bacteriën. Diverse studies laten zien dat schade aan DNA wel zichtbaar gemaakt kan worden door het toepassen van PCR methoden waarbij amplificatie plaats vindt van een langer fragment. Door toepassing van een langer fragment wordt de kans groter dat schade wordt aangebracht in het fragment dat wordt geamplificeerd met PCR (Lehle, Hildebrand et al. 2014, Nocker, Shah et al. 2018). Een andere mogelijkheid om het effect van UV op de nucleïnezuren te kunnen meten is het toepassen van RT-PCR methoden welke gericht zijn op detectie van sequenties van het Pre-rRNA (Do, Weigel et al. 2014, Weigel, Nguyen et al. 2017). Deze Pre-rRNA moleculen zijn zeer dominant aanwezig in actieve cellen na korte blootstelling aan nutriënten.

In een aantal studies wordt genoemd dat bestraling met UV kan leiden tot een "Viable but not-culturable" (VBNC) staat van *E. coli* (Zhang, Ye et al. 2015, Zhang, Guo et al. 2018). Deze conclusie wordt in deze studies getrokken doordat er na bestraling cellen zijn ontstaan die niet meer kweekbaar zijn maar nog wel een intact membraan hebben en daarnaast metabole activiteit en genexpressie vertonen. Het is daarbij echter niet duidelijk of deze UV bestraalde cellen werkelijk levensvatbaar zijn en in hoeverre UV bestraalde pathogenen nog in staat zijn om infectie te veroorzaken. Om te onderzoeken of de UV bestraalde indicatororganismen in deze studie wellicht kweekbaar zijn onder

niet-selectieve omstandigheden is kweek-PCR toegepast. Bij het toepassen van kweek-PCR is onderzocht of een voorkweek in een rijk vloeibaar kweekmedium, zoals eerder beschreven (Zhao, Zhong et al. 2017), kan worden gebruikt om het herstel van kweekbaarheid (resuscitatie) van VBNC bacteriën te stimuleren. De toegepaste kweek-PCR lijkt bruikbaar om de aanwezigheid van kweekbare *E. coli* in de monsters vast te stellen en de methode lijkt, vanwege de beperkte groei in het toegepaste medium, minder bruikbaar om de aanwezigheid van kweekbare enterococconen vast te stellen. De analyses met kweek-PCR geven geen aanwijzingen voor het optreden van resuscitatie van VBNC cellen van *E. coli*. Dit kan betekenen dat resuscitatie van de VBNC *E. coli* niet mogelijk is of dat de toegepaste methode niet geschikt is om resuscitatie vast te stellen.

De kweekresultaten van de monsters laten ook zien dat er gedurende de 11 dagen incubatie in het donker geen "Dark repair" van de UV geïnactiveerde indicatororganismen (Hijnen, Beerendonk et al. 2006) plaatsvindt. Het is te verwachten dat de toegepaste UV dosis die in dit onderzoek is toegepast te hoog is om repair mogelijk te maken en dat "Dark repair" van geïnactiveerde bacteriën alleen optreedt bij lage druk en lagere UV doses van minder dan 10 mJ/cm<sup>2</sup> (Zimmer and Slawson 2002, Hu, Chu et al. 2005).

#### 4.2.1 Implicaties voor toepassing van RT-PCR na UV desinfectie in de praktijk

De resultaten laten zien dat het toepassen van UV met een dosis van 40 mJ/cm<sup>2</sup> voor het desinfecteren van fecaal besmet drinkwater ervoor zorgt dat *E. coli* en enterococconen niet meer detecteerbaar zijn met kweek maar lange tijd (> 11 dagen) nog wel met RT-PCR. Dit resultaat zorgt ervoor dat verschillen kunnen optreden tussen kweek en RT-PCR bij de analyse van gedistribueerd drinkwater afkomstig van oppervlaktewaterzuiveringen waarbij UV wordt toegepast en detecteerbare concentraties van indicatororganismen de UV reactor bereiken, zoals het geval is bij productiebedrijf Berenplaat. Hierdoor is RT-PCR geschikt om de afwezigheid van indicatororganismen vast te stellen, maar lijkt deze techniek niet altijd geschikt voor het vaststellen van fecale verontreinigingen in het gedistribueerde water van Berenplaat.

Onderzoek van drinkwater afkomstig van andere zuiveringen waarbij UV wordt toegepast voor desinfectie van oppervlaktewater is nodig om inzicht te krijgen in de bruikbaarheid van RT-PCR voor het vaststellen van fecale verontreinigingen in gedistribueerd drinkwater afkomstig van dit type zuiveringen. Het onderzoeken van de meetgegevens van de AMVD's van verschillende zuiveringen kan als startpunt van dit onderzoek worden gebruikt. Hierbij zal de focus liggen op het onderzoeken van zuiveringen waarbij UV als primaire desinfectiestap wordt toegepast aan het einde van de zuivering. In deze zuiveringen zullen meetgegevens van het influent van de UV reactor een eerste indruk geven over de mogelijkheid voor het aantonen van niet kweekbare indicatoren met RT-PCR in afgeleverde water. Aanvullend kunnen praktijkmetingen bij deze zuiveringen kan aansluitend duidelijk maken in hoeverre niet kweekbare indicatororganismen in het afgeleverde water detecteerbaar zijn met RT-PCR.

#### 4.3 Effect van desinfectie met chloor op RT-PCR

De uitgevoerde experimenten waarbij chloor is toegepast voor het desinfecteren van indicatororganismen, afkomstig uit rioolwatereffluent, laat zien dat een contacttijd van 30 minuten met een dosis van 5 mg/l en een dosis van 0,5 mg/l ervoor zorgt dat de

aanwezige *E. coli* en enterococci niet meer kweekbaar zijn. Bij het gebruik van RT-PCR worden er, bij een dosis van 5 mg/l en 0,5 mg/l, geen enterococci meer aangetoond. Bij een dosis van 0,5 mg/l wordt met RT-PCR in vrijwel (één monster uitgezonderd) alle monsters nog *E. coli* aangetoond terwijl er vrijwel (één monster uitgezonderd) geen *E. coli* meer wordt aangetoond bij toepassing van een dosis van 5 mg/l. Het is waarschijnlijk dat detectie van *E. coli* gedeeltelijk wordt veroorzaakt door de relatief hoge concentratie *E. coli* (ca. 90 KVE/100 ml) in de samengestelde monsters. Op basis van de Ct waarden (een globale maat voor de concentratie RNA) is duidelijk dat de Ct waarden van de RT-PCR reacties t.g.v. de behandeling met 0,5 mg/l vrij chloor in de besmette monsters sterk toenemen wat aangeeft dat deze dosis chloor resulteert in een sterke afname van de concentratie RNA in de monsters. Een concentratie van 0,5 mg/l vrij chloor met een contacttijd van 30 minuten zorgt in de onderzochte monsters (met een vrij hoge *E. coli* concentratie van ca. 90 KVE/100 ml) niet voor het volledig verdwijnen van het RT-PCR signaal maar zorgt wel voor een gemiddelde toename van de Ct waarde van ca 8.1 cycli. Deze toename van de Ct waarde impliceert een concentratieverschil van een factor 275 (indicatief). Het is te verwachten dat langere contacttijden van lage chloorconcentraties zullen resulteren in het verlagen (verdwijnen) van het RT-PCR signaal.

#### 4.3.1 Implicaties voor toepassing van RT-PCR na toepassing van chloor in de praktijk

De experimenten in dit onderzoek laten zien dat chloor veel effect heeft op het resultaat van RT-PCR analyses en maken duidelijk dat toepassing van 5 mg/l chloor zorgt voor het verdwijnen van (vrijwel) al het signaal met RT-PCR. De keuze voor korte contacttijden (30 min.) en de onbedoelde toevoeging van relatief hoge concentratie *E. coli* zorgt ervoor dat met deze experimenten "worst case" situaties zijn gecreëerd. De toevoeging van 5 mg/l chloor was in dit onderzoek bedoeld om behandeling met chloor na calamiteiten na te bootsen. De resultaten maken duidelijk dat met deze concentratie vrijwel al het RT-PCR signaal verdwenen is en er is te verwachten dat ook het laatste restje signaal zal verdwijnen bij het toepassen van een langere contacttijd zoals in de praktijk vaak gebruikelijk is. Het toepassen van een concentratie van 0,5 mg/l was bedoeld om situaties waarbij gechloreerd drinkwater wordt gedistribueerd na te bootsen. Bij deze situatie is er met RT-PCR geen signaal voor enterococci meer aanwezig maar blijft *E. coli* nog wel detecteerbaar. Het is waarschijnlijk dat de relatief hoge, en voor de praktijk niet waarschijnlijke, concentratie *E. coli* hierbij een rol speelt en dat het signaal van lagere concentraties *E. coli* mogelijk wel zou zijn afgenomen tot beneden de detectiegrens van de methode. Daarnaast is te verwachten dat een langere contacttijd, zoals het geval is bij distributie van gechloreerd drinkwater, ook zal resulteren in verdere afname van het signaal met RT-PCR.

Samengevat geven de resultaten aan dat te verwachten is dat kweek en RT-PCR analyses in veel situaties zullen overeenkomen bij toepassing van chloor in de praktijk. Er kan echter niet uitgesloten worden dat er situaties zullen zijn waarbij met kweek geen en met RT-PCR nog wel indicatoren worden aangetoond na behandeling met chloor. Uitgebreider experimenten met variërende chloor concentraties en contacttijden zijn noodzakelijk om een exact beeld te krijgen van het effect van chloor op RT-PCR signaal onder variërende omstandigheden.

#### 4.4 Effect van desinfectie met chloordioxide op RT-PCR

De in dit onderzoek toegepaste concentraties van 0,2 mg/l en 0,4 mg/l ClO<sub>2</sub> zorgde ervoor dat er geen *E. coli* meer aantoonbaar was met kweek. Voor de inactivatie van enterococci blijkt chloordioxide minder effectief, toepassing van 0,2 mg/l veroorzaakt

geen afname van de kweekbaarheid terwijl er bij toepassing van 0,4 mg/l ook nog kweekbare enterococci overblijven in één monster. Dit is in overeenstemming met eerder onderzoek waarin beschreven is dat enterococci minder gevoelig zijn voor desinfectie met chloordioxide dan *E. coli* (Grunert, Frohnert et al. 2018). Bij het toepassen van RT-PCR voor het detecteren van *E. coli* en enterococci wordt er geen effect waargenomen van desinfectie op detecteerbaarheid van zowel *E. coli* als enterococci en zijn ook geen duidelijke aanwijzingen zichtbaar voor afname van de concentratie RNA t.g.v. het gebruik van chloordioxide.

#### **4.4.1 Implicaties voor toepassing van RT-PCR na toepassing van chloordioxide in de praktijk**

De resultaten van de analyses laten zien dat de lage concentratie chloordioxide, zoals die wordt toegepast in pb Baanhoek en Berenplaat, geen effect heeft op analyses met RT-PCR. Het is dus te verwachten dat indicatororganismen de zuivering kunnen verlaten, die niet kweekbaar maar wel detecteerbaar zijn met RT-PCR, in situaties waar lage concentraties chloordioxide worden toegepast als desinfectiestap. Verder onderzoek bij vergelijkbare zuiveringen waar ook chloordioxide wordt toegepast zal inzicht geven in hoeverre dit effect ook relevant is bij andere drinkwaterzuiveringen.

## 5 Referenties

- Cho, M., J. Kim, J. Y. Kim, J. Yoon and J. H. Kim (2010). "Mechanisms of Escherichia coli inactivation by several disinfectants." Water Res **44**(11): 3410-3418.
- Do, J. S., K. M. Weigel, J. S. Meschke and G. A. Cangelosi (2014). "Biosynthetic enhancement of the detection of bacteria by the polymerase chain reaction." PLoS One **9**(1): e86433.
- Grunert, A., A. Frohnert, H. C. Selinka and R. Szewzyk (2018). "A new approach to testing the efficacy of drinking water disinfectants." Int J Hyg Environ Health **221**(8): 1124-1132.
- Harmesen, D. (2004). "Protocol Collimated Beam UV." BTO 2004.014.
- Heijnen, L. (2017). "Validation of a real-time RT-PCR method for rapid detection of E. coli in distributed drinking water." KWR report 2017.098
- Heijnen, L. (2018). "Validatie van een Real-time RT-PCR methode voor snelle detectie van intestinale enterococci in gedistribueerd drinkwater." BTO rapport 2018.070
- Heijnen, L. and G. Medema (2006). "Quantitative detection of E. coli, E. coli O157 and other shiga toxin producing E. coli in water samples using a culture method combined with real-time PCR." J Water Health **4**(4): 487-498.
- Hijnen, W. A., E. F. Beerendonk and G. J. Medema (2006). "Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review." Water Res **40**(1): 3-22.
- Hu, J. Y., X. N. Chu, P. H. Quek, Y. Y. Feng and X. L. Tan (2005). "Repair and regrowth of Escherichia coli after low- and medium-pressure ultraviolet disinfection." Water Science and Technology: Water Supply **5**(5): 101-108.
- Lehle, S., D. G. Hildebrand, B. Merz, P. N. Malak, M. S. Becker, P. Schmezer, F. Essmann, K. Schulze-Osthoff and O. Rothfuss (2014). "LORD-Q: a long-run real-time PCR-based DNA-damage quantification method for nuclear and mitochondrial genome analysis." Nucleic Acids Res **42**(6): e41.
- Nocker, A., M. Shah, B. Dannenmann, K. Schulze-Osthoff, J. Wingender and A. J. Probst (2018). "Assessment of UV-C-induced water disinfection by differential PCR-based quantification of bacterial DNA damage." J Microbiol Methods **149**: 89-95.
- Nocker, A., K. E. Sossa and A. K. Camper (2007). "Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR." J Microbiol Methods **70**(2): 252-260.
- Weigel, K. M., F. K. Nguyen, M. R. Kearney, J. S. Meschke and G. A. Cangelosi (2017). "Molecular Viability Testing of UV-Inactivated Bacteria." Applied and Environmental Microbiology **83**(10): e00331-00317.
- Zhang, S., L. Guo, K. Yang, Y. Zhang, C. Ye, S. Chen, X. Yu, W. E. Huang and L. Cui (2018). "Induction of Escherichia coli Into a VBNC State by Continuous-Flow UVC and Subsequent Changes in Metabolic Activity at the Single-Cell Level." Front Microbiol **9**: 2243.
- Zhang, S., C. Ye, H. Lin, L. Lv and X. Yu (2015). "UV disinfection induces a VBNC state in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa." Environ Sci Technol **49**(3): 1721-1728.
- Zhao, X., J. Zhong, C. Wei, C. W. Lin and T. Ding (2017). "Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens." Front Microbiol **8**: 580.
- Zimmer, J. L. and R. M. Slawson (2002). "Potential Repair of Escherichia coli DNA following Exposure to UV Radiation from Both Medium- and Low-Pressure UV Sources Used in Drinking Water Treatment." Applied and Environmental Microbiology **68**(7): 3293-3299.