



KWR 2022.136 | December 2022

Snelle detectie van een fecale besmetting in zwemwater

Samenwerkingspartners



Rapport

Snelle detectie van een fecale besmetting in zwemwater

KWR 2022.136 | December 2022

Opdrachtnummer

403466-001

Projectmanager

Ton van Leerdam, Leonie Borstlap

Opdrachtgever

Aquon, Partners4UrbanWater, Sopachem, Gemeente Breda, Waterschap Brabantse Delta, Hoogheemraadschap Delfland, Waternet, microLAN, Orvion, Hoogheemraadschap De Stichtse Rijnlanden, Hoogheemraadschap Rijnland, Waterproef, STOWA, Deltares, Rijkswaterstaat, Rijkswaterstaat Oost-Nederland, Aqualab Zuid, Waterschap De Dommel, Aqualysis

Auteurs

Nikki van Bel (KWR Water, hoofdstuk 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9), Bas van der Zaan (Deltares [t/m 1-9-2022] en KWR Water [vanaf 1-9-2022], hoofdstuk 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9), Anniek de Jong (Deltares, hoofdstuk 2, 3, 4), Jeroen Langeveld (Partners4Urban Water, hoofdstuk 5, 8, 9), Aleida Hommes (Orvion [t/m 1-9-2022] en KWR Water [vanaf 1-9-2022], 8, 9), Leo Heijnen (KWR Water, hoofdstuk 3, 8, 9)

Kwaliteitsborger

Prof. Dr. Gertjan Medema

Verzonden naar

Eppe Nieuwenhuis, Rinske Sonneveld (Aquon); Jeroen Langeveld (Partners4UrbanWater); Thomas Dammers (Sopachem); Bas Hoefijzers (Gemeente Breda); Laura Seelen (Brabantse Delta); Rob Bovelander, Rob Hoefnagel (Hoogheemraadschap Delfland); Ron van der Oost, Joost Stoffels (Waternet); Joep Appels (microLAN); Marc van Bommel, Xinhao Ruan, Connor de Adelhart Toorop (Orvion); Marijan Uytewaal-Aarts (Hoogheemraadschap De Stichtse Rijnlanden); Marco Vaartjes (Hoogheemraadschap Rijnland); Martin Wesseling, Willie van den Berg (Waterproef); Tessa van

der Wijngaart (STOWA); Anniek de Jong (Deltares); Hans Ruiters (Rijkswaterstaat); Imke Leenen, Marco Tijnagel, Henk van Rheede (Rijkswaterstaat Oost-Nederland); Liesbeth Vissers (Aqualab Zuid); Etteke Wypkema (Waterschap Brabantse Delta); Maarten van Schijndel, Henk Tamerus (Waterschap De Dommel); Angelique Vollenbroek – Snuiverink (Aqualysis)

Keywords

E. coli, snelle detectie, sensoren, TKI, fecale verontreinigingen, on site methode

Jaar van publicatie
2022

Meer informatie

dr. ir. Nikki van Bel

T 030-6069516

E Nikki.van.Bel@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511

E info@kwrwater.nl

I www.kwrwater.nl

The logo for KWR (Kwaliteitswater Rijkswaterstaat) features the letters 'KWR' in a bold, blue, sans-serif font. The 'K' and 'R' are larger and more prominent than the 'W'.

December 2022 ©

Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - 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.

Voorwoord

Dit project is een nauwe samenwerking geweest tussen alle projectpartners, waarbij het onderzoek is geleid door Deltares (Bas van der Zaan), Partners4UrbanWater (Jeroen Langeveld) en KWR Water (Nikki van Bel en Gertjan Medema). Een groot deel van de testen is door de projectpartners uitgevoerd zodat zo veel mogelijk partners ervaring krijgen met de nieuwe methoden en tegelijk geëvalueerd kan worden of en hoe toepassing van deze methoden in de praktijk uitgevoerd kan worden.

We willen alle betrokkenen van de projectpartners bedanken voor hun bijdragen aan het project:

- Aanleveren veldtestlocaties (waterschappen, gemeente Breda, Waternet, Stichting Marineterrein)
- Monsterneming voor MPN en mobiele qPCR (Waterproef, Aquon, Aqualysis),
- Uitvoeren mobiele qPCR-analyses (Aquon, Aqualysis),
- Uitvoering validatie-experimenten (KWR, Deltares),
- Levering van apparatuur en reagentia, inclusief training en begeleiding (microLAN, Sopachem, Orvion)
- Mogelijk maken van de veldtestlocaties (gemeente Breda, Waterschap Brabantse Delta, Waternet, Stichting Marineterrein, Rijkswaterstaat-ON, H2Oké, Partners4UrbanWater)
- Onderzoeksleders en interpretatie van resultaten (Deltares, Partners4UrbanWater, KWR Water)

Door het combineren van testen op verschillende veldlocaties en validatiestudies in het laboratorium is geprobeerd om vanuit verschillende invalshoeken duidelijk te krijgen of en hoe snelle detectiemethoden voor *Escherichia coli* (*E.coli*) in zwemwater een toegevoegde waarde kunnen zijn voor waterbeheerders. Doel van het project was niet om een snelle detectiemethode zo uitgebreid te valideren dat deze opgenomen wordt in de zwemwaterrichtlijn, of vergelijkbare documenten. De resultaten en overkoepelende conclusies van het uitgevoerde onderzoek dragen bij aan een beter inzicht in de microbiologische kwaliteit van oppervlaktewater.

Samenvatting

Toegevoegde waarde van snelle detectiemethoden voor *E. coli* in zwemwater

Naast de officiële zwemlocaties in natuur en stadswater worden gemeenten steeds vaker geconfronteerd met burgers die bij goed weer (soms massaal) zwemmen/recreëren in stadswater. Ook willen gemeenten dat het stadswater toegankelijk en geschikt is voor activiteiten als sportevenementen (zoals triatlons) en benefietevenementen (zoals city swims). Gezond zwemwater is daarbij van cruciaal belang, maar de kwaliteit van oppervlaktewater is aan sterke variaties onderhevig, onder andere door piekverontreinigingen via riooloverstorten en lozingen. Deze hebben bij (zwem)evenementen geleid tot ziekte onder de deelnemers (onder andere in Alphen, Utrecht, Amsterdam). Ook beheerders van aangewezen zwemlocaties worden soms geconfronteerd met piekverontreinigingen.

Volgens de Europese zwemwaterrichtlijn moet het aantal *E. coli* bacteriën van officieel aangewezen zwemwateren regelmatig worden bepaald. Daarnaast worden er in Nederland grenswaarden gehanteerd voor een acuut risico. Voor niet-officiële zwemwaterlocaties waar evenementen worden georganiseerd is door de STOWA een handreiking ontwikkeld. Nadeel van beide documenten is dat deze zijn gebaseerd op de *E. coli* kweekmethode, die pas na 24 tot 48 uur resultaat geeft, en dat de metingen met tussenposen van soms meerdere weken worden uitgevoerd. Het geeft geen informatie over de actuele zwemwaterkwaliteit. Hierdoor is het niet mogelijk om tijdig te reageren met maatregelen op sterke variaties in microbiologische waterkwaliteit en korte verontreinigingspieken, b.v. door hevige regenbuien gevolgd door bijvoorbeeld riooloverstorten of afspoeling.

Met een snelle, on-site methoden om de actuele zwemwaterkwaliteit op de dag van een evenement te bepalen, en te bepalen of een grenswaarde wordt overschreden, kan het actuele gezondheidsrisico ingeschat worden en dus of het evenement wel of niet door kan gaan of dat de officiële zwemlocatie gesloten moet worden.

Doel van het project

In dit project wordt praktijk ervaring opgedaan met twee typen snelle detectiemethoden voor fecale verontreinigingen (mobiele qPCR en de BACTcontrol) en vergeleken met de standaard kweek (MPN Colilert)methoden zoals die staan genoemd in o.a. de Europese zwemwaterrichtlijn. Naast een validatieonderzoek in het laboratorium wordt geleerd van praktijktesten met mobiele qPCR bij meerdere zwemlocaties en drie pilot experimenten met de BACTcontrol. De opgedane ervaring en prestaties van de methoden wordt verwerkt tot concrete aanbevelingen om de methoden in te zetten in de praktijk om fecale verontreinigingen te monitoren.

Validatie snelle detectiemethoden *E. coli*

In het laboratorium is rioolwater in verschillende verhoudingen verdund in oppervlaktewater, vervolgens is in deze verdunningen de *E. coli* concentratie gemeten met de mobiele qPCR, laboratorium qPCR, BACTcontrol en de MPN-methode (Colilert). De MPN-methode is gebaseerd op kweek en 24 uur na de start van de analyse is het resultaat beschikbaar. Met mobiele qPCR wordt binnen twee uur in het veld bepaald hoeveel DNA van *E. coli* aanwezig was in het watermonsters. Van twee leveranciers is de mobiele qPCR-techniek getest: Sopachem en de Udetect van Orvion. De BACTcontrol, gemaakt door microLAN, bepaalt de hoeveelheid enzymatische activiteit van een enzym dat specifiek is voor *E. coli* bacteriën. Binnen 30 minuten tot twee uur geeft de meting een resultaat. Het doel van deze vergelijking was om een inschatting te maken of er op basis van de nieuwe snelle technieken een betrouwbare uitspraak kan worden gedaan over de fecale verontreinigingen zoals die op basis van MPN-

methode zou zijn. Uit deze vergelijking blijkt dat er een goede correlatie is tussen zowel qPCR als BACTcontrol en de MPN-methode (Colilert). Het signaal van de BACTcontrol neemt in de loop van de tijd af naarmate *E. coli* bacteriën ouder worden. Voor de qPCR methode geldt dat als deze mobiel (oftewel: *on site*) wordt uitgevoerd, waarvoor een specifieke kit is ontwikkeld, de betrouwbaarheid van de resultaten minder is dan als de qPCR in het lab wordt uitgevoerd.

Detectie *E. coli*, leptospiren en cyanotoxinegenen in zwemwater

Tijdens de zomer van 2020 is een pilotstudie uitgevoerd naar de toepassing van Udetect voor detectie van *E. coli*, *Leptospira*, en toxische blauwalgen op elf zoetwaterlocaties en drie zoutwaterlocaties. Het doel van deze pilot studie is het demonstreren dat DNA-analyses voor meerdere parameters tegelijkertijd in het veld kunnen worden uitgevoerd, en het opdoen van ervaring met mobiele qPCR door reguliere monsternemers bij zwemwaterlocaties. De mobiele qPCR van Udetect kan gebruikt worden om simultaan de aanwezigheid van *E. coli* en blauwalgtoxinegenen te bepalen in diverse oppervlaktewateren en zoutwaterlocaties. Deze methode maakt het mogelijk om snel en gedegen en zonder specialistische middelen een DNA-isolatie in het veld uit te voeren, wat de weg opent naar het gebruik van mobiele qPCR door waterbeheerders. Het detecteert te hoge concentraties van *E. coli* (>1800 cellen/100 mL volgens MPN) en kan toxische blauwalgen detecteren vanaf 2×10^3 gen kopieën/mL toxinegenen. Door lage concentraties of afwezigheid van *Leptospira* in de bemonsterde wateren is het te vroeg om conclusies te trekken voor *Leptospira* detectie.

BACTcontrol als Early Warning systeem voor afsluiting van de Spiegelwaal

Een goede doorstroming van de Spiegelwaal, een nevengeul van de Waal bij Nijmegen, in het voorjaar en zomer gewenst vanwege de chemische waterkwaliteit. Echter, vanwege een goede microbiologische zwemwaterkwaliteit wordt momenteel de instroom gedurende het zwemseizoen (tijdelijk) afgesloten. In dit project is getest of een BACTcontrol-systeem dat bovenstrooms meet, geschikt is om te waarschuwen indien er een fecale besmetting aan komt waarop vervolgens de Spiegelwaal tijdelijk gesloten kan worden. Hiervoor hebben in de zomer van 2020 twee BACTcontrol-systemen continu gemeten bij de Spiegelwaal bij Nijmegen en bovenstrooms bij Bimmen. De twee BACTcontrol-systemen laten voor een aantal grote pieken dezelfde trend zien, al zijn er weinig grote pieken gemeten. Niet alle andere (kleinere) pieken in enzymactiviteit in Nijmegen worden ook in Bimmen gedetecteerd en andersom. Dit komt vermoedelijk o.a. doordat de locatie in Nijmegen ook wordt beïnvloed door lokale lozingen die niet Bimmen beïnvloeden, maar mogelijk ook doordat 'oudere' lozingen door de BACTcontrol niet worden gemeten. Vanwege de verschillende reisafstanden en herkomsten van de potentiële vervuiling ziet de BACTcontrol niet alle pieken en is daarom niet geschikt als Early Warning om de Spiegelwaal op basis van BACTcontrol data uit Bimmen.

Monitoring zwemwater Marineterrein Amsterdam

Waternet en Projectbureau Marineterrein hebben de afgelopen jaren, en nu nog steeds, op het Marineterrein in het centrum van Amsterdam meerdere methoden getest om meer inzicht te krijgen in de microbiologische waterkwaliteit en hoe deze varieert gedurende het zwemseizoen en eventueel verbeterd kan worden. Hierbij is ook de geschiktheid van de BACTcontrol op de locatie onderzocht voor het identificeren van korte momenten met fecale verontreinigingen. De BACTcontrol heeft in de zomer van 2021 meerdere weken continu gemeten. Door het gebrek aan hoosbuien, en daarmee overstorten, zijn er nauwelijks hoge *E. coli* MPN-aantallen gemeten en is er slechts één grote *E. coli* MPN-piek gedetecteerd maar was de BACTcontrol op dat moment buiten bedrijf. Omdat er geen pieken met beide methoden (MPN en BACTcontrol) tegelijkertijd zijn gemeten, kan er geen uitspraak worden gedaan over de overeenkomst tussen *E. coli* MPN en de BACTcontrol bij het Marineterrein.

Detectie fecale besmetting bij evenementenwater in stadsgrachten Breda

Het stedelijke oppervlaktewater van Breda (de singels) is door riooloverstorten een aantal keer per zwemseizoen hygiënisch onbetrouwbaar en op dat moment ongeschikt voor waterrecreatie waarbij kans op contact met oppervlaktewater bestaat. In Breda is verkend met welke snelle detectiemethoden de hygiënische waterkwaliteit gemonitord kan worden: reguliere bemonstering (MPN-methode), de BACTcontrol en de mobiele qPCR van Udetect. Vanwege de lange doorlooptijd bij reguliere monsternamen en analyse (24-48 uur) is het geen geschikte methode voor een watersysteem waarbij riooloverstorten tot een sterk variërende hygiënische waterkwaliteit leidt, zoals in Breda. Er is dus geen actueel beeld van de hygiënische waterkwaliteit beschikbaar. De BACTcontrol blijkt in Breda zeer geschikt te zijn voor alarmering: de BACTcontrol geeft direct aan wanneer de waterkwaliteit door overstorten onvoldoende wordt. Het systeem kan echter niet betrouwbaar aangeven wanneer de waterkwaliteit weer voldoende goed is. Metingen met de mobiele qPCR (Udetect) zijn geschikt om, in het geval van evenementen of in het geval van een geconstateerde serieuze riooloverstort, snel te bepalen of de hygiënische waterkwaliteit weer voldoet. Sinds de zomer van 2021 worden Udetect en BACTcontrol in de praktijk ingezet door Gemeente Breda en Waterschap Brabantse Delta.

Grenswaarden

De BACTcontrol en mobiele qPCR zullen in de praktijk worden ingezet om in te schatten in hoeverre de microbiologische waterkwaliteit risico's voor recreanten geeft. Daarom is op basis van de acute signaleringswaarde van 1.800 kve/100 ml een alarmwaarde voor de nieuwe snelle detectiemethoden onderzocht. Bij het validatieonderzoek werden deze alarmwaarden gesteld op 12 pmol/min voor de BACTcontrol, en $1,7 \times 10^3$ en $3,0 \times 10^2$ gen kopieën per 100 ml voor respectievelijk de mobiele qPCR systemen Udetect en van Sopachem. In de praktijk blijkt een alarmwaarde voor BACTcontrol voor de locaties Breda en Nijmegen/Bimmen van 75 pmol/min veel beter passend, omdat de achtergrondwaarden bij deze locaties vrij hoog zijn. Verdere praktijk toepassingen van de snelle methoden zal helpen om vast te stellen of deze waarde van 75 pmol/min ook op andere praktijk locaties passend is.

Aanbevelingen

Er is een set van snelle methoden beschikbaar die waterbeheerders kunnen inzetten om de aanwezigheid van fecale verontreinigingen in oppervlaktewater te onderzoeken. De ervaringen van het huidige onderzoek geven voldoende vertrouwen en aanknopingspunten om ook op andere locaties de methoden in te zetten en bij niet officiële zwemlocaties toch een beeld te krijgen of, wanneer en in welke mate, fecale verontreinigingen aanwezig zijn.

Er wordt aanbevolen om voor nieuwe locaties de metingen met BACTcontrol en/of mobiele qPCR voor *E. coli* parallel te laten lopen met MPN-analyses op *E. coli*, zodat kan worden getoetst of de gestelde alarmwaarden in de huidige studie ook gelden voor de praktijk van de andere locaties.

Voor het meten van piekconcentraties op specifieke locaties met verse verontreinigingen (zoals rioolwateroverstorten) wordt aanbevolen om de BACTcontrol toe te passen, om vervolgens mobiele qPCR te gebruiken voor verfijning van de informatie (locaties, trend in de tijd) en om vast te stellen wanneer de piek van fecale verontreiniging weer voorbij is.

Inhoud

Samenwerkingspartners	2
Rapport	3
Voorwoord	5
Samenvatting	6
Inhoud	9
1 Inleiding	13
1.1 Officiële zwemwateren en niet-officiële zwemwateren	13
1.2 Zwemwaterrichtlijn	13
1.3 Belang snelle monitoring voor veiligheid zwemwater	15
1.4 Uitleg klassieke en snelle detectiemethoden	16
1.5 Doel	16
1.6 Leeswijzer	16
2 Snelle detectiemethoden voor <i>E. coli</i> in zwemwater	18
2.1 Kweek- en MPN-methode	18
2.2 BACTcontrol van microLAN	18
2.3 Genecount DNA extractie en qPCR methode (Luminultra)	20
2.4 UDetect DNA extractie en qPCR methode (Orvion)	21
2.5 DNA extractie en qPCR Genesig en MIC (Sopachem)	21
2.6 Laboratorium DNA extractie en qPCR-methode van KWR	21
2.7 Laboratorium DNA extractie en qPCR-methode van Deltares	22
3 Validatie snelle detectiemethoden <i>E. coli</i>	23
3.1 Methodevalidatie	23
3.2 Gevoeligheidsstudie	24
3.2.1 Experimentele opzet	24
3.2.2 Concentratie <i>E. coli</i> in mengmonsters: Colilert metingen	25
3.2.3 BACTcontrol	26
3.2.4 qPCR: labmethoden	27
3.2.5 qPCR: "on-site" methoden	29
3.3 Inclusiviteit/exclusiviteit	35
3.4 Stabiliteit detectiesignaal	37

4	Detectie <i>E. coli</i>, leptospiren en cyanotoxinegenen in zwemwater	39
	Samenvatting	39
4.1	Inleiding	40
4.1.1	Aanleiding van het onderzoek	40
4.1.2	Doel van het onderzoek	40
4.1.3	Taakverdeling	40
4.2	Methode	41
4.2.1	Algemeen plan van aanpak	41
4.2.2	Bemonsterde locaties	42
4.2.3	Monstername	44
4.2.4	Filtratie & DNA-isolatie	44
4.2.5	Kwaliteitscontrole van DNA	45
4.2.6	qPCR-analyse	46
4.2.7	Kwantificering	47
4.2.8	MPN-analyse	47
4.2.9	Training UDetect	47
4.3	Resultaten	47
4.3.1	Kwaliteit van DNA-isolatie	48
4.3.2	<i>E. coli</i>	49
4.3.3	<i>Leptospira</i>	50
4.3.4	Toxische blauwalgen	50
4.4	Discussie en Conclusie	52
4.4.1	Kwaliteit DNA-extractie in het veld	52
4.4.2	Mobiele qPCR voor risicoanalyse zwemwater	53
4.4.3	Praktijklessen en verbeterpunten van UDetect	54
4.4.4	Algemene conclusies	55
5	Detectie fecale besmetting bij evenementenwater in stadsgrachten Breda	56
	Samenvatting	56
5.1	Inleiding	57
5.1.1	Aanleiding	57
5.1.2	Doelstelling	57
5.2	Methode en aanpak	58
5.2.1	Onderzoeksmethode	58
5.2.2	Gevolgde aanpak	58
5.3	Resultaten	61
5.3.1	Laboratoriummetingen	61
5.3.2	Schatting van de hersteltijd	63
5.3.3	BACTcontrol-metingen	65
5.3.4	Nadere analyse hersteltijd	70
5.3.5	qPCR-metingen	72
5.4	Conclusies en vooruitblik	75
5.4.1	Conclusies op basis van meetresultaten	75
5.4.2	Vooruitblik 2022-2025	75

6	BACTcontrol als early warning systeem voor afsluiting van de Spiegelwaal	76
	Samenvatting	76
6.1	Inleiding	76
6.1.1	Aanleiding	76
6.1.2	Doel	77
6.2	Monitoringsprogramma en dataverwerking	78
6.2.1	Monitoringsprogramma	78
6.2.2	Dataverwerking	78
6.2.3	Cross correlatie	79
6.3	Resultaten en discussie Bimmen en Nijmegen (Spiegelwaal)	80
6.3.1	BACTcontrol en MPN <i>E. coli</i> resultaten	80
6.3.2	Correlatie BACTcontrol met neerslag en afvoer Waal	83
6.3.3	Cross-correlatie tussen BACTcontrol in Bimmen en Nijmegen	86
6.4	Ervaringen Rijkswaterstaat-Oost	88
6.5	Conclusie	89
7	Monitoring zwemwater Marineterrein Amsterdam	90
	Samenvatting	90
7.1	Inleiding	90
7.1.1	Aanleiding	90
7.1.2	Doel	90
7.2	Meetprogramma en dataverwerking	91
7.2.1	Monitoringsprogramma	91
7.2.2	Dataverwerking	92
7.3	Resultaten en discussie Marineterrein	92
7.3.1	<i>E. coli</i> en enterococci	92
7.3.2	BACTcontrol	94
7.3.3	Semi real-time monitoring	98
7.4	Ervaringen Waternet, Marineterrein en microLAN	98
7.5	Conclusie	99
8	Evaluatie geschiktheid en toepassing snelle detectie <i>E. coli</i> voor monitoring zwemwateren	100
8.1	Vergelijking toepassing BACTcontrol op drie locaties	100
8.2	Alarmwaarde BACTcontrol	100
8.2.1	Average + 3x SD	101
8.2.2	Percentielwaarden	102
8.2.3	Op basis van validatie-experimenten	103
8.2.4	Conclusie BACTcontrol	103
8.3	Alarmwaarde mobiele qPCR	104
8.3.1	UDetect (Orvion)	104
8.3.2	Sopachem	104
8.4	Geschiktheid snelle methoden voor de praktijk	104
8.5	Stappenplan bij in gebruik nemen snelle methoden	107

9	Overkoepelende conclusie en aanbevelingen	109
9.1	Conclusies	109
9.1.1	Overall conclusies voor snelle detectie methoden	109
9.1.2	Mobiele qPCR	109
9.1.3	BACTcontrol	110
9.2	Aanbevelingen	110
10	Referenties	112
I	Zwemwater: Experience user protocol van UDetect	113
II	Zwemwater: Ondersteunende tabellen bij hoofdstuk 4.3	116
III	Breda: Labmetingen overall	118
IV	Spiegelwaal: BACTcontrol-resultaten met filtratievolume	120
V	Validatie: Colilert metingen	121
VI	Validatie: qPCR metingen lab-KWR	122
VII	Validatie: qPCR metingen lab-Deltares	123
VIII	Validatie: BACTcontrol	124
IX	Validatie: Udetect	125

1 Inleiding

1.1 Officiële zwemwateren en niet-officiële zwemwateren

Water in en om de stad is aantrekkelijk voor het leefklimaat en voor recreatie. Naast de aangewezen zwemlocaties in natuur/stadswater worden gemeenten steeds vaker geconfronteerd met burgers die bij goed weer (soms massaal) zwemmen/recreëren in stadswater. Ook willen steden dat het oppervlaktewater toegankelijk en geschikt is voor activiteiten als sportevenementen (zoals triatlons) en benefietevenementen (zoals city swims). Gezond zwemwater is daarbij van cruciaal belang. De kwaliteit van stadswater is aan sterke variaties onderhevig, onder andere door piekverontreinigingen via riooloverstorten. Deze hebben bij (zwem)evenementen geleid tot ziekte onder de deelnemers (onder andere in Alphen, Utrecht, Amsterdam). Ook beheerders van aangewezen zwemlocaties worden beïnvloed door piekverontreinigingen van hun zwemwater. Voor beide situaties zou een snelle, on-site methode voor de beoordeling van de actuele zwemwaterkwaliteit de essentiële informatie kunnen leveren voor het vrijgeven van de locatie voor veilig zwemmen of het waarschuwen van de baders/beheerders/organisatoren van een actueel gezondheidsrisico.

1.2 Zwemwaterrichtlijn

De waterkwaliteitseisen voor officiële zwemwaterlocaties staan beschreven in de Europese zwemwaterrichtlijn [1]. Voor niet-officiële zwemwaterlocaties waar evenementen worden georganiseerd is door de STOWA en RIONED een handreiking ontwikkeld [2].

In de Europese zwemwaterrichtlijn is onder andere opgenomen dat van elke zwemwaterlocatie een zwemwaterprofiel moet worden opgesteld en dat gedurende het zwemseizoen (1 mei – 1 oktober) de zwemwaterkwaliteit wordt gecontroleerd. De microbiologische kwaliteit van het zwemwater wordt onder andere gemonitord door elke 2 weken het aantal *E. coli* bacteriën in het water te bepalen. Aan het einde van het zwemseizoen wordt volgens de rekenregels van de zwemwaterrichtlijn bepaald of de zwemwaterkwaliteit 'slecht', 'aanvaardbaar', 'goed', of 'uitstekend' is. Hiervoor worden de microbiologische metingen van de afgelopen vier jaar gebruikt en wordt het 90- of 95-percentiel berekend (Figuur 1). De zwemwaterkwaliteit hangt af van deze waarde.

Binnenwateren

	A	B	C	D	E
	Parameter	Uitstekende kwaliteit	Goede kwaliteit	Aanvaardbare kwaliteit	Referentiemethoden voor de analyse
1	Intestinale enterokokken (kve/100 ml)	200 (*)	400 (*)	330 (**)	ISO 7899-1 of ISO 7899-2
2	Escherichia coli (kve/100 ml)	500 (*)	1 000 (*)	900 (**)	ISO 9308-3 of ISO 9308-1

(*) Gebaseerd op een beoordeling van het 95-percentiel. Zie bijlage II.

(**) Gebaseerd op een beoordeling van het 90-percentiel. Zie bijlage II.

Kustwateren en overgangswateren

	A	B	C	D	E
	Parameter	Uitstekende kwaliteit	Goede kwaliteit	Aanvaardbare kwaliteit	Referentiemethoden voor de analyse
1	Intestinale enterokokken (kve/100 ml)	100 (*)	200 (*)	185 (**)	ISO 7899-1 of ISO 7899-2
2	Escherichia coli (kve/100 ml)	250 (*)	500 (*)	500 (**)	ISO 9308-3 of ISO 9308-1

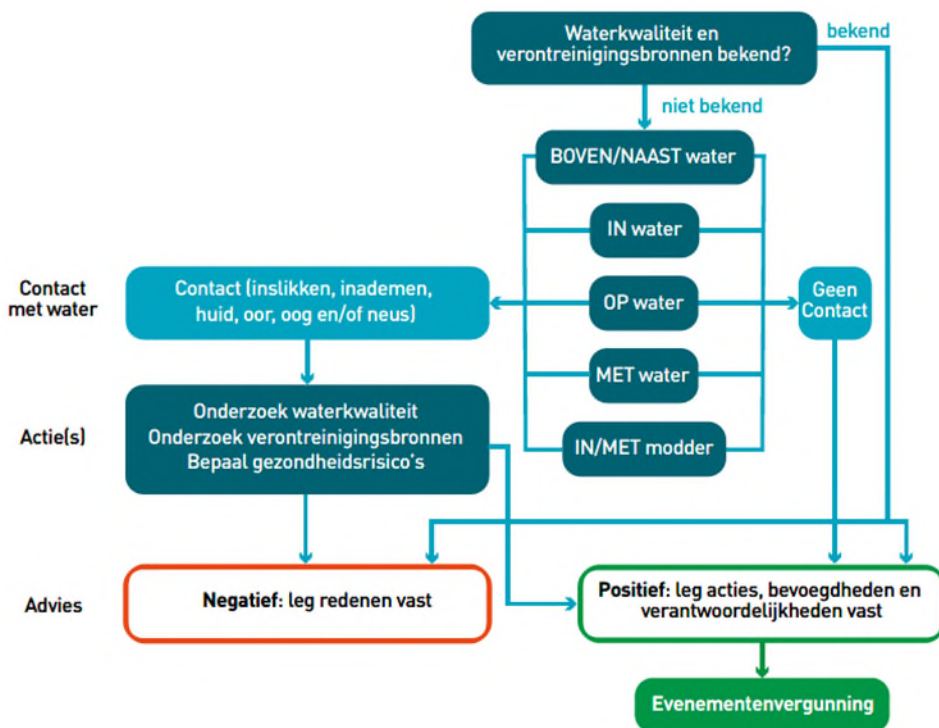
(*) Gebaseerd op een beoordeling van het 95-percentiel. Zie bijlage II.

(**) Gebaseerd op een beoordeling van het 90-percentiel. Zie bijlage II.

Figuur 1. Microbiologische waterkwaliteitseisen voor zwemwater uit bijlage I van de Europese Zwemwaterrichtlijn (2006/7/EG) [1].

Naast deze kwaliteitsbeoordeling op basis van seizoensmetingen worden er in Nederland grenswaarden gehanteerd voor acute risico's. De verwachting is dat snelle metingen vooral een meerwaarde hebben voor het inschatten voor het overschrijden van de grenswaarden voor deze acute risico's. In Nederland wordt de grens van 1800 kolonievormende eenheden (kve)/100 ml water met betrekking tot *E. coli* aangehouden als signaalwaarde voor overschrijding van het acute risico [3]. Voor intestinale enterococchen ligt die grens bij 400 kve/100 ml.

De handreiking voor evenementen gebruikt flowschema's om de gezondheidsrisico's in te kunnen schatten (Figuur 2). Dit bestaat uit een aantal metingen van de waterkwaliteit voorafgaand aan het evenement, mits die data niet al beschikbaar zijn, gecombineerd met het in kaart brengen van verontreinigingsbronnen en eventuele risicogroepen. Op basis van deze gegevens wordt een advies uitgebracht over het wel of niet door kunnen gaan van het evenement.



Figuur 2. Flowschema om gezondheidsrisico's in te kunnen schatten bij evenementen op niet-officiële zwemwaterlocaties, afkomstig uit de handreiking van STOWA [2].

1.3 Belang snelle monitoring voor veiligheid zwemwater

Het nadeel van de zwemwaterriichtlijn en handreiking voor evenementen is dat deze zijn gebaseerd op de *E. coli* kweekmethode, die binnen 24 tot 48 uur na start van de celkweek resultaat geeft. Hierdoor is het niet mogelijk om tijdig te reageren met maatregelen op de sterke variaties in stadswater en korte verontreinigingspieken, b.v. door hevige regenbuien gevolgd door riooloverstorten of door een fecale verontreiniging die van bovenstrooms op de zwemwaterlocatie terecht komt. Met een snelle, on-site methode om de actuele zwemwaterkwaliteit op de dag van het evenement te bepalen kan het actuele gezondheidsrisico ingeschat worden en dus of het evenement wel of niet door kan gaan.

In eerdere TKI projecten is de basis gelegd voor methoden die dit zouden kunnen leveren, te weten de BACTcontrol voor snelle, on-site, continue monitoring van de microbiologische waterkwaliteit (fecale indicator bacteriën zoals *E. coli* en intestinale enterococcen) en mobiele qPCR voor snelle, on-site monitoring van fecale indicatoren. In 2018 is de mobiele qPCR toegepast bij de Amsterdam City Swim voor *E. coli* detectie, deze last-minute gegevens hebben een rol gespeeld bij het besluit tot afgelasting van de City Swim vanwege de microbiologische zwemwaterkwaliteit. Daarnaast heeft in 2018 een pilot onderzoek plaatsgevonden naar de praktische toepassing van mobiele qPCR voor *E. coli* metingen in zwemwateren, waarin is gekeken naar de kwaliteit van de analyseresultaten en de uitvoerbaarheid door de monsternemers van waterschapslaboratoria.

In het huidige onderzoek, dat bestaat uit drie deelonderzoeken, wordt nader inzicht gegeven in de toepasbaarheid van de snelle *on site* methoden. Het onderzoek wordt een validatie onderzoek, en praktisch test met mobiele qPCR bij 14 zwemwater locaties en drie pilotexperimenten met BACTcontrol gecombineerd om te

komen tot een beter inzicht in de betrouwbaarheid en toepasbaarheid van de snelle on site methoden om fecale verontreinigingen in oppervlaktewater te kunnen vaststellen.

1.4 Uitleg klassieke en snelle detectiemethoden

In dit project worden twee snelle detectiemethoden gebruikt: mobiele qPCR en de BACTcontrol. Deze worden vergeleken met de standaard kweek MPN methode zoals die staan genoemd in o.a. de Europese zwemwaterrichtlijn.

Bij de kweekmethode wordt het watermonster geconcentreerd op een filter wat vervolgens op een selectief voedingsmedium wordt gelegd. Na 24 uur kweken en een bevestigingsstap wordt het aantal *E. coli* specifieke bacteriekolonies geteld. De MPN-methode is ook gebaseerd op kweek, dit keer in een vloeibaar medium. In tegenstelling tot de kweek is het resultaat het 'meest waarschijnlijke aantal' (Most Probable Number) *E. coli* bacteriën dat aanwezig is, en niet het daadwerkelijke aantal getelde *E. coli* bacteriën. Ook de MPN-methode duurt 24 uur na de start van de analyse.

De mobiele qPCR is een kwantitatieve moleculaire methode gebaseerd op laboratoriummethoden die al gedurende lange tijd gebruikt worden. Hiermee wordt een klein stukje DNA specifiek voor een bepaald micro-organisme in een watermonster gedetecteerd. In dit onderzoek zijn dit onder andere *E. coli* bacteriën. Hiervoor wordt eerst al het DNA uit een watermonster geïsoleerd, vervolgens wordt op dit DNA de qPCR-analyse uitgevoerd en bepaald hoeveel van het DNA van een specifieke bacterie aanwezig was. De DNA-isolatie en de qPCR-analyse worden regulier in een gespecialiseerd laboratorium uitgevoerd maar kunnen met de komst van mobiele qPCR binnen twee uur in het veld uitgevoerd worden.

De BACTcontrol methode is gebaseerd op detectie van enzymatische activiteit van een enzym dat specifiek is voor *E. coli* bacteriën. Hiervoor wordt eerst een watermonster geconcentreerd waarna een fluorescent gelabeld eiwit (substraat) aan het concentraat wordt toegevoegd. Het enzym knipt het fluorescente label van het substraat, waardoor er fluorescent licht gevormd wordt. De mate van fluorescentie is een maat voor de hoeveelheid *E. coli* bacteriën in het watermonster. Binnen ongeveer twee uur geeft de meting een resultaat.

1.5 Doel

Doel van het project is om:

- De snelle microbiologische methoden BACTcontrol en mobiele qPCR te valideren en te vergelijken met de MPN-methode
- Te onderzoeken of deze snelle methoden toepasbaar zijn voor zwemwaterlocaties, wat voor informatie deze methoden opleveren en wat de eisen aan deze locaties zijn voor optimale toepassing
- Grenswaarden op te stellen voor de snelle methoden waarmee onderscheid kan worden gemaakt tussen slechte, aanvaardbare, goede en uitstekende zwemwaterkwaliteit
- De geteste methoden te evalueren voor geschiktheid en toepassing in de praktijk

1.6 Leeswijzer

Dit rapport omvat alle deelonderzoeken die gestart zijn in het kader van TKI-project "Snelle detectie fecale verontreinigingen". Het onderzoek omvat een validatie-onderzoek in het laboratorium, een demonstratieproject met mobiele qPCR bij zwemwaterlocaties en drie pilot-onderzoeken waarin het BACTcontrol systeem wordt

toegepast. In Hoofdstuk 2 worden de verschillende snelle detectiemethoden beschreven die voor dit onderzoek zijn toegepast en nader toegelicht. Ook de referentiemethode MPN (Colilert) wordt in dit hoofdstuk beschreven.

In Hoofdstuk 3 wordt ingegaan op het validatieonderzoek van de verschillende methoden op een serie oppervlaktewater monsters, verrijkt met *E. coli* bacteriekweek en/of rioolwater in het laboratorium. Op basis van de resultaten uit dit validatieonderzoek zijn indicatieve alarmwaarden vastgesteld voor de geteste methoden.

In Hoofdstuk 4 wordt het demonstratie onderzoek beschreven, waarin mobiele qPCR is toegepast in de praktijk door monsternemers van zwemwaterlocaties. Er is onderzocht of meerdere parameters tijdens één analyse konden worden uitgevoerd in het veld.

In Hoofdstuk 5 t/m 7 worden de pilot onderzoeken met het BACTcontrol systeem beschreven. In hoofdstuk 5 wordt het onderzoek in Breda beschreven, waarbij een koppeling is gemaakt tussen metingen met BACTcontrol en MPN, gerelateerd aan regenbuien die een tijdelijke verslechtering van de waterkwaliteit in de stadsgrachten veroorzaken. In Hoofdstuk 6 wordt beschreven hoe de mogelijkheden zijn voor een early warning systeem voor zwemmers bij de Spiegelwaal nabij Nijmegen door gebruik te maken van een BACTcontrol systeem dat 2 uur stroomopwaarts aan Waal bij Bimmen de microbiologische waterkwaliteit monitorde. In Hoofdstuk 7 wordt het derde pilotonderzoek beschreven waarin bij Marineterrein van Amsterdam een BACTcontrol systeem actief is geweest om piekbelasting met fecale verontreinigingen te kunnen identificeren als gevolg van hevige neerslag.

In Hoofdstuk 8 wordt ingegaan hoe de snelle detectie methoden in de praktijk kunnen worden ingezet en hoe een geschikte alarmwaarde kan worden vastgesteld. Tevens wordt in Hoofdstuk 8 een overzicht geboden van alle eigenschappen en toepassingsmogelijkheden en randvoorwaarden voor de inzet van de verschillende snelle methoden in vergelijking met de MPN methode.

In Hoofdstuk 9 van dit rapport worden voor toepassing van zowel BACTcontrol als (mobiele) qPCR de conclusies weergegeven, voorafgegaan door een aantal overkoepelde conclusies en aanbevelingen voor het toepassen van de snelle detectiemethoden. Tot slot zijn na de gebruikte referenties een aantal bijlages bijgevoegd ter ondersteuning van de gepresenteerde data in het rapport.

2 Snelle detectiemethoden voor *E. coli* in zwemwater

Het onderzoek naar snelle detectiemethodes voor fecale verontreinigingen in oppervlaktewater is verdeeld over drie deelonderzoeken, namelijk: validatie in het laboratorium (hoofdstuk 3), praktijkonderzoek met mobiele qPCR op 14 zwemwaterlocaties (hoofdstuk 4), en drie pilotexperimenten met BACTcontrol (hoofdstuk 5 t/m 7). Omdat de toegepaste methoden in meerdere hoofdstukken aan bod komen, is in dit hoofdstuk de beschrijving van de verschillende methodes centraal bij elkaar gezet.

2.1 Kweek- en MPN-methode

Voor het bepalen van de concentratie *E. coli* in oppervlaktewater volgens NEN-EN_ISO 9308-2:2012 is gebruik gemaakt van de Colilert® Quanti-Tray methode van IDEXX. Bij deze methode wordt het watermonster verdeeld over 96 wells met hierin een selectief kweekmedium en reagentia waarmee het onderscheid gemaakt kan worden tussen bacteriën van de coligroep en *E. coli* op basis van een kleurreactie. Het monster wordt gedurende 24 uur bij 35°C geïncubeerd in deze wells. Het aantal gele en fluorescente wells wordt na incubatie geteld op basis van “Most Probable Number” (MPN) en met de MPN tabel omgerekend naar het aantal MPN *E. coli*/100 ml.

2.2 BACTcontrol van microLAN

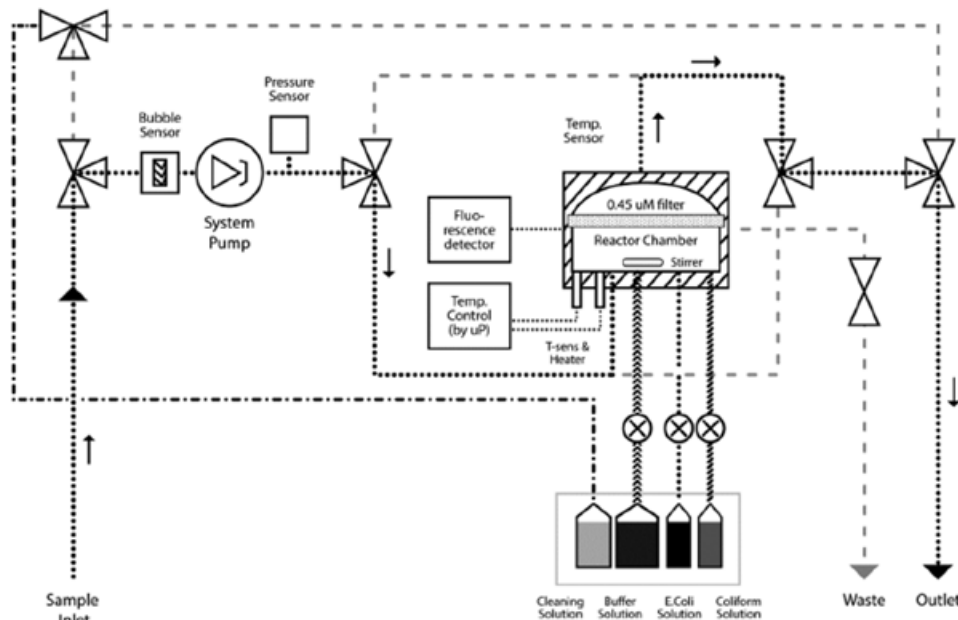
De BACTcontrol van microLAN detecteert o.a. *E. coli* bacteriën in watermonsters met behulp van enzymatische reacties die specifiek zijn voor *E. coli*. Deze reacties worden zichtbaar gemaakt met fluorescentiedetectie. De enzymatische activiteit (β -glucuronidase voor *E. coli*) wordt gedetecteerd door toevoeging van een substraatspecifiek reagens dat een fluorescerend label bevat (Tabel 1). Het β -glucuronidase enzym maakt de fluorescerende groep los van de rest van het substraat, waardoor 4-methylumbelliferon (MUF) ontstaat dat fluoresceert na excitatie door UV-straling (λ_{ex} 360 nm; λ_{em} 450 nm). In dit project wordt alleen de *E. coli* analyse gebruikt, maar het BACTcontrol systeem kan ook andere bacterie(groepen) detecteren (Tabel 1). Het β -glucuronidase enzym is aanwezig in nagenoeg alle *E. coli* bacteriën en is afwezig in niet-*E. coli* bacteriën. De hoeveelheid fluorescentie die vrijkomt door de enzymatische activiteit van β -glucuronidase is dus een indicator voor de hoeveelheid *E. coli* bacteriën dat aanwezig is.

Tabel 1. Enzymen van specifieke bacteriesoorten die gedetecteerd worden met de BACTcontrol. Aangegeven is ook wel substraat (of reagents) gebruikt wordt voor detectie van de specifieke bacteriën.

Bacteriesoort	Enzym	Substraat
<i>E. coli</i>	β -glucuronidase (GLUC)	4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG)
Coliformen	β -galactosidase (GAL)	4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (MUGal)
Enterococcen	β -glucosidase (GLUCAN)	4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside (MUGlu)
Total activity	alkaline phosphatase (ALP)	4-methylumbelliferyl- β -D-phosphate (MUP)

De BACTcontrol bestaat uit een reactor (volume: 2 ml) met twee kamers die van elkaar gescheiden zijn door een herbruikbaar keramisch filter met een poriegrootte van 0,45 μm (Figuur 3). In de reactor wordt het watermonster

over het filter geconcentreerd en wordt de temperatuur gestabiliseerd ($44 \pm 0,1$ °C voor β -glucuronidase). In de reactor zorgt een magneetroerder ervoor dat het geconcentreerde watermonster voortdurend geroerd wordt en dat de toegevoegde buffer en het specifieke substraat goed gemengd worden. Na toevoeging van buffer en substraat zorgt de enzymatische reactie voor productie van het fluorescente label dat wordt gemeten door de fluorescentiedetector in de BACTcontrol.



Figuur 3. Schematisch overzicht van de BACTcontrol.

Vóór elke meting wordt het watermonster door de reactorkamer en over het keramische filter gepompt met een debiet van 1 - 24 ml per minuut. De totale filtratietijd is afhankelijk van het volume dat moet worden gefiltreerd en de vervuiling van het filter. Tijdens filtratie wordt het bemonsterde watervolume gemeten. Nadat de reactiekamer op temperatuur is gebracht en toevoeging van buffer en reagens volgt een korte stabilisatieperiode. Hierna start de eigenlijke meting van de fluorescentie gedurende een incubatieperiode van 20 minuten.

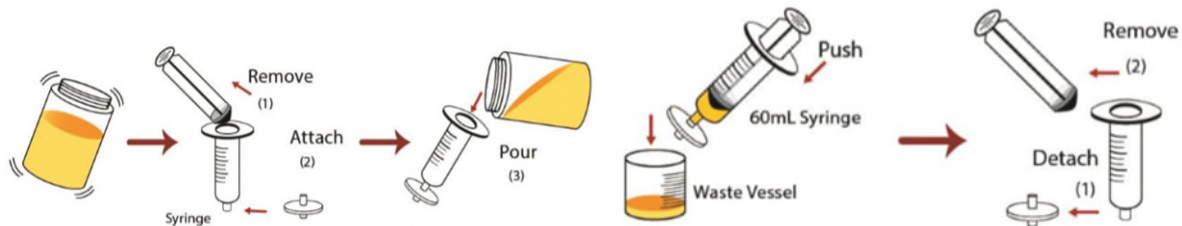
De fluorometer is gekalibreerd met behulp van een standaardoplossing met een concentratie van 1.000 nM MUF. Hierdoor meet de fluorometer de productiesnelheid van MUF, wat rechtstreeks overeenkomt met de omzettingssnelheid van het substraat. De intensiteit van de fluorescentie wordt omgerekend naar MUF-productie per tijd en volume ($\text{pmol MUF} \cdot \text{min} \cdot \text{gefiltreerd volume}$). Hiervoor wordt een 'least square linear regression' (kleinste-kwadradenmethode) analyse uitgevoerd. Bovendien berekent de software een aantoonbaarheidsgrens voor elke uitgevoerde meting. De meting wordt als statistisch significant beschouwd als het gemiddelde signaal tijdens de meting driemaal groter is dan de standaardafwijking ten opzichte van de theoretische nullijn van de reactie. De aantoonbaarheidsgrens wordt berekend met de gegevens die na de stabilisatieperiode zijn verkregen.

Na elke meting wordt door de BACTcontrol middels een interne reinigingsprocedure schoongemaakt. Een oplossing met waterstofperoxide (3%) en perazijnzuur (0,11%) wordt door de inwendige leidingen gecirculeerd. Tegelijkertijd wordt het water verwarmd tot 60°C om resterende bacteriën en enzymactiviteit in het systeem te elimineren.

De resultaten kunnen worden bekeken op de BACTcontrol sensor zelf, of via een online verbinding. Bovendien kunnen metingen via de online verbinding worden gestart of gestopt, en kunnen instellingen online worden gewijzigd.

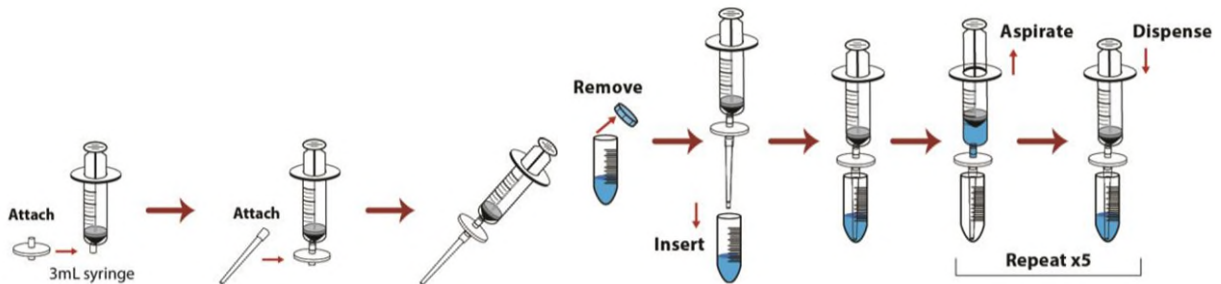
2.3 Genecount DNA extractie en qPCR methode (Luminultra)

Voor de analyses met de systemen van Luminultra is gebruik gemaakt van de “GeneCount™ LT DNA Purification Kit” voor isolatie van DNA en “GeneCount™ LT qPCR Assay Kit” voor het uitvoeren van qPCR analyses op het geïsoleerde DNA. Bij de GeneCount methode van Luminultra wordt een filter gekoppeld aan een spuit met een volume van 60 ml toegepast voor het concentreren van de micro-organismen uit een volume van 100 ml (Figuur 4).



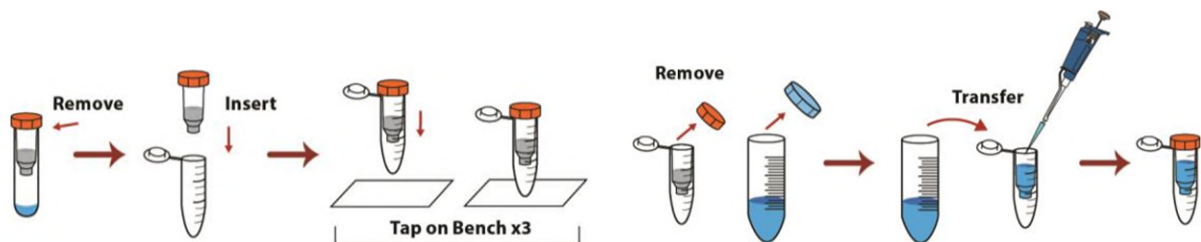
Figuur 4. Concentreren van micro-organismen met de methode van LuminUltra

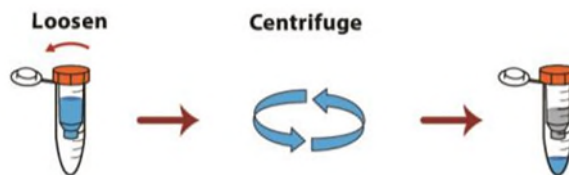
Na een spoelstap van het filter wordt de filterunit gekoppeld aan een 3 ml spuit en wordt een volume van 1 ml lysisbuffer herhaaldelijk en door het filter geleid waarbij de lysisbuffer zorgt voor het lyseren van de bacteriële celwand en het vrijkomen van het DNA (Figuur 5).



Figuur 5. Vrijmaken van het DNA uit het celconcentraat

Na het vrijmaken van het DNA vindt er een zuivering plaats met een affiniteitskolom (Figuur 6). Voor deze affiniteitszuivering wordt slechts 100 μ L van het lysaat van 1 ml gebruikt (10%) waardoor de qPCR analyses uiteindelijk op slechts een klein van het monster wordt uitgevoerd.





Figuur 6. DNA-isolatie methode (affiniteitszuivering) van LuminUltra

2.4 UDetect DNA extractie en qPCR methode (Orvion)

De filtratie en DNA-isolatie is in het veld uitgevoerd volgens het protocol van UDetect (Experienced user protocol staat in Bijlage I). Er is ca. 150 ml water gefilterd per monster, waarna de DNA isolatie werd gestart. De exacte hoeveelheid gefilterd water werd in het veld genoteerd om achteraf de juiste concentratie te kunnen berekenen. De qPCR-analyses zijn na het isoleren van het DNA in het veld uitgevoerd volgens het UDetect protocol (Bijlage I) voor *E. coli* (ybbW gen), *Leptospira* (lipL gen), en blauwalgtoxine (mcyE/ndaF genen samen in 1 assay) zoals voor de geselecteerde locaties beschreven in hoofdstuk 4.

Na het inzetten van de qPCR draaide het UDetect-systeem actief op locatie langs het water, in de auto onderweg naar een volgende locatie, of op het lab (afhankelijk van de afstand tussen bemonsteringslocatie en lab of weersomstandigheden). Standaard curves waren eerder gemaakt op dezelfde machine, die gebruikt werden voor kwantificatie.

2.5 DNA extractie en qPCR Genesig en MIC (Sopachem)

Voor de qPCR van Sopachem is gebruik gemaakt van de "Genesig EASY_RNA_DNA extraction kit" voor het isoleren van DNA uit de watermonsters. Voor het concentreren van de micro-organismen uit het water is eerst 150 ml oppervlaktewater gefiltreerd over een 0,2 μm polycarbonaat membraanfilter. Het filter werd gevouwen en opgenomen in 500 μl Sample Prep Solution van de genoemde Genesig kit. Na sterk vortexen is verder gewerkt met 200 μl materiaal en vervolgens de stappen gevolgd zoals beschreven in het protocol van de leverancier. Voor de uitvoering van de qPCR analyses is er voor de monsterseries in 2021 de "Genesig *E. coli* easy kit" gebruikt, voor de monsterseries van 2022 is de "Genesig *E. coli* advanced kit" gebruikt. Voor het uitvoeren van de qPCR analyses is in 2021 gebruikt gemaakt van het Genesig q16 systeem en in 2022 van het MIC systeem (Bio Molecular Systems, Australia).

2.6 Laboratorium DNA extractie en qPCR-methode van KWR

Bij de laboratoriummethode van KWR is 100 ml water gefiltreerd over een membraanfilter van polycarbonaat met poriëgrootte van 0,2 μm ("Track Edge" filters) en een diameter van 47 mm. Vervolgens is de Power Biofilm Kit (Qiagen) gebruikt voor het isoleren van DNA waarbij tijdens de eerste stap van de procedure, de stap waarbij het DNA wordt vrijgemaakt uit de cellen (lysis), een bekende hoeveelheid controle-DNA (Interne Controle, IC-DNA) toegevoegd. Voor het bepalen van het rendement van de isolatieprocedure en het monitoren van de aanwezigheid van stoffen die de PCR-analyses remmen (inhibitie) werd een verschilmeting uitgevoerd waarbij de concentratie van het toegevoegde en het geïsoleerde IC-DNA werd bepaald. Dit rendement is gebruikt voor het corrigeren van de uiteindelijke meetwaarden. Voor specifieke detectie van *E. coli* zijn eerder beschreven primers, waarmee een fragment van het Hsp70 gen wordt vermeerderd, gebruikt [4].

2.7 Laboratorium DNA extractie en qPCR-methode van Deltares

In het lab werd het bemonsterde oppervlaktewater gefilterd (in triplo) aan de hand van Millipore vacuüm filtratie systeem (Millipore) met Microfil Filtration Funnels met een porie grootte van 0,22 μm (Millipore) als membraan. Per monster werd er (indien mogelijk) dezelfde hoeveelheid water gefilterd als in het veld. De filters van de lab filtratie werden bij -80°C bewaard tot dat DNA-isolatie plaatsvond.

De DNA-extractie in het lab is uitgevoerd met behulp van de DNeasy PowerLyzer PowerSoil kit (Qiagen, Duitsland) volgens het standaard protocol van de fabrikant. Als start materiaal werd een halve membraan gebruikt die verkregen was na filtratie. Het verkregen DNA werd bewaard bij -80°C .

Alle qPCR analyses (*E. coli* (uidA gen (hoofdstuk 3) en ybbW gen (hoofdstuk 4)), *Leptospira* (lipL gen), en blauwalgtoxine (mcyE/ndaF genen samen in 1 assay)) zijn uitgevoerd op een C1000 Touch thermocycler uitgerust met een CFX96 Touch™ Real-Time PCR-detectiesysteem (Bio-Rad) met behulp van optische PCR platen met 96 wells (Bio-Rad) met optische zelfklevende afdekfolie (microseal B, Bio-Rad). Alle qPCR-gegevens werden geanalyseerd met behulp van de Bio-Rad CFX Manager versie 3.0.

3 Validatie snelle detectiemethoden *E. coli*

3.1 Methodevalidatie

In dit onderzoek is een beperkte validatie uitgevoerd van de analyseresultaten die worden verkregen met de toegepaste alternatieve methoden. Bij deze validatie-experimenten zijn de analyseresultaten van de methoden waarmee analyses op locatie kunnen worden uitgevoerd vergeleken met de resultaten van de standaard kweekmethode. Het protocol ter validatie van methoden, zoals beschreven in ISO 16140-2:2016 (Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method [5]), is bij deze validatie als basis gebruikt maar slechts gedeeltelijk uitgevoerd.

Het validatieprotocol volgens ISO 16140-2:2016 bestaat uit twee fasen:

Een methode vergelijkend onderzoek waarbij de alternatieve methode wordt vergeleken met de referentiemethode. Dit vergelijkend onderzoek bestaat uit de volgende onderdelen:

- Een gevoeligheidsstudie waarbij de resultaten van de alternatieve methode worden vergeleken met de resultaten van de referentiemethode door analyses uit te voeren op besmette en niet-besmette monsters.
- Een RLOD (Relative limit of detection) waarbij wordt vergeleken welke minimale hoeveelheid kan worden aangetoond met de alternatieve methode en de referentie methode.
- Een studie naar de inclusiviteit en de exclusiviteit van de alternatieve methode waarbij wordt onderzocht of verschillende stammen van het doelorganisme (*E. coli*) kunnen worden aangetoond en geen detectie plaats vindt van ander organismen (niet-*E. coli*).
- Een interlaboratoriumonderzoek waarbij resultaten verkregen door verschillende laboratoria met elkaar worden vergeleken.

Het valt buiten de scope van dit onderzoek om validatieonderzoek van alle methoden uit te voeren volgens de criteria beschreven in ISO 16140-2:2016. Voor een volledige validatie van alle methoden is het benodigde aantal monsters te groot om binnen het budget van dit project te kunnen uitvoeren. Daarnaast is het momenteel nog niet haalbaar en relevant om een interlaboratoriumonderzoek uit te voeren omdat niet duidelijk is welke van de methoden goed bruikbaar is en er nog niet voldoende potentiële deelnemers zijn. Er is daarom gekozen om een gevoeligheidsstudie en inclusiviteits-/exclusiviteitsstudie op een beperkt aantal monsters uit te voeren. De resultaten van deze analyses geven een eerste indruk over de toepassingsmogelijkheden van de onderzochte methoden in de praktijk van het zwemwateronderzoek. Deze eerste indruk kan gebruikt worden voor het maken van een keuze voor één of meer veelbelovende methoden waarmee uitgebreider validatieonderzoek kan worden uitgevoerd in een eventueel vervolgtraject. De experimenten voor validatie van de methoden zijn uitgevoerd bij de laboratoria van KWR en Deltares door ervaren analisten. Naast de gevoeligheids- en inclusiviteits-/exclusiviteitsstudie is onderzocht in hoeverre er verschillen zijn in de stabiliteit van de detectiesignalen die verkregen worden met de alternatieve detectiemethoden.

Voor het toepassen van qPCR methoden voor kwantificatie van *E. coli* en intestinale enterococci in oppervlaktewater zijn in de USA vergelijkbare, maar uitgebreidere, validatiestudies uitgevoerd [6]. Daarnaast zijn er ook studies uitgevoerd waarbij er op grote schaal analyses zijn uitgevoerd met qPCR en kweek op monsters van oppervlaktewater, afkomstig van een groot aantal locaties waarmee een goed verband tussen qPCR en de standaard kweekmethode werd aangetoond [7].

3.2 Gevoeligheidsstudie

Om een eerste indruk te krijgen van de prestatiekenmerken van de verschillende qPCR methoden en BACTcontrol zijn er experimenten uitgevoerd op mengsels van verschillende verdunningen van rioolwater in oppervlaktewater. Om een variatie in watersamenstelling tussen zwemwaterlocaties en variatie in rioolwatersamenstelling te simuleren is er gekozen om deze analyses uit te voeren op zwemwater en rioolwater afkomstig van de verschillende locaties (Tabel 2).

Tabel 2. Gebruikte locaties voor het verzamelen van oppervlakte- of rioolwater

Datum	Monstername	Locatie Zwemwater	Water	RWZI (influent)
22-3-2021		Recreatie 't Waal (Tull en 't Waal)	Lek	Nieuwegein (Klaphek)
3-5-2021		Spiegelwaal (Bimmen)	De Waal (Nevengeul)	Houten
30-8-2022		Mosterdpot (Woudrichem)	Boven-Merwede	Houten
31-8-2022		Strandje Rijswijk	Afgedamde Maas	Zeist
1-9-2022		Rietplas (Houten)	Zwemplas	Driebergen
5-9-2022		Lingebos (Vuren)	Zwemplas	Geldermalsen
7-9-2022		Jachthaven Biesbosch (Drimmelen)	Biesbosch	Bunnik

3.2.1 Experimentele opzet

Voor het uitvoeren van een gevoeligheidsstudie zijn er analyses uitgevoerd op kunstmatig besmette oppervlaktewatermonsters. Hiervoor zijn monsters van oppervlaktewater, afkomstig van officiële zwemlocaties, kunstmatig besmet met rioolwater door het oppervlaktewater in verschillende verhoudingen te mengen (0,1-0,0001% rioolwater) met rioolwater (RWZI influent). De mengmonsters zijn samengesteld bij KWR waarna een deel van het volume van de mengmonsters is getransporteerd naar Deltares en zijn er aansluitend analyses uitgevoerd bij de laboratoria van KWR en Deltares (Tabel 3). Om inzicht te krijgen in de toepasbaarheid van qPCR methoden die op het laboratorium worden uitgevoerd en een referentie te hebben voor de on-site qPCR methoden zijn bij beide laboratoria qPCR analyses uitgevoerd met de laboratoriummethode voor kwantificatie van *E. coli* en humane Bacteroides (bij KWR). Metingen van humane Bacteroides zijn in dit onderzoek meegenomen vanwege de hoge concentraties in rioolwater en de mogelijkheden voor het gebruik van dit organisme als fecale indicator die specifiek is voor menselijke feces en daarmee rioolwater (riooloverstorten). Vanwege deze potentiële meerwaarde van dit indicatororganisme heeft Orvion ook voor dit organisme een on-site methode beschikbaar. Om een vergelijk tussen qPCR en de referentiemethode mogelijk te maken zijn er op het laboratorium van KWR analyses uitgevoerd met de standaard kweekmethode (MPN met Colilert). Voor het onderzoeken van de mogelijkheden voor continue geautomatiseerde meting van *E. coli* zijn bij KWR analyses uitgevoerd met BACTcontrol. En, voor het onderzoeken van de toepassing van qPCR op locatie zijn bij KWR analyses met de methode van LuminUltra (op de monsters van 22-3-2021 en 3-5-2021) uitgevoerd en bij Deltares de methoden van Sopachem (*E. coli*) en UDetect (*E. coli* en humane Bacteroides).

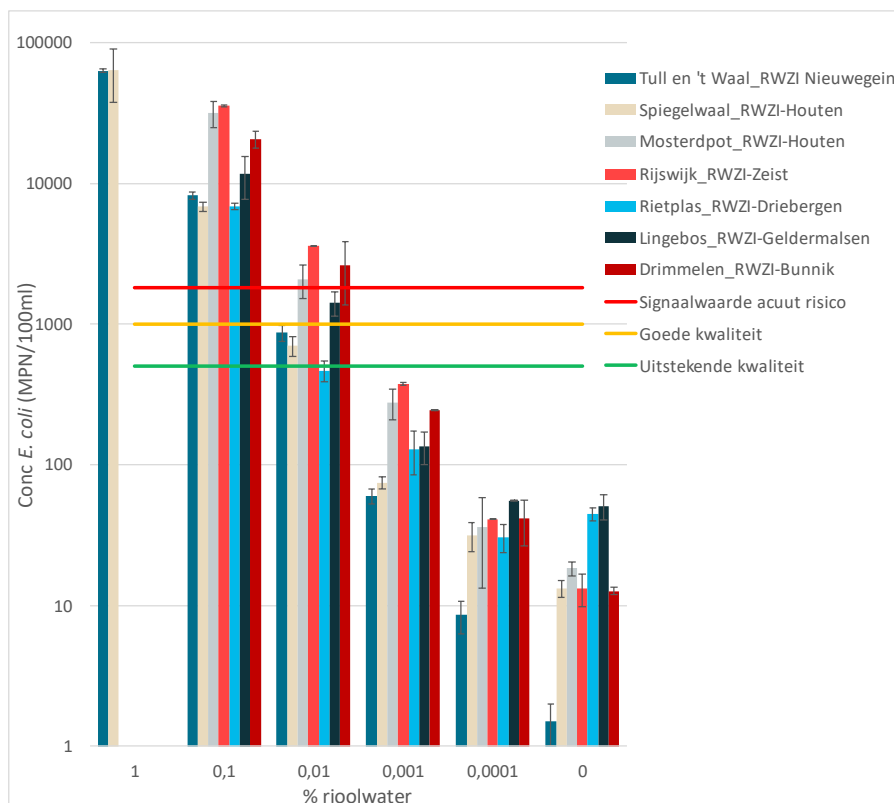
Tabel 3. Overzicht van de uitgevoerde analyses en de laboratoria waar deze analyses zijn uitgevoerd. Bact.: Humane bacteroides.

Datum monstername	Colilert	BACTcontrol	qPCR				
	Referentie	(enzymatisch)	Lab qPCR	Lab qPCR	UDetect	Sopachem	LuminUltra
22-3-2021	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
3-5-2021	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
30-8-2022	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i>	
31-8-2022	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i>	
1-9-2022	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i>	
5-9-2022	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i>	
7-9-2022	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i> /Bact.	<i>E. coli</i>	
Uitv. Lab.	KWR	KWR	Deltares	KWR	Deltares	Deltares	KWR

De analyseresultaten van de alternatieve methoden (BACTcontrol en de verschillende qPCR methoden) zijn vergeleken met de resultaten verkregen met de referentie-kweekmethode (Colilert).

3.2.2 Concentratie *E. coli* in mengmonsters: Colilert metingen

De concentratie kweekbare *E. coli* is in alle samengestelde monsters bepaald met Colilert, de meetwaarden zijn weergegeven in bijlage V en samengevat in Figuur 7.

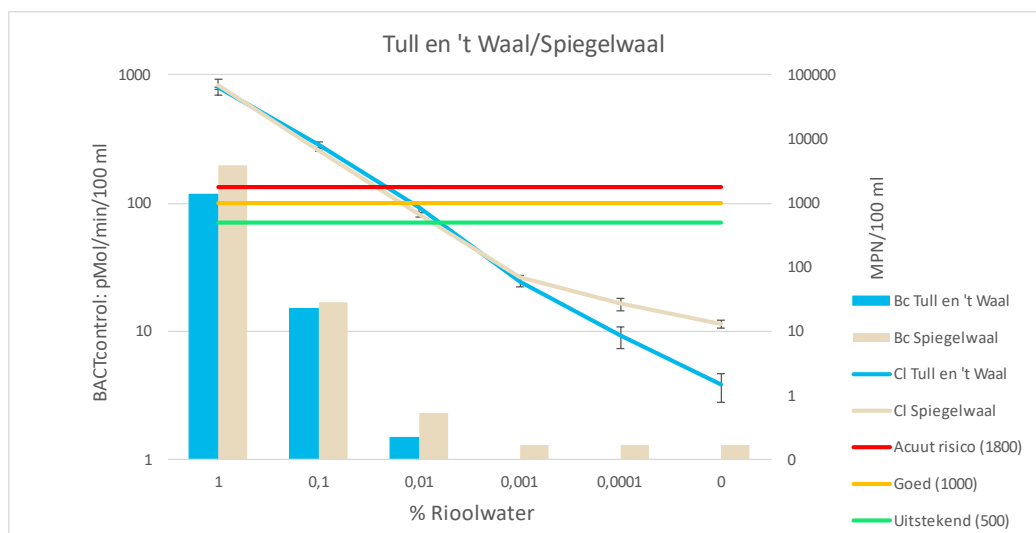


Figuur 7. De concentratie kweekbare *E. coli* in water van de onderzochte zwemlocaties (0%) en het water van deze locaties waaraan rioolwater is toegevoegd in verschillende verhoudingen (1; 0,1; 0,01; 0,001 en 0,0001% rioolwater). De error bars geven de standaard deviatie weer, de y-as heeft een logaritmische schaal.

De meetwaarden met Colilert laten zien dat variabele concentraties *E. coli* aanwezig zijn in de gebruikte rioolwaters. De toegevoegde 10-voudige verdunningsstappen van rioolwater aan het oppervlaktewater zijn duidelijk te onderscheiden waarbij elke 10-voudige verdunningsstap resulteert in een afname van de concentratie *E. coli* met een factor dichtbij 10 (gemiddeld = 8,6 MPN/100 ml; SD = 3,3 MPN/100 ML voor de afname in de monsters met 1; 0,1 en 0,001% rioolwater). In de figuur zijn ook grenswaarden op basis waarvan uitspraken gedaan kunnen worden over de hygiënische kwaliteit van het water, hierbij is 1800 MPN/100 ml als signaalwaarde voor acuut risico, 1000 MPN/100 ml als grenswaarde voor goede kwaliteit en 500 MPN/100 ml als grenswaarde voor uitstekende kwaliteit (deze waarden zijn afgeleid van de waarden uit de Europese zwemwaterrichtlijn, Figuur 1). De toevoeging van 1% rioolwater is alleen uitgevoerd in de monsters van 2021 (Tull en 't Waal en Spiegelwaal), vanwege de zeer hoge concentratie *E. coli* in deze monsters zijn deze monsters in het onderzoek van 2022 niet meer meegenomen. De resultaten laten zien dat een toevoeging van 0,1% rioolwater of meer in alle monsters resulteert in een concentratie *E. coli* ruim boven de 1800 MPN/100 ml. Bij een concentratie van 0,001% rioolwater voldoen alle mengsels aan het criterium "uitstekende kwaliteit".

3.2.3 BACTcontrol

Op de mengmonsters van riool- en oppervlaktewater zijn analyses uitgevoerd met BACTcontrol. In bijlage V zijn alle meetwaarden met BACTcontrol weergegeven en in Figuur 8 zijn, voor de monsters uit 2021 (Tull en 't Waal en Spiegelwaal), de meetwaarden van BACTcontrol vergeleken met de meetwaarden met Colilert.

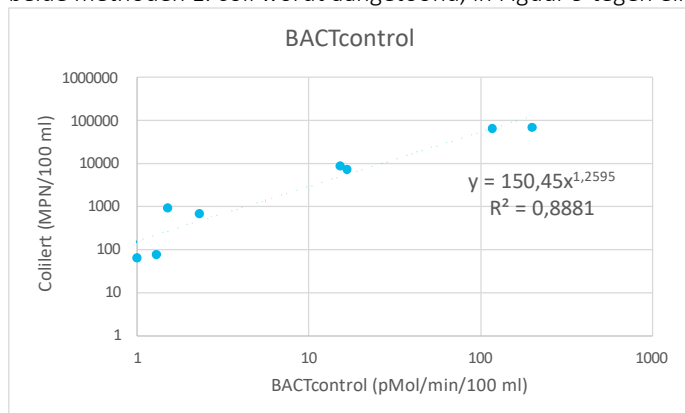


Figuur 8. Vergelijking meetwaarden verkregen met BACTcontrol (Bc) en de Colilert (Cl) kweekmethode in oppervlaktewater van Tull en 't Waal en Spiegelwaal waaraan rioolwaterverdundingen van resp. RWZI Nieuwegein en RWZI Houten zijn toegevoegd. Met horizontale lijnen zijn de grenswaarden op basis van kweekbare *E. coli* concentraties weergegeven. De linker y-as geeft de waarden gemeten met BACTcontrol weer (pMol/min/100 ml) en de rechter y-as geeft de kweekresultaten met Colilert weer (MPN/100 ml). Bij beide y-assen zijn de waarden op een log-schaal weergegeven.

De, met Colilert gemeten, waarden maken duidelijk dat de concentratie *E. coli* in het geanalyseerde oppervlaktewater van locatie Tull en 't Waal erg laag is (1,5 MPN/100 ml), de concentratie in het water van Spiegelwaal is hoger (13,3 MPN/100 ml). De toevoeging van 10-voudige verdunningsreeksen rioolwater resulteert in *E. coli* concentraties (met Colilert) die bij elke verdunningsstap afnemen met een factor dichtbij 10. In het

mengwater met 0,01% rioolwater voldoet het water, op basis van kweek, nog net aan het criterium van “uitstekende kwaliteit” (resp. 865 en 655 MPN/100 ml) en bij toevoeging van 0,1% rioolwater wordt de signaalwaarde voor “acuut risico” overschreden (resp. 8182 en 6675 MPN/100 ml). Met BACTcontrol is er in het water van Tull en 't Waal *E. coli* detecteerbaar bij toevoeging van 0,01% rioolwater, in het water van Spiegelwaal is er *E. coli* aantoonbaar in alle monsters (ook zonder toevoeging van rioolwater). De toevoeging van 1, 0,1 of 0,01% rioolwater resulteert in een duidelijke toename van het, met BACTcontrol, gemeten signaal en dit signaal neemt duidelijk toe bij toevoeging van een groter aandeel rioolwater. Deze resultaten impliceren dat metingen met BACTcontrol kunnen worden gebruikt om inzicht te krijgen in het besmettingsniveau van oppervlaktewater en dat de range waarbinnen metingen kunnen plaats vinden inzicht kunnen geven in de verschillende kwaliteitsniveaus.

Metingen met BACTcontrol zijn ook uitgevoerd op de in 2022 samengestelde mengmonsters (Tabel 3). Vanwege technische problemen met het voor deze monsters gebruikte BACTcontrol systeem is er met deze metingen geen bruikbare data verkregen. Bij de metingen op deze monsters resulteerden de verdunningstappen van het rioolwater niet in een duidelijke afname van het BACTcontrol signaal (bijlage V). De resultaten van deze metingen zijn daarom niet meegenomen in dit onderzoek. Om een globale indruk te krijgen van het verband tussen het signaal met BACTcontrol en kweekbare *E. coli* met Colilert zijn deze meetwaarden van monsters, waarin met beide methoden *E. coli* wordt aangetoond, in Figuur 9 tegen elkaar uitgezet.

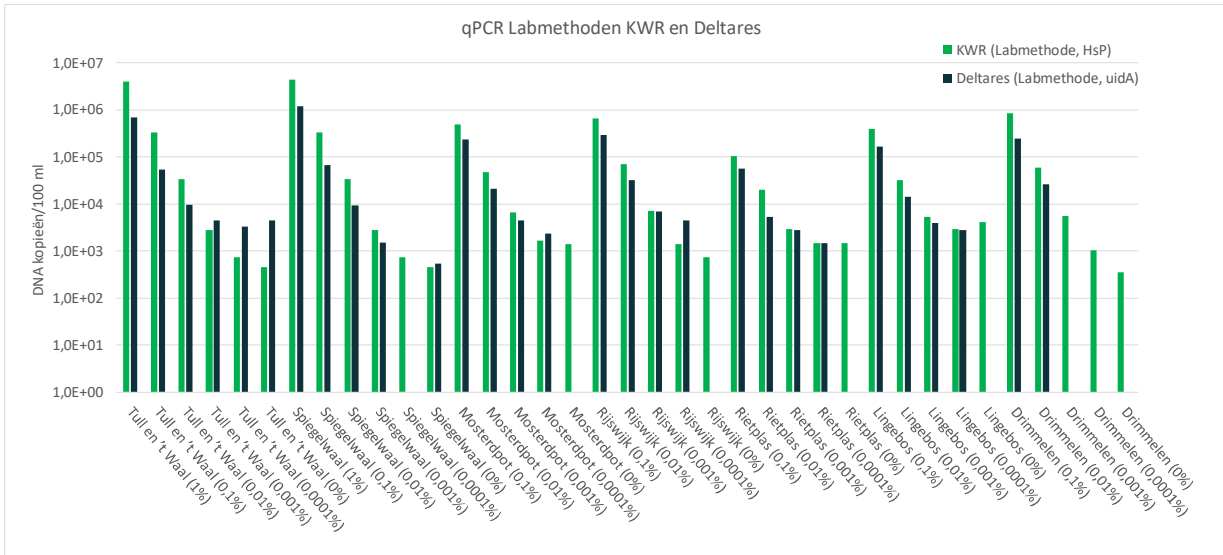


Figuur 9. Vergelijking tussen BACTcontrol voor kwantificatie van *E. coli* en kweek met Colilert op mengsels van oppervlaktewater (afkomstig van de zwemwaterlocaties van Tull en 't Waal en Spiegelwaal) met 10-voudige verdunningsreeksen van rioolwater (afkomstig van de RWZI's Nieuwegein en Houten). Op zowel de x-as als de y-as zijn de waarden op een log-schaal weergegeven.

Deze figuur laat zien dat er, op basis van een beperkt aantal meetwaarden, een duidelijke correlatie ($R^2 = 0,89$) is tussen meetwaarden met BACTcontrol en Colilert. Een uitgebreidere dataset zal nodig zijn om betrouwbaarder inzicht te krijgen in de relatie tussen BACTcontrol en Colilert.

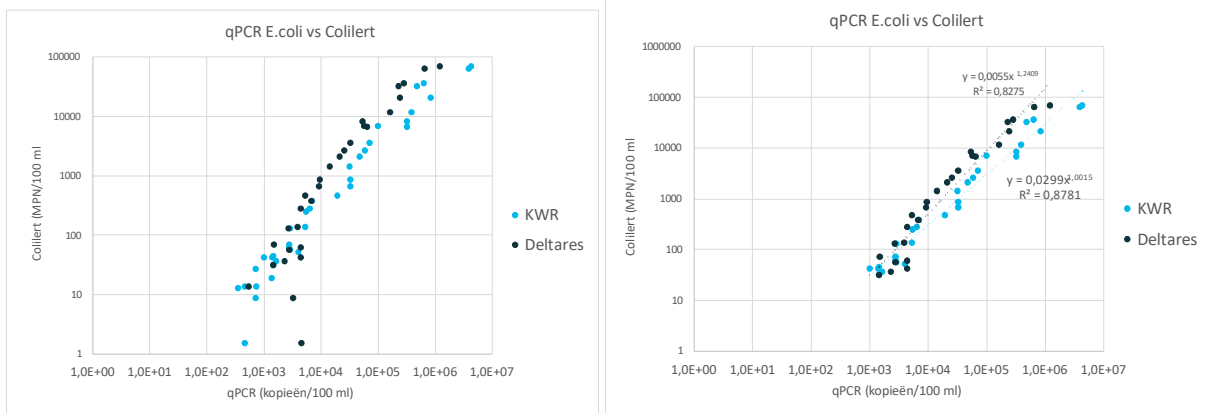
3.2.4 qPCR: labmethoden

Op alle samengestelde mengsels van oppervlaktewater en een verdunningsreeks van rioolwater zijn ook analyses uitgevoerd met de qPCR methoden die bij de laboratoria van KWR en Deltares beschikbaar zijn voor kwantificatie van *E. coli* in oppervlaktewater. In bijlage VI en VII zijn de meetwaarden weergegeven en in Figuur 10 zijn de resultaten van deze analyses samengevat.



Figuur 10. Vergelijking meetwaarden verkregen met lab-qPCR methoden van KWR en Deltares op mengsels van oppervlaktewater (afkomstig van verschillende zwemwaterlocaties) met 10-voudige verdunningsreeksen van rioolwater (afkomstig van verschillende RWZI's). Op de y-as zijn de waarden op een log-schaal weergegeven.

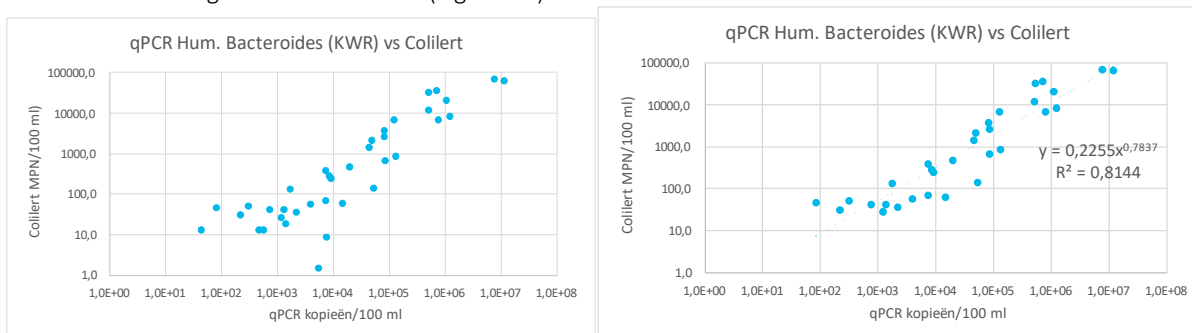
De analyses maken duidelijk dat de verdunningen van rioolwater in het oppervlaktewater zorgen voor een stapsgewijze afname van de meetwaarden met qPCR waarbij de resultaten van de qPCR methoden van KWR en Deltares vergelijkbaar zijn. De meetwaarden met de qPCR van KWR zijn enigszins hoger dan de meetwaarden met de qPCR methode van Deltares. Vanwege het toepassen van verschillende methoden voor isolatie van DNA en verschillende genen voor detectie van *E. coli* met qPCR door de beide laboratoria zijn er verschillen te verwachten, deze verschillen zijn echter beperkt. De resultaten van de beide qPCR methoden zijn ook vergeleken met de resultaten van de Colilert analyses, de resultaten van deze vergelijking is samengevat in Figuur 11.



Figuur 11. Vergelijking tussen lab-qPCR voor kwantificatie van *E. coli* en kweek met Colilert op mengsels van oppervlaktewater (afkomstig van verschillende zwemwaterlocaties) met 10-voudige verdunningsreeksen van rioolwater (afkomstig van verschillende RWZI's). Voor het bepalen van een optimale trendline zijn in de rechter figuur de lage meetwaarden (<25 MPN/100 ml) weggelaten. Op zowel de x-as als de y-as zijn de waarden op een log-schaal weergegeven.

Bovenstaande analyses laten zien dat er een duidelijke correlatie is tussen de met Colilert gemeten *E. coli* concentraties en de concentraties gemeten met de qPCR methoden bij beide laboratoria. De correlatie tussen beide methoden is vooral zeer goed bij de hogere concentraties, bij de meting van lagere concentraties treedt meer variatie op. Door te kijken naar concentratie waarbij de meetwaarden gaan afwijken van de trendline kan op basis van deze resultaten ook een globale schatting gemaakt worden van de onderste analysegrens van de beide

methoden. Voor de qPCR methode van KWR is deze onderste analysegrens ca. $5,4 \times 10^2$ DNA-kopieën/100 ml (bij ca 13,3 MPN/100 ml) voor beide methoden. Naast metingen van *E. coli* zijn er op deze samengestelde monsters ook metingen van humane Bacteroides uitgevoerd bij het laboratorium van KWR (meetwaarden: bijlage VI) en zijn deze resultaten vergeleken met Colilert (Figuur 12).



Figuur 12. Vergelijking tussen lab-qPCR voor kwantificatie van humane Bacteroides en kweek met Colilert op mengsels van oppervlaktewater (afkomstig van verschillende zwemwaterlocaties) met 10-voudige verdunningsreeksen van rioolwater (afkomstig van verschillende RWZI's). Op zowel de x-as als de y-as zijn de waarden op een log-schaal weergegeven. Vergelijking tussen lab-qPCR voor kwantificatie van E. coli en kweek met Colilert op mengsels van oppervlaktewater (afkomstig van verschillende zwemwaterlocaties) met 10-voudige verdunningsreeksen van rioolwater (afkomstig van verschillende RWZI's). Voor het bepalen van een optimale trendline zijn in de rechter figuur de lage meetwaarden (<25 MPN/100 ml) weggelaten. Op zowel de x-as als de y-as zijn de waarden op een log-schaal weergegeven.

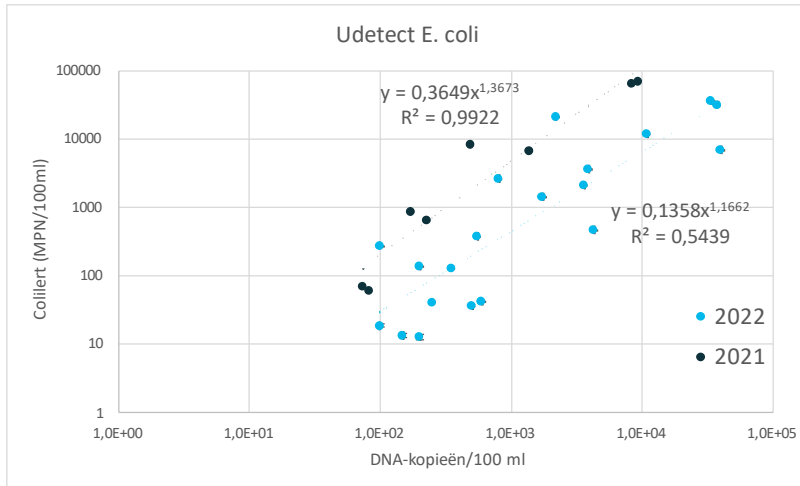
Deze resultaten laten zien dat er ook sterke correlatie ($R^2 = 0,81$) is tussen de concentraties humane Bacteroides aangetoond met qPCR en de concentraties kweekbare *E. coli* aangetoond met Colilert. Ook hier zien we een minder duidelijke correlatie voor de lage meetwaarden en zijn de monsters met lage concentraties weggelaten voor het bepalen van een trendline. Deze resultaten laten zien dat qPCR voor humane Bacteroides een bruikbaar alternatief kan zijn voor het aantonen van fecale verontreinigingen t.g.v. rioolwater (overstorten).

3.2.5 qPCR: “on-site” methoden

Op de samengestelde mengmonsters (Tabel 3) zijn analyses uitgevoerd met drie qPCR methoden die op locatie kunnen worden uitgevoerd en de resultaten zijn vergeleken met de resultaten van de referentiemethode (Colilert).

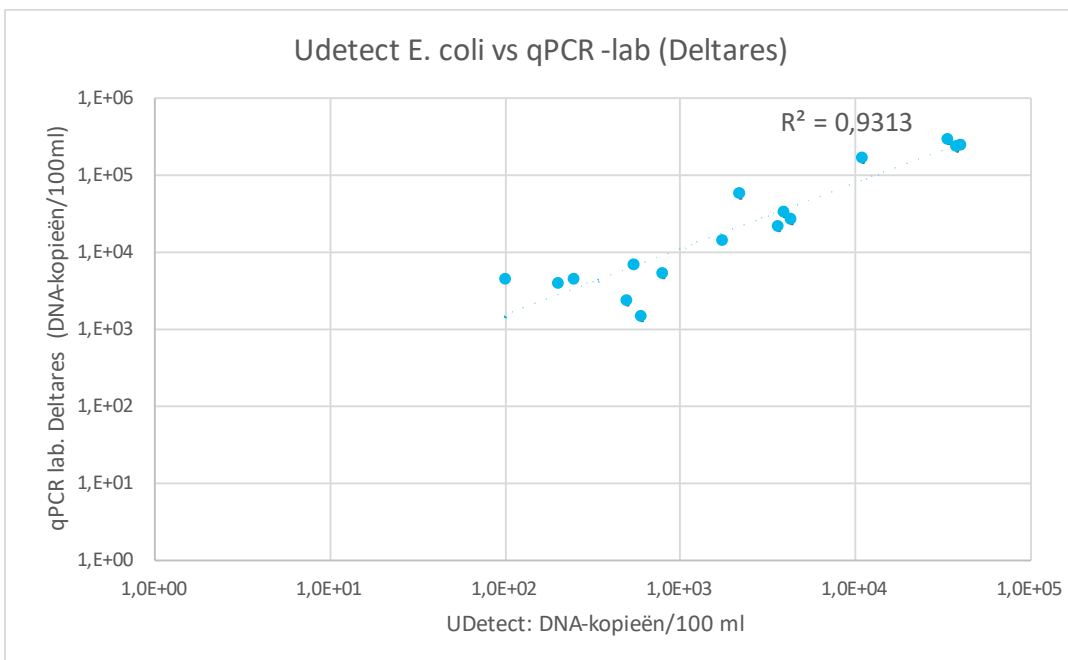
3.2.5.1 UDetect (Orvion)

De analyseresultaten van de UDetect methode op de verschillende mengmonsters zijn weergegeven in bijlage IX en samengevat in Figuur 13. Bij de UDetect methode vormt de analyse van een interne controle (IC) één van de onderdelen waardoor er een borging van de kwaliteit van de DNA-extractie en qPCR mogelijk is. Deze IC is voor de analyses van de monsters van 2022 toegepast voor het corrigeren van de uiteindelijke meetwaarden. Vanwege de toepassing van deze correctie in 2022 zijn de meetseries van 2021 en 2022 als twee aparte meetseries beschouwd. Verminderde opbrengst van de DNA-isolatie of de aanwezigheid van verontreinigingen in de monstermatrix waardoor remming van de qPCR reacties optreedt wordt met de analyse van deze IC zichtbaar gemaakt. Bij de analyses van de mengmonsters traden er problemen op met een deel van de monsters van 2022. Bij de monsters van de Rietplas (07-09-2022) gaven de analyses van de IC aan dat in deze monsters mogelijk problemen waren geweest met de DNA-extractie of dat in deze monsters remming van de qPCR was opgetreden, in deze monsters werd daarom ook geen *E. coli* aangetoond. Daarnaast werd er in de monsters van het Lingebos (05-09-2022) geen *E. coli* aangetoond. Pas na heranalyse van deze monsters lukte het om in deze beide series toch *E. coli* te kwantificeren, het is daarbij echter de vraag in hoeverre deze meetwaarden betrouwbaar zijn geweest.



Figuur 13. Vergelijking tussen qPCR met UDetect voor kwantificatie van *E. coli* en kweek met Colilert op mengsels van oppervlaktewater (afkomstig van verschillende zwemwaterlocaties) met 10-voudige verdunningsreeksen van rioolwater (afkomstig van verschillende RWZI's). Op zowel de x-as als de y-as zijn de waarden op een log-schaal weergegeven.

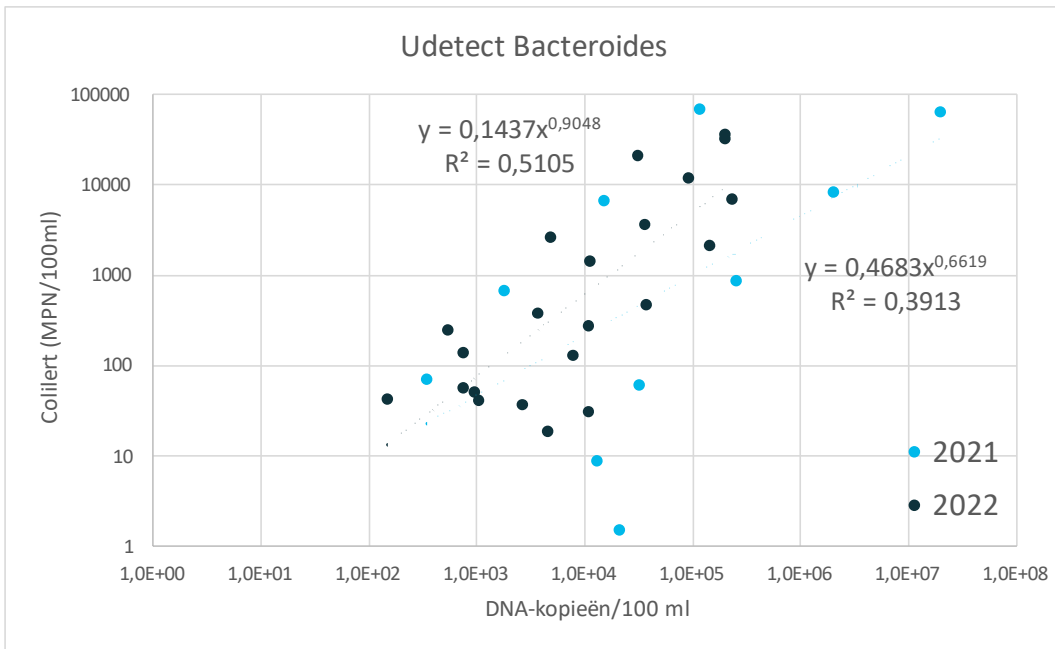
De vergelijking tussen Colilert en Udetect (voor detectie van *E. coli*) laat, in 2021 en 2022, een verband zien tussen de meetwaarden met beide methoden (Figuur 13). Op basis van de R^2 (2021: 0,99 en 2022: 0,54; Figuur 13) is dit verband in 2022 minder sterk dan bij de vergelijking tussen de lab-qPCR en Colilert (Figuur 11, $R^2 = 0,878$). Deze minder duidelijke correlatie kan het gevolg zijn van een variabelere opbrengst van de DNA-extractie stap van de UDetect methode in een deel van de monsters van 2022 (resultierend in de hierboven genoemde analyseproblemen bij een deel van de monsters). Het is ook mogelijk dat de correlatie tussen kweek en qPCR in de monsterreeks van 2022 minder sterk is dan in de reeks van 2021. Om beter inzicht te krijgen in de waargenomen verschillen is er voor de monsterserie van 2022 ook een vergelijking uitgevoerd tussen de resultaten met UDetect en de resultaten met de qPCR's uitgevoerd op het lab (van Deltares). Het resultaat van deze vergelijking is weergegeven in Figuur 14.



Figuur 14. Vergelijking Udetect met qPCR labmethode (Deltares)

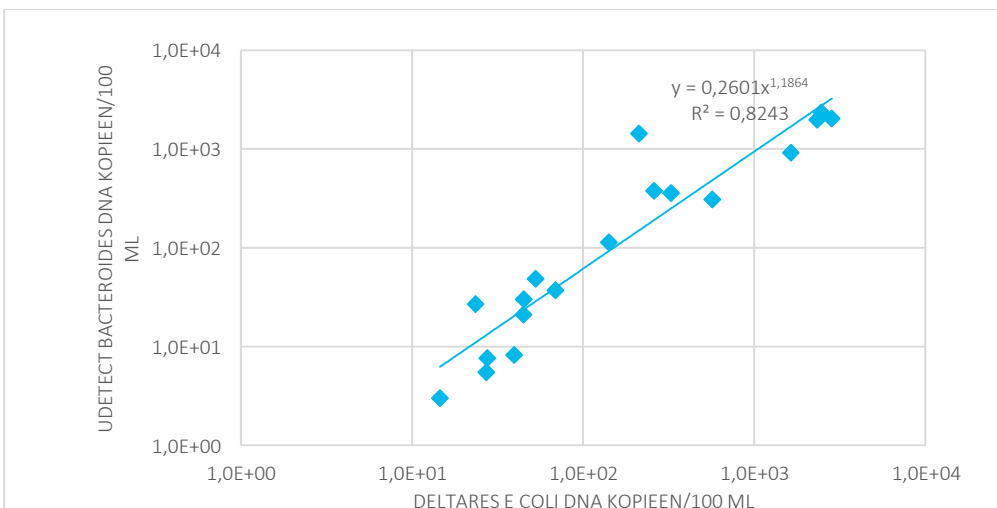
Deze vergelijking laat zien dat er een zeer goede correlatie is tussen de metingen met Udetect en de labmetingen op de monsters van 2022. Dit geeft aan dat de lagere correlatie tussen Udetect en kweek Figuur 13 waarschijnlijk voor een deel het gevolg is van grotere variatie tussen DNA-kopieën en kweekbare *E. coli* in de monsterserie van 2022.

Bij het gebruik van UDetect voor het aantonen van humane Bacteroides is er ook een verband tussen humane Bacteroides en metingen van *E. coli* met Colilert (Figuur 15: $R^2 = 0,51$ in 2021 en $R^2 = 0,39$ in 2022) maar dit verband is minder sterk dan bij het gebruik van de labmethode (op de monsterseries van 2021 en 2022) voor detectie van humane bacteroides (Figuur 12, $R^2 = 0,81$).



Figuur 15. Vergelijking tussen qPCR met de methode van UDetect voor kwantificatie van humane Bacteroides en kweek met Colilert op mengfels van oppervlaktewater (afkomstig van verschillende zwemwaterlocaties) met 10-voudige verdunningsreeksen van rioolwater (afkomstig van verschillende RWZI's). Op zowel de x-als de y-as zijn de waarden op een log-schaal weergegeven.

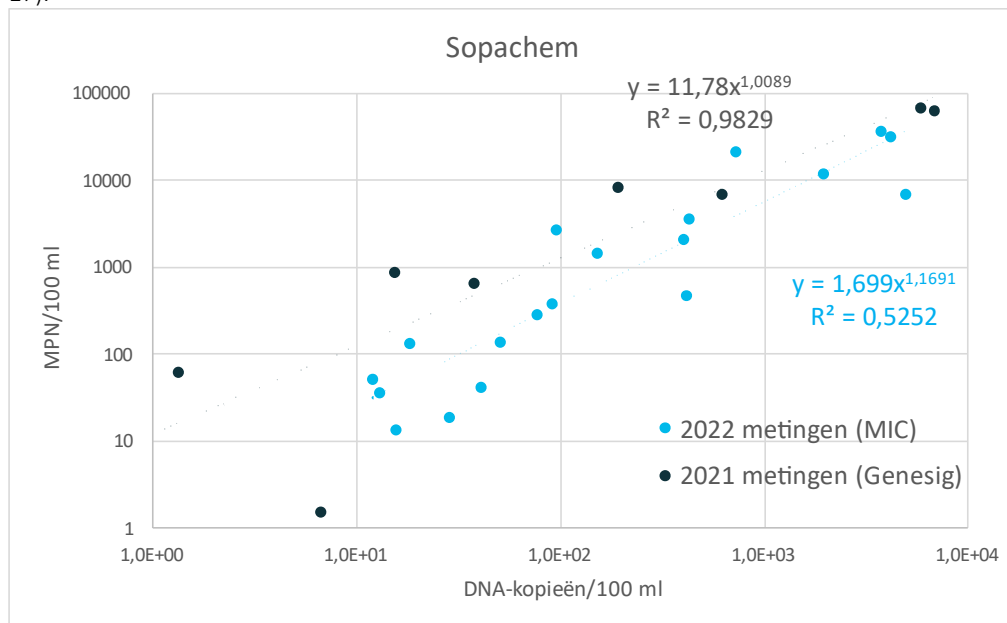
Ook voor deze vergelijking geldt dat de correlatie tussen Bacteroides metingen met Udetect en de labmetingen voor *E. coli* voor de monsters uit 2022 een zeer goede correlatie laat zien Figuur 16.



Figuur 16. Relatie tussen detectie van humane Bacteroides met Udetect en *E. coli* met de lab qPCR van Deltares

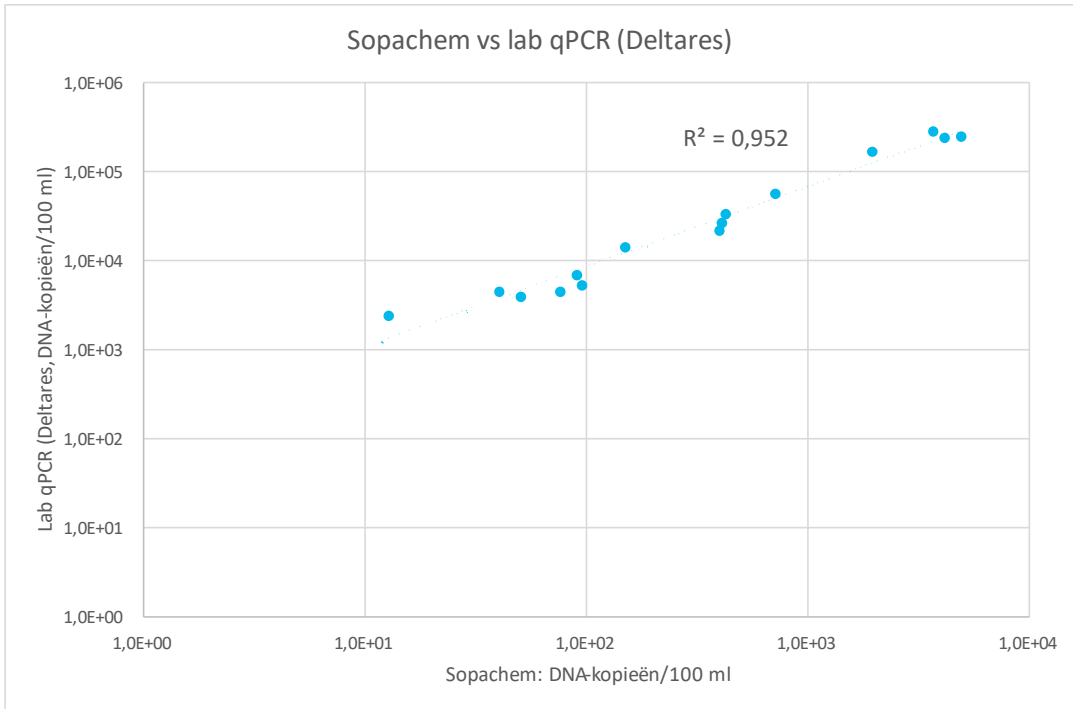
3.2.5.2 Sopachem methode

Bij de qPCR methode van Sopachem zijn er ook verschillen tussen de aanpak van 2021 en 2022. In beide jaren zijn er namelijk verschillende qPCR kits gebruikt en zijn er verschillende instrumenten voor het uitvoeren van de analyses toegepast. Het is daarom te verwachten dat er verschillen kunnen optreden tussen de resultaten verkregen in de beide jaren en de resultaten zijn daarom weergegeven als twee verschillende datasets (Figuur 17).



Figuur 17. Vergelijking tussen qPCR met de methode van Sopachem voor kwantificatie van *E. coli* en kweek met Colilert op mengsels van oppervlaktewater (afkomstig van verschillende zwemwaterlocaties) met 10-voudige verdunningsreeksen van rioolwater (afkomstig van verschillende RWZI's). Op zowel de x-as als de y-as zijn de waarden op een log-schaal weergegeven.

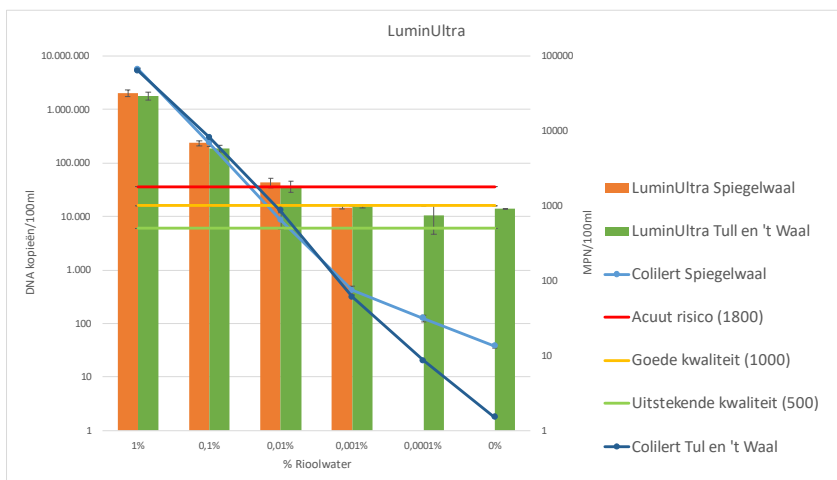
De figuur laat, in beide jaren, een duidelijke relatie zien tussen de meetwaarden met Colilert en de meetwaarden verkregen met de qPCR methode van Sopachem. Ook bij deze meetwaarden is de correlatie voor de metingen van 2022 ($R^2=0,98$) minder sterk dan de correlatie van de metingen in 2021 ($R^2=0,52$). Een vergelijking tussen de metingen met de methode van Sopachem en de qPCR metingen op het lab van Deltares op de monsters van 2022 laat een zeer goede correlatie zien tussen deze twee meetseries ($R^2=0,95$).



Net als bij de meetserie uit 2022 met het Udetect systeem laat deze vergelijking zien dat er een zeer goede correlatie is tussen de qPCR resultaten van het systeem van Sopachem en de resultaten van de qPCR analyses uitgevoerd op het lab. De waargenomen grotere variatie in 2022 tussen kweek qPCR met het Sopachem systeem lijken dus niet geheel gerelateerd aan de gebruikte methode maar meer aan de grotere variatie tussen DNA-kopieën en kweekbare *E. coli* in de monsterserie van 2022

3.2.5.3 LuminUltra

De LuminUltra methode is alleen uitgevoerd op de monsters van de twee locaties uit 2021 om daarmee een eerste indruk te krijgen van de mogelijkheden van dit systeem. De resultaten van de analyses en de vergelijking met Colilert is samengevat in Figuur 18.



Figuur 18. Vergelijking tussen qPCR met de methode van LuminUltra voor kwantificatie van *E. coli* en kweek met Colilert op mengsels van oppervlaktewater (afkomstig van de zwemwaterlocaties van Tull en 't Waal en Spiegelwaal) met 10-voudige verdunningsreeksen van rioolwater (afkomstig van resp. de RWZI's van Nieuwegein en Houten). Op zowel de x-as als de y-as zijn de waarden op een log-schaal weergegeven.

De resultaten van de analyses met het LuminUltra systeem laten zien dat de verdunningsreeks van rioolwater goed zichtbaar is en dat er duidelijk verschillen zichtbaar zijn rond de verschillende kwaliteitsniveaus. LuminUltra lijkt daarmee potentieel bruikbaar voor het meten van de hygiënische kwaliteit van oppervlaktewater, de uitvoering van de analyses is echter tijdrovend en er is veel apparatuur voor nodig zodat “on-site” uitvoering van deze methode niet eenvoudig zal zijn.

3.2.5.4 Grenswaarden voor alternatieve methoden

De uitgevoerde analyses op mengsels van oppervlakte- en verdunningsreeksen van rioolwater laten zien dat er een verband is tussen de meetwaarden met de alternatieve methoden (BACTcontrol en verschillende qPCR-methoden) en de meetwaarden met de referentiemethode. Dit geeft aan dat het mogelijk is om op basis van metingen met alternatieve methoden een uitspraak te kunnen doen over de waterkwaliteit van het oppervlaktewater. Om te onderzoeken in hoeverre dit mogelijk is zijn er globale grenswaarden voor verschillende kwaliteitsniveaus bepaald. Hiervoor is gebruik gemaakt van de formules behorende bij de verschillende “trendlijnen” en is berekend welke waarde van de alternatieve methode hoort bij de kwaliteitsniveaus op basis van Colilert. Hierbij zijn de volgende kwaliteitsniveaus onderzocht en de corresponderende niveaus op basis van de alternatieve methode zijn bepaald (Tabel 4):

- Acut risico: >1800 MPN/100 ml
- 1000-1800 MPN/100 ml
- 500-1000 MPN/100 ml
- <500 MPN/100 ml

Tabel 4. Globale theoretische kwaliteitsniveaus bij het toepassen van de verschillende alternatieve methoden.

MPN/100 ml	>1800	1000-1800	500-1000	<500
Jaar	2021/2022	2021/2022	2021/2022	2021/2022
BACTcontrol	>11,7	8,2-11,7	5,4-8,2	<5,4
Lab qPCR <i>E. coli</i> (KWR)	>5,9 ^E +04	3,3 ^E +04-5,9 ^E +04	1,7 ^E +04 - 3,3 ^E +04	<1,7 ^E +04
Lab qPCR Bacteroides (KWR)	>6,2 ^E +04	3,01 ^E +04-6,19+04	1,3 ^E +04-3,0 ^E +04	<1,3 ^E +04
Lab qPCR (Deltares)	>2,8 ^E +04	1,73 ^E +04-2,78 ^E +04	9,9 ^E +03-1,7 ^E +04	<9,9 ^E +03
UDetect				
2021	>5,0 ^E +02	3,3 ^E +02-5,0 ^E +02	2,0 ^E +02-3,3 ^E +02	<2,0 ^E +02
2022	>3,1 ^E +03	1,8 ^E +03-3,1 ^E +03	9,8 ^E +02-1,8 ^E +03	<9,8E+02
Sopachem				
2021	>3,9 ^E +02	8,2 ^E +01-3,9 ^E +02	4,1 ^E +01-8,2 ^E +01	<4,1 ^E +01
2022	>3,9 ^E +02	2,3 ^E +02-3,9 ^E +02	1,3 ^E +02-2,3 ^E +02	<1,3 ^E +02

Het is duidelijk dat deze berekeningen zijn gebaseerd op een beperkt aantal metingen op kunstmatig samengestelde mengmonsters en dat deze grenswaarden slechts indicatief zijn. Voor het bepalen van nauwkeuriger grenswaarden waarmee betrouwbare uitspraken kunnen worden gedaan over de hygiënische status van zwemwater in de praktijk is meer data nodig waarbij niet alleen data van kunstmatig samengestelde mengsels maar ook data van praktijkmonsters moet worden meegenomen. Met meer praktijkdata kan nauwkeuriger het verband tussen qPCR en kweekresultaten worden bepaald op basis waarvan grenswaarden kunnen worden bepaald waarmee betrouwbare uitspraken kunnen worden gedaan over de hygiënische betrouwbaarheid van het zwemwater.

Op basis van deze globale kwaliteitsniveaus uit Tabel 5 is de kwaliteit van alle samengestelde mengsels beoordeeld en vergeleken met de niveaus op basis van de Colilert referentiemethode. De resultaten van deze

beoordeling zijn weergegeven in Tabel 5. Deze vergelijking laat vergelijkbare trends zien tussen de resultaten van de alternatieve methoden en die van Colilert.

Tabel 5. Beoordeling van de waterkwaliteit door gebruik te maken van de verschillende methoden op basis van de in Figuur 1 gedefinieerde kwaliteitsniveaus.

Datum	Oppervlaktewater	% Rioolwater	Coli lert	qPCR Lab			qPCR "on-site"			BACTcontrol
				E. Coli KWR	Bact. KWR	E. coli Deltares	E. coli Udetect	Bact. Udetect	E. coli Sopachem	
22-3-2021	Tull en 't Waal	1	63095	3,9E+06	1,2E+07	6,7E+05	8,5E+03	2,0E+07	6,8E+03	117
22-3-2021	Tull en 't Waal	0,1	8183	3,3E+05	1,3E+06	5,3E+04	5,0E+02	2,0E+06	1,9E+02	15
22-3-2021	Tull en 't Waal	0,01	865	3,3E+04	1,3E+05	9,7E+03	1,7E+02	2,6E+05	1,5E+01	2
22-3-2021	Tull en 't Waal	0,001	60	2,8E+03	1,5E+04	4,4E+03	8,3E+01	3,3E+04	1,3E+00	1
22-3-2021	Tull en 't Waal	0,0001	9	7,3E+02	7,7E+03	3,3E+03		1,3E+04	6,7E-01	
22-3-2021	Tull en 't Waal	0	2	4,7E+02	5,5E+03	4,5E+03		2,2E+04	6,7E+00	
3-5-2021	Bimmen	1	68195	4,3E+06	7,8E+06	1,2E+06	9,4E+03	1,2E+05	5,9E+03	199
3-5-2021	Bimmen	0,1	6678	3,3E+05	7,9E+05	6,6E+04	1,4E+03	1,5E+04	6,2E+02	17
3-5-2021	Bimmen	0,01	655	3,3E+04	8,7E+04	9,4E+03	2,3E+02	1,8E+03	3,8E+01	2
3-5-2021	Bimmen	0,001	70	2,8E+03	7,4E+03	1,5E+03	7,4E+01	3,5E+02		1
3-5-2021	Bimmen	0,0001	27	7,3E+02	1,2E+03					
3-5-2021	Bimmen	0	13	4,7E+02	5,8E+02	5,4E+02				
30-8-2022	Mosterdpod	0,1	31650	4,8E+05	5,3E+05	2,3E+05	3,8E+04	2,0E+05	4,2E+03	
30-8-2022	Mosterdpod	0,01	2075	4,8E+04	4,9E+04	2,1E+04	3,6E+03	1,4E+05	4,1E+02	
30-8-2022	Mosterdpod	0,001	276	6,5E+03	8,6E+03	4,5E+03	1,0E+02	1,1E+04	7,8E+01	
30-8-2022	Mosterdpod	0,0001	36	1,6E+03	2,2E+03	2,4E+03	5,0E+02	2,7E+03	1,3E+01	
30-8-2022	Mosterdpod	0	18	1,4E+03	1,5E+03		1,0E+02	4,6E+03	2,9E+01	
31-8-2022	Rijswijk	0,1	35450	6,4E+05	7,3E+05	2,8E+05	3,4E+04	2,1E+05	3,7E+03	
31-8-2022	Rijswijk	0,01	3590	7,1E+04	8,3E+04	3,3E+04	3,9E+03	3,6E+04	4,3E+02	
31-8-2022	Rijswijk	0,001	374	7,0E+03	7,5E+03	6,9E+03	5,5E+02	3,7E+03	9,2E+01	
31-8-2022	Rijswijk	0,0001	41	1,4E+03	7,6E+02	4,5E+03	2,5E+02	1,1E+03	4,1E+01	
31-8-2022	Rijswijk	0	13	7,5E+02	4,5E+01		1,5E+02		1,6E+01	
7-9-2022	Rietplas	0,1	6845	1,0E+05	1,3E+05	5,7E+04	4,0E+04	2,4E+05	4,9E+03	
7-9-2022	Rietplas	0,01	465	2,0E+04	2,0E+04	5,3E+03	4,3E+03	3,8E+04	4,2E+02	
7-9-2022	Rietplas	0,001	129	2,9E+03	1,8E+03	2,7E+03	3,5E+02	7,8E+03	1,8E+01	
7-9-2022	Rietplas	0,0001	31	1,5E+03	2,2E+02	1,5E+03		1,1E+04		
7-9-2022	Rietplas	0	45	1,5E+03	8,4E+01					
5-9-2022	Lingebos	0,1	11625	3,9E+05	5,2E+05	1,6E+05	1,1E+04	9,3E+04	2,0E+03	
5-9-2022	Lingebos	0,01	1415	3,2E+04	4,5E+04	1,4E+04	1,8E+03	1,1E+04	1,5E+02	
5-9-2022	Lingebos	0,001	136	5,3E+03	5,4E+04	4,0E+03		7,6E+02	5,1E+01	
5-9-2022	Lingebos	0,0001	56	2,8E+03	4,0E+03	2,8E+03		7,6E+02		
5-9-2022	Lingebos	0	51	4,1E+03	3,1E+02			9,7E+02	1,2E+01	
1-9-2022	Drimmelen	0,1	20650	8,5E+05	1,1E+06	2,5E+05	2,2E+03	3,1E+04	7,2E+02	
1-9-2022	Drimmelen	0,01	2615	5,9E+04	8,5E+04	2,6E+04	8,0E+02	4,9E+03	9,6E+01	
1-9-2022	Drimmelen	0,001	245	5,6E+03	9,4E+03			5,5E+02		
1-9-2022	Drimmelen	0,0001	42	1,0E+03	1,3E+03			1,5E+02		
1-9-2022	Drimmelen	0	13	3,5E+02	4,8E+02					
				>1800 MPN/100 ml						
				1000-1800 MPN/100 ml						
				500-1000 MPN/100 ml						
				< 500 MPN/100 ml						

3.3 Inclusiviteit/exclusiviteit

Bij het bepalen van de inclusiviteit en exclusiviteit van de mobiele qPCR methoden voor detectie van *E. coli* is onderzocht of met de methode *E. coli* stammen met verschillende kunnen worden aangetoond (inclusiviteit) en in hoeverre met de methode geen andere bacteriesoorten worden aangetoond. De inclusiviteit en exclusiviteit is onderzocht door qPCR analyses uit te voeren op DNA afkomstig van zuivere bacteriecultures van bekende bacteriesoorten. In het kader van deze validatie zijn er analyses uitgevoerd op 10 *E. coli* stammen van de ECOR referentiecollectie, deze collectie bevat *E. coli* stammen met verschillende geografische herkomst en verschillende

diersoorten waaruit deze zijn geïsoleerd [8]. De stammen gebruikt voor deze analyses zijn weergegeven in Tabel 6.

Tabel 6. Gebruikte stammen voor het bepalen van de inclusiviteit en exclusiviteit.

Stammen inclusiviteit			Stammen exclusiviteit		
1	<i>E. coli</i>	EcoR3	11	<i>Enterococcus cloacae</i>	WR3 (controlestam)
2	<i>E. coli</i>	EcoR4	12	<i>Staphylococcus warni</i>	WR51(controlestam)
3	<i>E. coli</i>	EcoR5	13	<i>Enterococcus faecium</i>	WR63 (controlestam)
4	<i>E. coli</i>	EcoR6	14	<i>Aeromonas hydrophila</i>	M800 (controlestam)
5	<i>E. coli</i>	EcoR7	15	<i>Enterococcus spp</i>	WR78 (controlestam)
6	<i>E. coli</i>	EcoR9	16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WP1 (controlestam)
7	<i>E. coli</i>	EcoR10	17	<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13046
8	<i>E. coli</i>	EcoR13	18	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC8070
9	<i>E. coli</i>	EcoR14	19	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC43863
10	<i>E. coli</i>	EcoR15	20	<i>Legionella anisa</i>	

Bij KWR zijn bovenstaande stammen gekweekt op een selectieve agarplaat en zijn er, vanuit een vers gegroeide losliggende kolonie, bacteriesuspensies samengesteld door wat koloniemateriaal te gebruiken voor het maken van een homogene suspensie in 1 ml drinkwater. Vanuit deze suspensies is een volume van 100 µl gebruikt voor het isoleren van DNA en aansluitende qPCR analyse met de systemen van LuminUltra, Sopachem, UDelect (Orvion) en de lab-qPCR van KWR. De resultaten van de inclusiviteit en exclusiviteitsanalyses zijn weergegeven in Tabel 7. Vanwege onverwachte analyseresultaten met stam EcoR4 en met het UDelect systeem zijn er analyses opnieuw uitgevoerd, de resultaten van deze heranalyses zijn in de tabel weergegeven en gemerkt met een *.

Tabel 7. Resultaten van de analyse voor het bepalen van de inclusiviteit en exclusiviteit. *Analyses van stam EcoR4 en de analyses met UDelect zijn, na negatieve resultaten, opnieuw uitgevoerd. NA: niet uitgevoerd

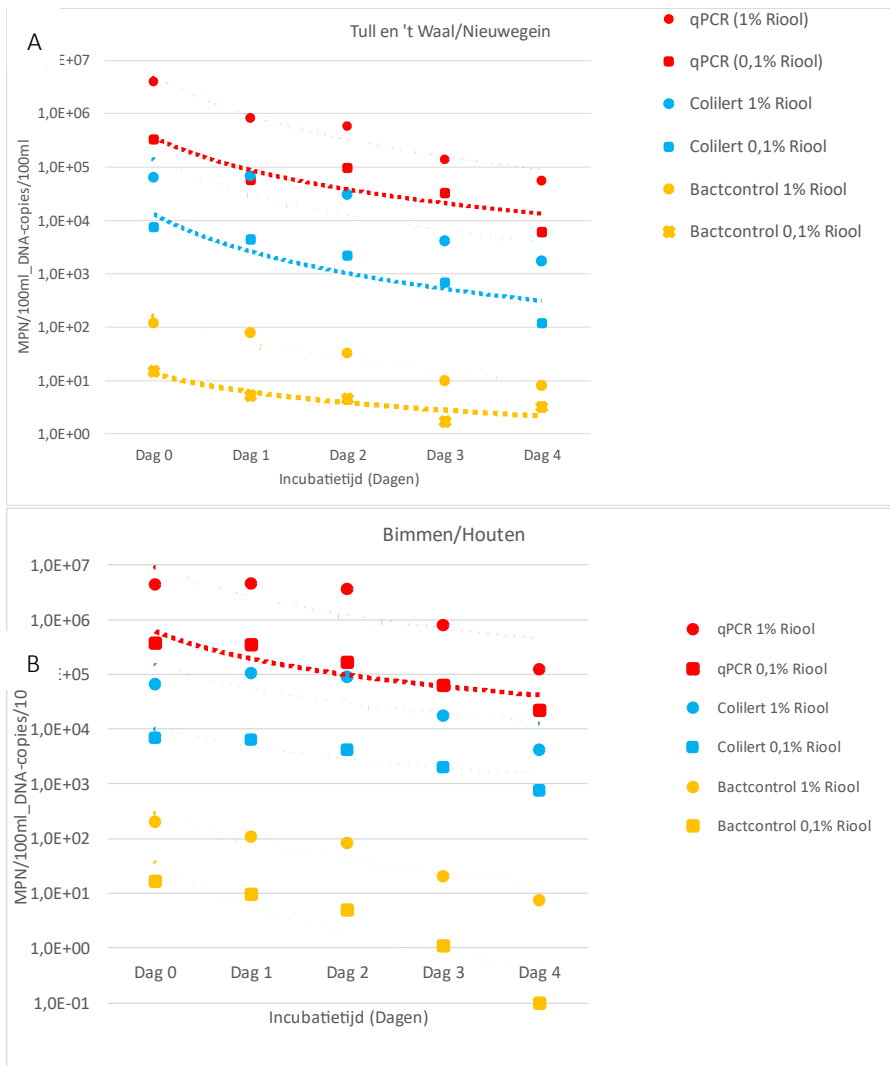
Stammen inclusiviteit	UDelect (Lab Deltares)	LuminUltra (Lab KWR)	Sopachem (Lab Deltares)	Hsp70 (Lab KWR)
1	<i>E. coli</i> (EcoR3)	Pos*	Pos	Pos
2	<i>E. coli</i> (EcoR4)*	Pos*	NA	Pos*
3	<i>E. coli</i> (EcoR5)	Pos*	Pos	Pos
4	<i>E. coli</i> (EcoR6)	Pos*	Pos	Pos
5	<i>E. coli</i> (EcoR7)	Pos*	Pos	Pos
6	<i>E. coli</i> (EcoR9)	Pos*	Pos	Pos
7	<i>E. coli</i> (EcoR10)	Pos*	Pos	Pos
8	<i>E. coli</i> (EcoR13)	Pos*	Pos	Pos
9	<i>E. coli</i> (EcoR14)	Pos*	Pos	Pos
10	<i>E. coli</i> (EcoR15)	Pos*	Pos	Pos
Stammen exclusiviteit				
11	<i>Enterococcus cloacae</i>	Neg	Neg	Neg
12	<i>Staphylococcus warni</i>	Neg	Neg	Neg

13	<i>Enterococcus faecium</i>	Neg	Neg	Neg	Neg
14	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Neg	Neg	Neg	Neg
15	<i>Enterococcus spp</i>	Neg	Neg	Neg	Neg
16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Neg	Neg	Neg	Neg
17	<i>Enterobacter cloacae</i>	Neg	Neg	Neg	Neg
18	<i>Citrobacter freundii</i>	Neg	Neg	Neg	Neg
19	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Neg	Neg	Neg	Neg
20	<i>Legionella anisa</i>	Neg	Neg	Neg	Neg

De resultaten laten zien dat alle tien onderzochte *E. coli* stammen met alle onderzochte methoden worden aangetoond. De tien niet-*E. coli* stammen worden met de onderzochte methoden niet aangetoond. Dit betekent dat de methoden, op basis van 20 onderzochte stammen, 100% inclusiviteit en 100% exclusiviteit laten zien.

3.4 Stabiliteit detectiesignaal

Om analyseresultaten goed te kunnen interpreteren en te kunnen gebruiken voor het beoordelen van de hygiënische kwaliteit van oppervlaktewater is het van belang om informatie te hebben over het verloop van het detectiesignaal in oppervlaktewater na de introductie van een verontreiniging. De toepassing van BACTcontrol in de stadsgrachten van Breda (hoofdstuk 5) liet namelijk zien dat het signaal van BACTcontrol relatief snel verdwijnt. Hierdoor lijkt BACTcontrol geschikt voor het aantonen van relatief “verse” verontreinigingen en minder geschikt voor het aantonen van een “oudere” verontreiniging. Voor het onderzoeken van de stabiliteit van het detectiesignaal is een experiment uitgevoerd waarbij monsters van de hierboven beschreven oppervlaktewaters (locaties Tull en ‘t Waal en Bimmen) zijn besmet met 1% en 0,1% rioolwater (van RWZI Nieuwegein en Houten) en vervolgens geïncubeerd gedurende vier dagen in een glazen fles in het daglicht. Van deze monsters is er dagelijks een deel gebruikt voor analyse met BACTcontrol, Colilert en de qPCR laboratorium methoden. De meetresultaten van de verschillende methoden zijn samengevat in Figuur 19. Deze analyses laten zien dat de signalen van qPCR, Colilert en ook BACTcontrol gedurende de vier dagen incubatie een vergelijkbaar verloop vertonen- in de mengsels van Tull en ‘t Waal en rioolwater uit Nieuwegein. In het mengsel van Bimmen en Houten lijkt het signaal van BACTcontrol wel sneller af te nemen. De snelle afname van het signaal met BACTcontrol lijkt dus onder gecontroleerde laboratorium omstandigheden niet altijd plaats te vinden. Wellicht treedt de snelle afname van signaal met BACTcontrol niet in alle situaties op en spelen specifieke omstandigheden in de praktijk daarbij een rol.



Figuur 19. Meetwaarden van analyses met qPCR, BACTcontrol en Colilert in oppervlaktewater van locatie Tull en 't Waal (A) of Bimmen (B) waaraan 1% of 0,1% rioolwater van RWZI Nieuwegein (A) of Houten (B) is toegevoegd en vervolgens 4 dagen geïncubeerd bij kamertemperatuur op het laboratorium van KWR.

4 Detectie *E. coli*, leptospiren en cyanotoxinegenen in zwemwater

Samenvatting

Zwemlocaties kunnen profijt hebben van een snellere microbiële waterkwaliteit monitoringsmethode om direct in te kunnen grijpen bij aanwezigheid van ziekteverwekkende micro-organismen die een risico vormen voor zwemmers, of om genomen maatregelen sneller te kunnen opheffen. Deze snelle detectie is mogelijk met mobiele qPCR. Orvion heeft de mobiele qPCR-kit UDetect geoptimaliseerd om eenvoudig in het veld te kunnen gebruiken. In dit project wordt deze mobiele qPCR-methode toegepast en vergeleken met MPN in diverse zwemwaterlocaties voor snelle, betrouwbare en simultane detectie van verschillende microbiologische targets.

Tijdens de zomer van 2020 is de studie uitgevoerd naar de toepassing van UDetect voor detectie van *E. coli*, *Leptospira*, en toxische blauwalgen in elf zoetwater oppervlaktewaterlocaties en drie zoutwaterlocaties. Daarbij is een directe vergelijking gemaakt van kwaliteit van DNA-isolatie in het veld en in het lab, en tussen qPCR in het veld en qPCR in het lab. Voor *E. coli* zijn de resultaten ook vergeleken met de MPN-methode die regulier door de waterschapslaboratoria wordt gehanteerd.

Dit project toont aan dat de mobiele qPCR UDetect gebruikt kan worden om simultaan de aanwezigheid van *E. coli* en blauwalgtoxine-genen te bepalen. Deze methode maakt het mogelijk om een gedegen en goede DNA-isolatie in het veld uit te voeren, wat de weg opent naar het gebruik van mobiele qPCR door waterbeheerders. Het detecteert te hoge concentraties van *E. coli* (>1800 cellen/100 mL volgens MPN), maar de resultaten bij lagere *E. coli* concentraties zijn nog niet consistent in vergelijking met MPN-concentraties. Daarnaast detecteert UDetect toxische blauwalgen vanaf een aanwezigheid van 2×10^3 genkopiën/mL toxine genen. Door lage concentraties of afwezigheid van *Leptospira* in de bemonsterde wateren is het te vroeg om conclusies te trekken voor *Leptospira* detectie.

Het wordt aanbevolen om in vervolgonderzoek de detectie van *E. coli* te verbeteren en mogelijk een andere microbiologische target (bijv *Bacteroidetes*) te kiezen voor detectie van fecale verontreiniging (voor het validatie-onderzoek (hoofdstuk 3) is de detectie methode van *E. coli* geoptimaliseerd ten opzichte van het praktijkonderzoek dat hier in hoofdstuk 4 wordt beschreven). Ook zou in vervolgonderzoek het waarschuwniveau van toxische blauwalgen langs de lat van huidige monitoring moeten worden gelegd om te komen tot een praktische screening tool op basis van mobiele qPCR. De detectie van *Leptospira* in water met de mobiele qPCR zou vaker ingezet kunnen worden in met water van bekende besmette locaties, om deze methode te kunnen valideren. Wanneer dit is uitgevoerd en geoptimaliseerd is de mobiele qPCR met behulp van UDetect een gedegen methode om deze microbiologische parameters in het veld snel en betrouwbare te detecteren.

4.1 Inleiding

4.1.1 Aanleiding van het onderzoek

Gezond zwemwater is van cruciaal belang om veilig te kunnen zwemmen in de daarvoor formeel aangewezen zwemlocaties. Tijdens het zwemseizoen is er een reguliere monitoring van de microbiële waterkwaliteit op de aangewezen zwemlocaties om in te kunnen grijpen als de risico's van de aanwezigheid van ziekteverwekkende micro-organismen voor de zwemmers te groot worden geacht. Een nadeel van deze reguliere monitoring is dat de resultaten pas na meerdere dagen beschikbaar zijn, waardoor de actuele waterkwaliteit voor zwemmers onvoldoende in beeld is. De moleculaire analysemethoden qPCR geeft sneller resultaten en kan ook direct in het veld uitgevoerd worden met mobiele apparatuur. Uit eerder onderzoek bleek het vaststellen van *E. coli* met de verschillende mobiele qPCR apparaten echter nog te onbetrouwbaar te zijn.

Het Nederlandse milieubiotechnologie bedrijf Orvion heeft de tekortkomingen van de mobiele qPCRs, zoals bemonstering en DNA-isolatie, sterk verbeterd. Zij hebben een snelle, nauwkeurige, en eenvoudige mobiele-qPCR-kit ontwikkeld voor het identificeren en kwantificeren van bacteriën in water, genaamd UDetect. De methode is ontwikkeld voor het monitoren van verschillende waterbronnen, waaronder ook zwaar vervuild oppervlaktewater. Deze mobiele qPCR-kit heeft drie voordelen: de workflow kan worden uitgevoerd door niet-specialisten, er is geen koeling van monsters/reagentia nodig, en er is geen randapparatuur nodig (pipetten, centrifuges, e.d.). Daarnaast maakt deze methode gebruik van een mobiel qPCR systeem van een Europese leverancier waarin 16 monsters tegelijkertijd kunnen worden geanalyseerd zodat er ook in duplo, controles en van meerdere locaties tegelijkertijd kan worden gewerkt in één analyse.

In dit onderzoek wordt deze mobiele qPCR-methode getest in diverse oppervlaktewateren en zoutwater voor snelle en betrouwbare detectie van verschillende microbiologische targets simultaan.

4.1.2 Doel van het onderzoek

Het doel van dit onderzoek is:

- 1 Veldtoepassing van UDetect DNA-isolatie in diverse Nederlandse oppervlaktewateren en zoutwaterlocaties.
- 2 Demonstratie van simultaan qPCR op 3 microbiologische targets (*E. coli*, *Leptospira* en blauwalgtoxine genen) op DNA dat in het veld is geïsoleerd
- 3 Vergelijking van mobiele qPCR in het veld (14 locaties) met qPCR in het laboratorium door middel van gangbare technologie.

4.1.3 Taakverdeling

De taakverdeling van de deelnemende partijen aan dit onderdeel van het onderzoek staat beschreven in Tabel 8.

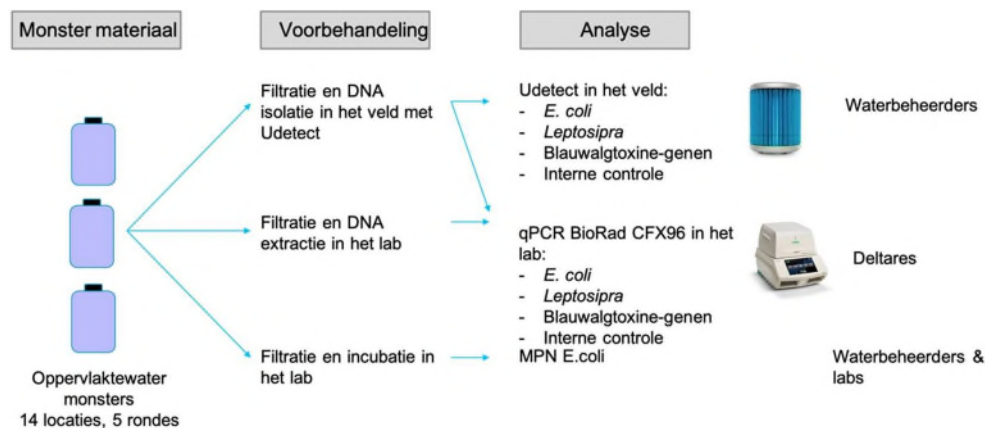
Tabel 8. Taakverdeling van deelnemende partijen.

Deelnemer	Projectrol
Deltares	Project coördinatie
	Uitvoeren UDetect analyse in het veld zoutwater locaties
	Validatie DNA-isolatie en qPCR metingen in zoete en zoute wateren
	Interpretatie resultaten
Orvion	Rapportage
	Training UDetect
	Aanleveren verbruiksmaterialen voor UDetect
	Interpretatie resultaten UDetect
Waterschappen	Rapportage
	Beschikbaar stellen watersysteem
RWS	Beschikbaar stellen watersysteem
Laboratoria Aquon & Aqualysis	Monsternamen en distributie monsters
	Uitvoeren UDetect analyse in het veld zoetwater locaties
	<i>E. coli</i> MPN
KWR	Overstijgend TKI project coördinator

4.2 Methode

4.2.1 Algemeen plan van aanpak

Gedurende de periode juni tot en met oktober 2020 werden op 14 locaties maandelijks de concentratie van microbiële targets bepaald (Figuur 20). Op 11 oppervlaktewaterlocaties werden de concentraties van *E. coli*, *Leptospira* (veroorzaakt ziekte van Weil), en de blauwalgtoxine-genen bepaald. Op drie zoutwaterrecreatielocaties werd alleen de concentratie van *E. coli* bepaald, aangezien het niet aannemelijk is dat de overige targets daar aangetroffen zouden worden.



Figuur 20. Schematisch overzicht van het plan van aanpak.

De validatie van het UDetect systeem werd uitgevoerd door:

1. De filtratie, DNA-isolatie en qPCR-methode compleet uitgevoerd in het veld en ook in het laboratorium
2. De DNA-isolatie uit het veld en het lab met elkaar te vergelijken
3. Voor *E. coli* werd er een vergelijking gemaakt met de klassieke MPN- methode

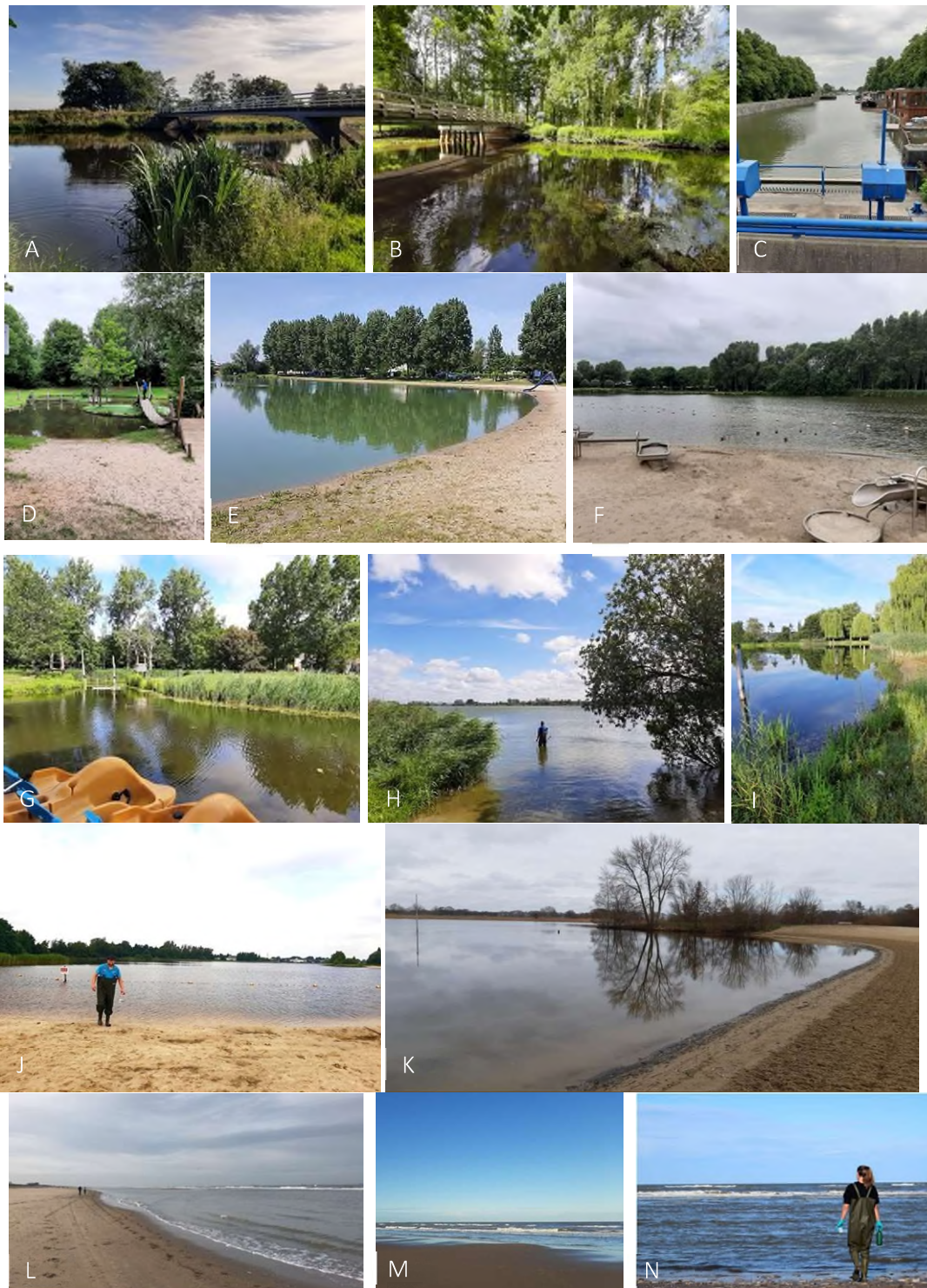
Op deze manier kon goed worden ingeschat in hoeverre de gehele methode, de afzonderlijke DNA-isolatie en daarmee ook de qPCR analyses overeenkwamen. De validatie met klassiek microbiologische analyse vond alleen plaats voor *E. coli*, omdat analyses voor *Leptospira* nog niet regulier uitgevoerd worden en daarvoor een goede vergelijking ontbreekt. Voor blauwalgtoxine-genen was alleen een vergelijking met aanwezige blauwalgen mogelijk, maar niet met toxine-producerende blauwalgen. Naast deze validatie werd een interne kwaliteitscontrole uitgevoerd door een interne standaard aan de monsters toe te voegen voordat de handelingen van UDetect werden uitgevoerd. De resultaten van de verschillende voorbehandeling en analysemethode zijn onderling vergeleken.

4.2.2 Bemonsterde locaties

In totaal zijn er 14 locaties voor dit onderzoek geselecteerd en bemonsterd. Hiervan waren er 11 zoetwaterlocaties, zowel officiële en niet-officiële recreatielocaties, en drie zoutwaterzwemlocaties. Een overzicht van de aangewezen locaties voor de monitoring staat in Tabel 9 en Figuur 21.

Tabel 9. Locaties die zijn meegenomen in dit onderzoek met de bemonsteraars.

	Waterbeheerder	Monstername	Locatie	Type water
1	De Dommel	Aquon	Fietsbrug benedenstraat, Vught	Beneden Dommel
2	De Dommel	Aquon	Soeterbeek, Willem Hikspoorbrug, Neunen	Boven Dommel
3	HDSR	Aquon	Oog in Al Kanaalweg, Utrecht	Stadsgracht
4	HDSR	Aquon	Voorveldsepolder, Utrecht	Speelvijver
5	Delfland	Aquon	Vlietpolder, Honselersdijk	Waterskiplas
6	Delfland	Aquon	Oostmadeplas, Madestein, Zuid- Westzijde strandje dag camping, Den Haag	Zwemplas
7	Rijnland	Aquon	De Speelakker, ten N. van Zeestraat, Noordwijkerhout	Waterspeeltuín
8	Rijnland	Aquon	Oosterduinse meer, Westoever, Noordwijkerhout	Zwemplas
9	Rijn en IJssel	Aqualysis	Het blauwe meer, Dinkxperlo	Zwemplas
10	Vechtstromen	Aqualysis	Kotermeerstal, Dedemsvaart	Zwemplas
11	DOD	Aqualysis	Agnietenplas, Zwolle	Zwemplas
12	RWS	Deltares	Noordwijk aan Zee Boulevard	Zee
13	RWS	Deltares	Katwijk aan Zee Boulevard Noord	Zee
14	RWS	Deltares	Katwijk aan Zee Boulevard Zuid	Zee



Figuur 21. Overzicht van de 14 verschillende locaties die zijn bemonsterd. A). Locatie 1 Fietsbrug benedenstraat in Vught. B) Locatie 2 Willem Hikspoorbrug in Neunen. C) Locatie 3 Oog in Al Kanaalweg in Utrecht. D) Locatie 4 Speelvijver Voorveldsepolder in Utrecht. E) Locatie 5 Waterskiplas Vlietpolder (bron WOS media). F) Locatie 6 Oostmadeplas in Den Haag. G) Locatie 7 Waterspeeltuin De Speelakker in Noordwijkerhout. H) Locatie 8 Oosterduinse meer in Noordwijkerhout. I) Locatie 9 Het Blauwe meer. J) Locatie 10 Kotermeerstal in Dedemsvaart. K) Locatie 11 Agnietenplas in Zwolle. L) Locatie 12 Noordwijk aan Zee. M) Locatie 13 Katwijk aan Zee Noord. N) Locatie 14 Katwijk aan Zee Zuid.

4.2.3 Monstername

Tijdens het zwemseizoen van 2020 zijn er gedurende vijf maanden monsters genomen van elke locatie (Tabel 9, Tabel 9). De bemonstering van de oppervlaktewaterlocaties is uitgevoerd door medewerkers van de waterschapslaboratoria en RWS-locaties door medewerkers van Deltares volgens de richtlijnen van het Zwemwaterprotocol [9].

Tabel 9. Data van de monitoringsronde van de verschillende locaties.

11 zoetwater locaties		
Monitoringsronde	Weeknummer	Datum
1	27	29/30-06-20, 02-07-20
2	31	27/28/30-07-20
3	35	24/25/27-08-20
4	39	21/22/24-09-20
5	41	19/20/22-10-20

3 zoutwater locaties		
Monitoringsronde	Weeknummer	Datum
1	37	07-09-20
2	38	14-09-20
3	40	29-09-20
4	42	13-10-20
5	44	26-10-20

Bij elke monitoringsrondes van de 14 verschillende locaties zijn de volgende monsters genomen:

- 1000 ml watermonster voor de bepaling van desbetreffende bacteriën in het veld met UDetect mobiele qPCR
- 1000 ml watermonster voor de bepaling van desbetreffende bacteriën volgens de lab protocollen in het laboratorium van Deltares.
- 250 ml watermonsters voor *E. coli* bepaling volgens MPN-methode door het waterschapslaboratorium.

4.2.4 Filtratie & DNA-isolatie

In het onderzoek zijn er twee verschillende filtratie en DNA-isolatie methodes gebruikt; één in het veld en één andere methode in het lab (Figuur 20). Beide methode zijn in hoofdstuk 2 in meer detail beschreven.

De filtratie en DNA-isolatie in het veld is uitgevoerd volgens het protocol van UDetect (Experienced user protocol staat in Bijlage I). De hoeveelheid gefilterd water dat per monster is verwerkt tijdens de DNA-isolatie is weergegeven in Tabel 10. Het verkregen DNA werd in het veld maximaal 8 uur bewaard bij 4°C, waarna het is ingevroren bij -80°C tot qPCR-analyse.

Voor de lab methode werd het water bij Deltares gefiltreerd en het DNA geëxtraheerd zoals aangegeven in hoofdstuk 2 en bewaard bij -20°C tot verdere analyse.

Tabel 10. Gefilterde watervolumes per locatie en per monitoringsronde. Deze volumes zijn in de meeste gevallen hetzelfde voor veld en lab filtratie. Indien dit niet het geval is, staan beide volumes in de kolom waarbij de lab filtratie het tweede getal is, aangegeven met *.

Volume (ml)					
Locatie	Ronde 1	Ronde 2	Ronde 3	Ronde 4	Ronde 5
1	280	260	150	150	190 / 150*
2	145	250	140	155	135
3	300	265	125	140	165
4	300 / 280*	260	140 / 146*	160	140
5	60	70	75	60	100 / 50*
6	75	90	130	100	145
7	145	170	150	165	140
8	375 / 333*	215	130	140	150
9	160	170	105	125	75
10	175	125	125	125	220 / 200*
11	220	120	125	115	160
12	130	150	170	155	170
13	160	155	155	165	150
14	140	140	160	150	130

4.2.5 Kwaliteitscontrole van DNA

De efficiëntie van de DNA-isolatiemethode in het veld en in het lab werd met elkaar vergeleken door de totale hoeveelheid bacteriën (16S rRNA genen) in de monsters te bepalen met qPCR. DNA geïsoleerd in het veld werd in duplo ingezet en het DNA geïsoleerd in het lab werd onverdund als 10x verdund meegenomen. De primers waren specifiek voor het 16S rRNA gen, 519F (5'-GCCAGCAGCCGCGTAAT-3') (Lane, 1991) en 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3') [10]. Deze qPCR werd uitgevoerd in een totaal volume van 25 µL bestaande uit 3 µL DNA, 1,5 µL forward primer (10 pmol/µL), 1,5 µL reverse primer (10 pmol/µL), 12,5 µL IQ SyBR Green Supermix (Bio-Rad), en 6,5 µL steriel MilliQ water met behulp van het volgende thermische programma: 3 min op 94°C, 30 sec op 94°C, 30 sec op 58°C, en 30 sec op 72°C (deze laatste drie stappen werden voor 35 cycli herhaald), 5 min 72°C, 1 min 95°C, 1 min 58°C, 10 sec 58°C, en uiteindelijk 5 min op 12°C. Aan elke run werd een standaardcurve toegevoegd met een 10-voudige seriële verdunning in duplo ($1,92 \times 10^7 - 1,92 \times 10^1$ genkopiën/µL). Voor deze standaard curve werd het specifiek stuk 16S rRNA gen gekloneerd in een PCR 2 TOPOvector (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), volgens standaard protocol van de leverancier. Tevens werd aan elke run een negatieve controle toegevoegd in duplo door het DNA te vervangen door steriel MilliQ water. Na beoordeling van de resultaten was besloten om voor verdere analyse van het DNA geïsoleerd in het lab het 10x verdunde DNA te gebruiken om remming door uit het monster afkomstige stoffen (zoals humuszuren) tot het minimum te beperken.

Aan de hand van een statistische test (t-test, tweezijdig verdeling met ongelijke variatie) is er gecontroleerd of er een verschil is in de totale hoeveelheid bacteriën geïsoleerd in het veld en in het lab. Dit is per monitoringsronde uitgevoerd. Een p-waarde >0,05 geeft aan dat er geen significant verschil is tussen de methodes. De resultaten van de zoutwater monsters zijn niet meegenomen in deze analyse, omdat deze later zijn genomen toen optimalisatie van het protocol al had plaatsgevonden.

4.2.6 qPCR-analyse

Er zijn drie verschillende qPCR-analyses uitgevoerd (Figuur 20):

1. qPCR op UDetect in het veld met DNA geïsoleerd in het veld
2. qPCR op het lab met DNA geïsoleerd in het veld
3. qPCR op het lab met DNA geïsoleerd in het lab

Naast de algemene beschrijving van deze methodes in hoofdstuk, wordt in deze paragraaf ingegaan op de bijzonderheden in de toepassing op de monsters van de geselecteerde zwemwateren beschreven in dit hoofdstuk. De 11 oppervlaktewater locaties werden gescreend op *E. coli* (ybbW gen), *Leptospira* (lipL gen), en blauwalgtoxine genen (mcyE/ndaF genen samen in 1 assay). Bij de 3 RWS-locaties werd alleen naar *E. coli* gekeken.

4.2.6.1 Veld qPCR-methode

De qPCR-analyses zijn in het veld uitgevoerd met UDetect na het isoleren van het DNA van alle locaties van de desbetreffende dag. Het was mogelijk om de qPCR voor de verschillende micro-organismes tegelijkertijd uit te voeren, omdat Orvion de primers en probes zo heeft ontwikkeld dat ze op hetzelfde PCR-programma kunnen draaien.

Voor elke locatie werd ook interne controle meegenomen in de qPCR om de kwaliteit van de DNA-extractie te kunnen controleren en te beoordelen of er inhibitie plaatsvond bij de qPCR. Wanneer de interne controle boven een bepaalde CT-waarde kwam, werd het resultaat als onbetrouwbaar gemarkeerd en niet meegenomen in verdere analyse. Daarnaast werd er voor elke monitoringsronde ook een negatieve controle meegenomen. Na het inzetten van de qPCR draaide UDetect actief in de auto of op het lab (afhankelijk van de afstand tussen bemonsteringslocatie en lab of weersomstandigheden). Standaard curves waren eerder gemaakt op dezelfde machine, die gebruikt werden voor kwantificatie.

4.2.6.2 Lab qPCR op DNA uit de veld isolatie

In het lab is de qPCR uitgevoerd op de DNA-extracties geïsoleerd in het veld als in het lab. Alle reacties werden uitgevoerd op een C1000 Touch thermocycler uitgerust met een CFX96 Touch™ Real-Time PCR-detectiesysteem.

De DNA-extracties uitgevoerd in het veld werden gekwantificeerd met de lab qPCR-methode voor *E. coli*, *Leptospira*, blauwalgtoxinegenen, en interne controle (voor RWS-locaties werd alleen *E. coli* en interne controle bepaald). Hiervoor zijn dezelfde primers en probes gebruikt als in het veld, welke gevriesdroogd werden aangeleverd door Orvion. Per reactie werd 20 µL DNA toegevoegd (buisje D), geresuspendeerd, en overgebracht naar de 96 wells plaat voor analyse in de Biorad CFX. Ook werd er negatieve controle meegenomen in duplo. De reacties werden in enkelvoud uitgevoerd met het volgende thermische programma; 120 sec 95°C, 10 sec 95°C, en 30 sec 65°C (deze laatste twee stappen werden 45 cycli herhaald) gebruikmakend van het FAM-detectie kanaal. Aan elke run werd een standaardcurve toegevoegd met een 10-voudige verdunningsreeks in duplo (*E. coli*: $5,4 \times 10^6$ – $5,4 \times 10^0$ genkopieën/µL, *Leptospira*: $4,3 \times 10^6$ – $4,3 \times 10^0$ genkopieën/µL, Blauwalg toxinegenen: $3,5 \times 10^6$ – $3,5 \times 10^0$ genkopieën/µL) en een negatieve controle (in duplo).

4.2.6.3 Lab qPCR-methode

In het lab werd de concentratie van *E. coli*, *Leptospira*, en blauwalgtoxinegenen bepaald voor de verschillende locaties waarbij het DNA geïsoleerd was in het lab (voor RWS-locaties werd alleen *E. coli* bepaald). Dezelfde gen targets werden gebruikt als in het veld (zie hoofdstuk 4.2.6.1) waarvoor de reagentia gevriesdroogd werd aangeleverd door Orvion. Per reactie werd er 17 µL steriel MilliQ en 3 µL 10x verdund DNA toegevoegd,

geresuspendeerd, en overgezet in een 96 wells plaat. De reacties werden in enkelvoud uitgevoerd met een negatieve controle en hetzelfde thermische programma en standaardcurves als besproken hoofdstuk 4.2.6.2.

4.2.7 Kwantificering

De qPCR resultaten verkregen met de UDetect zijn geanalyseerd en uitgewerkt door Orvion met behulp van MyGo Mini PCR software V3.5. Hierbij is gebruik gemaakt van al eerder gemaakte standaardcurves. Alle qPCR-gegevens verkregen in het lab werden geanalyseerd met behulp van de Bio-Rad CFX Manager V3.0 aan de hand van de standaardcurves die bij elke ronde werden meegenomen.

Vervolgens werd het aantal genkopiën/mL in het watermonster berekend door de hoeveelheid watermonster, compleet membraanfilter, volume van DNA, en verdunning van DNA mee te nemen. Voor het kwantificeren is uitgegaan van één kopie van het specifieke gen per organisme.

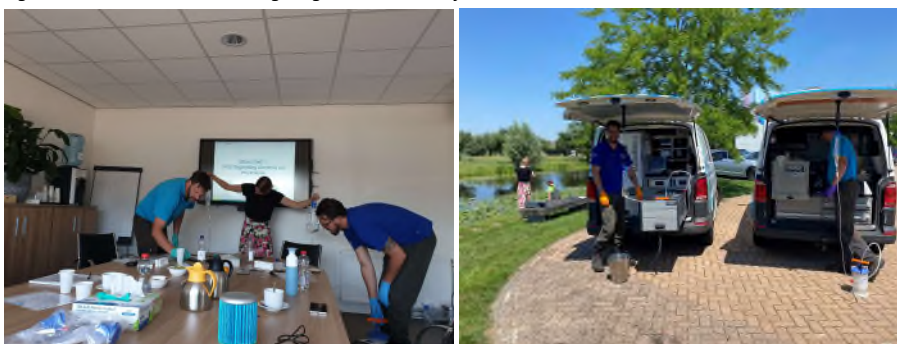
4.2.8 MPN-analyse

De MPN-analyse is uitgevoerd door het desbetreffende lab van de bemonsterraar volgens de richtlijnen van het Zwemwaterprotocol [9]. Dit betekent dat locatie 1 t/m 8 door Aquon en 9 t/m 11 door Aqualysis zijn geanalyseerd. Voor de RSW-locaties 12 t/m 14 is de MPN-analyse uitgevoerd door Aquon, de watermonsters waren verzameld in steriele flessen (250 ml) van Aquon.

4.2.9 Training UDetect

Om goede metingen te verrichten met UDetect in het veld is het van belang kennis en enige ervaring te hebben met het systeem, daarom werd er ééndaagse trainingsdag georganiseerd. Al is het protocol geoptimaliseerd om uitgevoerd te worden door niet- lab-specialisten, is het goed om kennis en ervaring op te doen met de verschillende stappen en de benodigde pipetten, epjes, en reagentia. Orvion gaf voorafgaand aan de monitoringsrondes een eendaagse training (op 25-06-2020) in het gebruik van UDetect voor de uitvoer van qPCR-metingen in het veld aan alle bemonsteraars die watermonsters namen voor dit onderzoek (Aquon, Aqualysis, Deltares, Figuur 22). Het protocol, de nodige software, en beoordeling van resultaten werden uitgebreid toegelicht. Daarna werd het protocol en beoordeling van de resultaten uitgevoerd onder begeleiding, om vervolgens zelfstandig in het veld (met gebruik van de veldbussen van de bemonsteraars) de analyse uit te voeren.

Figuur 22. Foto's van de trainingsdag van UDetect bij Orvion.

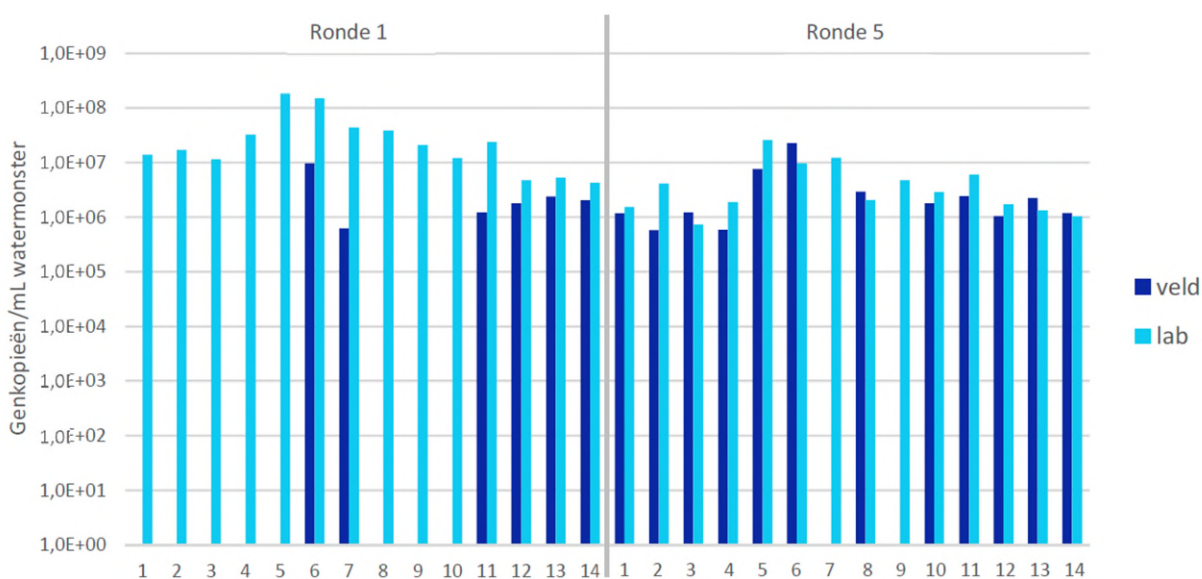


4.3 Resultaten

De focus van dit onderzoek ligt op het valideren van de mobiele qPCR methode UDetect in diverse oppervlaktewateren en zoutwater voor snelle en betrouwbare detectie van verschillende microbiologische targets simultaan. Er wordt in dit hoofdstuk dan ook geen verdere evaluatie gedaan van de kwantitatieve resultaten per monitoringslocatie.

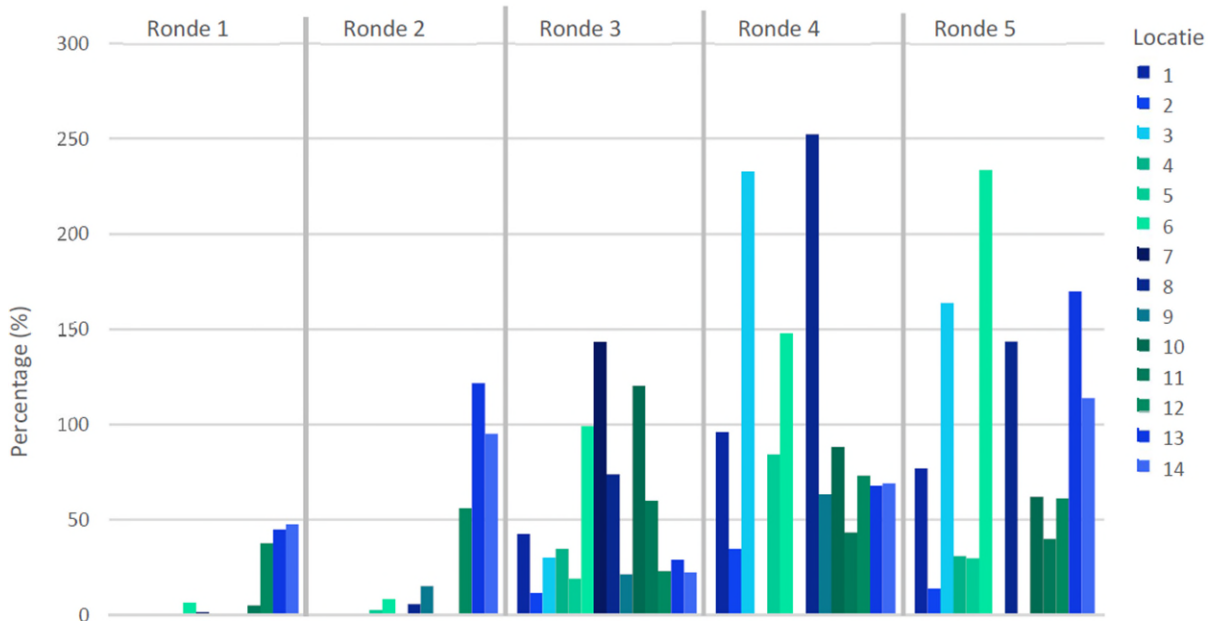
4.3.1 Kwaliteit van DNA-isolatie

In het onderzoek zijn er twee verschillende DNA-isolatie methodes gebruikt; een in het veld en een andere methode in het lab. De efficiënte van de verschillende methode is vergeleken door de totale hoeveelheid bacteriën (16S rRNA genen) in de monsters te bepalen met qPCR. De resultaten voor ronde 1 en ronde 5 staan weergegeven in Figuur 23, in Bijlage II zijn alle gegevens weergegeven in een tabel. De aantallen bacteriën zijn in de laatste ronde voor beide methode ongeveer hetzelfde, wat aangeeft dat er met UDetect gedegen DNA-isolatie plaatsvindt.



Figuur 23. Totaal aantal bacteriële 16S rRNA genkopieën per mL water waarbij het DNA geïsoleerd is met de veld of lab methode voor ronde 1 en ronde 5. Monsters waarbij de interne controle is afgekeurd zijn niet meegenomen in de analyse. Detectielimiet was 19 genkopieën/mL.

Wanneer er gekeken wordt naar het verschil tussen de totale hoeveelheid bacteriën verkregen met veld- en de lab-isolatie per locatie is te zien dat er meer bacteriën door de bemonsteraars in het veld worden geïsoleerd met een toename van de ervaring met UDetect en een lager filtratievolume (Figuur 24). Aanpassing van het monstervolume naar maximaal 150 mL en ervaring met het werken met UDetect zorgen voor een verbetering in het verkrijgen van DNA. In ronde 1 en ronde 2 is er dan ook een statistisch verschil (t-test, $p < 0,05$) tussen de veld- en lab-DNA-isolatiemethode, terwijl in ronde 3, 4 en 5 dit verschil niet meer aanwezig is (t-test, $p > 0,05$). Opvallend is het kleinere verschil tussen veld- en lab-extractie van locatie 12, 13, en 14. De DNA-isolatie van deze monsters is uitgevoerd door een ervaren laboratorium onderzoeker met ervaring in DNA-isolatie. Bovendien zijn de eerste twee monsterrondes van deze drie locaties pas later gestart. Hierdoor is op deze drie locaties de bemonstering en isolatie pas uitgevoerd nadat de optimalisatie van de methode bij de overige 11 locaties heeft plaatsgevonden na 2 monsterrondes.



Figuur 24. Ratio totale bacteriële genkopieën per mL watermonster veld ten opzichte van lab DNA- isolatie in procenten voor de verschillende locaties en monitoringsrondes. Monsters waarbij de interne controle is afgekeurd zijn niet meegenomen in de analyse.

Aan de hand van de interne controle werd de kwaliteit van DNA-isolatie in het veld gecontroleerd (zowel met qPCR in het veld als in het lab) en bepaald of er inhibitie van de qPCR optrad, wat resulteerde in de afkeuring van een aantal monsters waarvoor de resultaten niet betrouwbaar worden geacht (Tabel 11). Het gaat voornamelijk over de DNA-isolatie in de monitoringsronde 1 en 2. Dit bevestigt de eerdere observaties, dat ervaring en kleiner volume leiden tot betere kwaliteit DNA. Voor de resultaten zijn de monsters waarbij de interne controle is afgekeurd niet meegenomen in de analyses.

Tabel 11. Aantal monsters dat aan de hand van de UDetect interne controle afgekeurd werd.

	Veld	Lab
Aantal monsters	70	70
Totaal aantal interne controle 'FAIL'	12	19
Aantal interne controle 'FAIL' in ronde 1 & 2	12	15
Percentage met slechte interne controle (zonder ronde 1 & 2)	0	10

4.3.2 E. coli

De aantallen *E. coli* (target *ybbW*-gen) zijn gemeten op alle 14 locaties met zowel de UDetect, als in het lab, als de MPN-methode (Tabel 14). Met de MPN-methode worden op de meeste locaties *E. coli* aangetroffen, gevolgd door lab qPCR, UDetect, en de lab qPCR uitgevoerd op DNA geïsoleerd in het veld. Met UDetect wordt *E. coli* gedetecteerd op locaties met overschrijdende MPN-waarden >1800 cellen/100mL, maar het detecteert ook *E. coli* in een aantal monsters met lagere MPN-concentratie (Tabel 12).

Tabel 12. Aantal keren dat de mobiele qPCR in het veld een positieve waarde detecteert (+) in vergelijking met de MPN-resultaten, op basis van ronde 3, 4 en 5.

Mobiele qPCR	MPN		
	>1800 MPN/100 mL	1000-1800 MPN/100 mL	< 1000 MPN/100 mL
+	3	1	5
-	0	0	32

De resultaten van de MPN-methode zijn vrijwel in alle gevallen lager dan de resultaten van de qPCR methodes. Verder gaf de UDetect lagere *E. coli* concentraties dan de qPCR methode uitgevoerd in het lab. Desondanks detecteert UDetect in de meeste gevallen in dezelfde monsters *E. coli* als met de lab methode.

4.3.3 *Leptospira*

Aanwezigheid van *Leptospira* (target lipL-gen) werd onderzocht in de 11 zoetwater locaties en werd alleen gedetecteerd met de volledig in het lab uitgevoerde analyse op 1 locatie, de waterspeeltuin in Noordwijkerhout met 46 genkopiën/mL water (Tabel 13). Op alle andere locaties was deze bacterie onder de detectiegrens van de gebruikte methodes.

Tabel 13. Aantal gedetecteerde *Leptospira* genkopiën per ml water verkregen door qPCR. Resultaten zijn weergegeven per ronde (zie Tabel 10 voor locatie beschrijving) waarin VV: de DNA-isolatie en qPCR in het veld, VL: de DNA-isolatie in het veld en qPCR in het lab, en LL: de DNA-isolatie en qPCR in het lab aanduidt. <<: de concentratie is onder het detectielimiet van 1 tot 4 genkopiën/mL voor UDetect (afhankelijk van gefilterde volume) UDetect en 1 genkopie/mL voor lab qPCR. Legen cellen werden afgekeurd op basis van de UIC-analyse voor verder analyse.

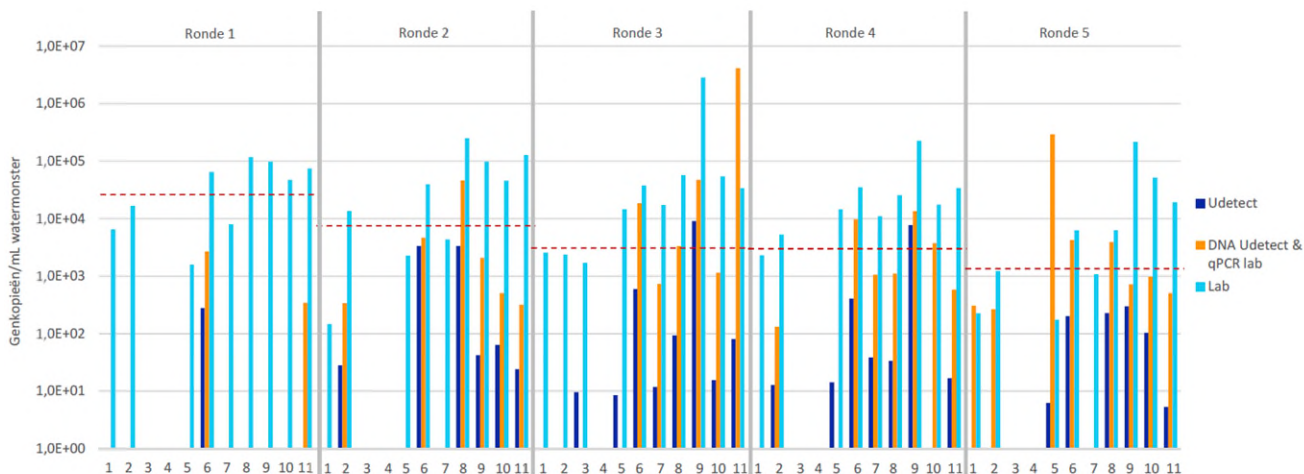
Locatie	Ronde 1			Ronde 2			Ronde 3			Ronde 4			Ronde 5		
	VV	VL	LL	VV	VL	LL	VV	VL	LL	VV	VL	LL	VV	VL	LL
1			<<			<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
2			<<			<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
3			<<			<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
4	<<		<<	<<		<<	<<	<<	<<		<<	<<	<<	<<	<<
5			<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
6	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
7	<<	<<	46			<<	<<	<<	<<	<<		<<	<<		<<
8			<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
9			<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<		<<
10			<<	<<		<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<
11		<<	<<	<<		<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<	<<

4.3.4 Toxische blauwalgen

Aanwezigheid van toxine genen van blauwalgen (target mcyE/ndaF-gen) werd onderzocht in de 11 zoetwater locaties en werd vrijwel overal gevonden (Figuur 25). Alleen de blauwalgen die deze toxines produceren vormen een risico voor zwemmers. De trend in aantal gedetecteerde toxine genen is hetzelfde voor de drie verschillende methodes. De genen werden het vaakst gevonden wanneer zowel de DNA-isolatie als de qPCR in het lab werd uitgevoerd. UDetect kan blauwalg toxine detecteren wanneer ze boven een speciale drempelwaarde komen. Bij ronde 1 ligt deze bij 5×10^4 gen kopieën/mL, vanaf ronde 2 ligt dit rond de 9×10^3 gen kopieën/mL en daalt door tot 2×10^3 gen kopieën/mL in ronde 5.

Tabel 14. Aantal gedetecteerde E. coli genkopiën per 100 ml water verkregen door qPCR en MPN. Resultaten zijn weergegeven per ronde (zie tabel 1 voor locatie (Loc) beschrijving) waarin VV: de DNA-isolatie en qPCR in het veld, VL: de DNA-isolatie in het veld en qPCR in het lab, LL: de DNA-isolatie en qPCR in het lab aanduidt, en MPN de hoeveelheid levende cellen gedetecteerd met de MPN-methode aangeeft. <<: de concentratie is onder de detectielimiet van 100 tot 400 genkopiën/ 100 mL voor UDetect (afhankelijk van gefilterde volume) en 22 genkopiën/100 mL voor lab qPCR. Legen cellen werden afgekeurd op basis van de UIC-analyse voor verder analyse. Rood gearceerde cellen hebben een MPN >1800 cellen/100 mL. Oranje gearceerde cellen hebben een MPN >1000 cellen/100mL. * conserveringstijd is overschreden waardoor gevonden waarde hoger kan zijn.

Locatie		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ronde 1	VV				<<		<<	<<				<<		<200	<200
	VL						<<	<<				<<	<<	<<	<<
	LL	<<	1,20E+04	<<	1,70E+03	<<	1,70E+04	2,10E+03	<<	1,20E+04	2,80E+03	<<	1,10E+03	<<	<<
	MPN	1,80E+03	6,20E+03	<15	1,40E+02	6,10E+01	4,00E+02	3,90E+02	<15	2,00E+03	1,30E+02	3,00E+01	9,40E+01	<15	<15
Ronde 2	VV				9,60E+01	<400	<300		<100	1,50E+02	<200	<200	<200	<200	1,90E+02
	VL					<<	<<		<<	<<			<<	<<	<<
	LL	2,80E+03	5,70E+04	<<	1,20E+03	7,50E+02	5,50E+03	7,10E+03	3,90E+03	<<	<<	<<	<<	<<	<<
	MPN	<40	9,80E+03	<40	7,70E+01	3,30E+02	4,40E+02	3,40E+02	3,00E+01	7,70E+01	6,10E+01	3,00E+01	1,50E+01	<15	<15
Ronde 3	VV	<200	3,10E+02	<200	<200	3,30E+02	2,90E+02	4,80E+02	4,10E+02	<200	<200	<200	<200	<200	<200
	VL	<<	3,80E+03	<<	<<	<<	1,00E+03	1,10E+03	1,40E+03	<<	<<	<<	<<	<<	<<
	LL	1,70E+03	1,50E+05	2,20E+03	<<	<<	4,60E+03	1,60E+04	2,40E+01	1,70E+03	5,10E+03	2,70E+03	<<	<<	<<
	MPN	7,70E+01	1,50E+04	4,00E+01	9,40E+01	2,50E+02	6,10E+02	1,20E+03	1,30E+02	1,30E+02	4,60E+01	5,60E+02	1,50E+01	3,00E+01	1,50E+01
Ronde 4	VV	<200	9,30E+02	<200	<200	<400	5,30E+02	<200	<200	<200	<200	<200	<<	<<	<<
	VL	<<	3,40E+03	<<		<<	<<		<<	<<	<<	<<	<<	8,30E+02	<<
	LL	<<	1,50E+05	<<	<<	<<	<<	3,00E+03	<<	2,90E+03	1,70E+03	1,20E+04	<<	3,70E+02	3,60E+02
	MPN	4,50E+01	1,40E+04	<40	6,10E+01	1,50E+01	1,60E+02	3,00E+02	4,50E+01	<15	4,60E+01	8,70E+02	3,0E+01*	1,5E+01*	1,5E+01*
Ronde 5	VV	<200	1,90E+02	<200	<200	<500	1,80E+02	<200	<200	<300	<100	<200	<<	<<	<<
	VL	<<	<<	7,50E+02	<<	<<	9,70E+02		<<		<<	3,80E+03	<<	1,90E+03	<<
	LL	5,20E+03	6,60E+04	<<	<<	6,30E+03	5,30E+03	5,70E+03	<<	<<	<<	3,80E+03	1,10E+03	1,10E+03	<<
	MPN	1,20E+02	7,20E+03	<40	4,60E+01	2,30E+02	3,30E+02	1,10E+03	<15	1,50E+01	4,60E+01	7,70E+01	5,8E+02*	3,10E+02	3,00E+01



Figuur 25. Totaal aantal genkopiën van cyanotoxine per mL water voor alle locaties per ronde waarbij zowel de DNA en qPCR gedaan zijn in het veld (UDetect), DNA geïsoleerd is in het veld en qPCR uitgevoerd is in het lab (DNA UDetect & qPCR lab) en zowel de DNA en qPCR uitgevoerd zijn in het lab (Lab). De rode stippellijn geeft de threshold weer vanaf welke aantallen toxines de data met alle drie methodes wordt gedetecteerd. De detectielimiet was 1 tot 4 genkopiën/ mL voor UDetect (afhankelijk van gefilterde volume) en 3,5 genkopie/mL voor lab qPCR. Rode stippellijn geeft de drempelwaarde aanwezige genkopiën/mL aan wanneer de aanwezigheid wordt opgepikt door de UDetect mobiele qPCR.

4.4 Discussie en Conclusie

Zwemlocaties zouden gebaat zijn bij een snellere microbiële waterkwaliteit monitoringmethode om direct in te kunnen grijpen bij aanwezigheid van ziekteverwekkende micro-organismen die een risico vormen voor zwemmers, of om genomen maatregelen sneller te kunnen opheffen. In dit project is aangetoond dat de UDetect mobiele qPCR gebruikt kan worden om simultaan de aanwezigheid van *E. coli*, *Leptospira*, en blauwalgtoxinegenen te bepalen in diverse oppervlaktewateren en zoutwaterlocaties. Deze methode detecteert op locatie te hoge concentratie van *E. coli* (>1800 cellen/100 mL volgens MPN) en kan toxische blauwalgen detecteren vanaf een aanwezigheid van 2×10^3 genkopiën/mL.

4.4.1 Kwaliteit DNA-extractie in het veld

Met het UDetect systeem is het mogelijk om een gedegen en goede DNA-isolatie in het veld uit te voeren. Dit is de verbetering die nodig was en wat ook voortkwam uit voortgaand onderzoek. Op basis van aantallen 16S rRNA genen (indicator voor totaal aantal bacteriën) kon een vergelijking worden gemaakt tussen de DNA-isolatie met de veld- en lab-methode. De kwaliteit van DNA-isolatie in het veld was na een tussentijdse aanpassing van het protocol en toenemende ervaring met het protocol verbeterd. Vanaf ronde 3 was er geen significant verschil meer aanwezig tussen de verkregen totale bacteriën in het veld en in het lab. Het was aannemelijk dat een DNA-isolatie in het lab betere resultaten opleverde, aangezien er in een steriele omgeving gewerkt werd en de weersomstandigheden (temperatuur, luchtvochtigheid, UV-intensiteit) stabiel zijn terwijl deze in het veld variabel zijn.

Verder werden de stappen in het veld protocol sneller en korter na elkaar uitgevoerd wat effect kan hebben op de zuiverheid van het DNA. Desalniettemin, werden er na twee rondes dezelfde aantallen bacteriën (totale bacteriën) gevonden voor DNA geïsoleerd in het veld als in het lab.

De bemonsteraars die het DNA isoleerde, niet-lab-specialisten, werden meer ervaren met het protocol en gebruik van de reagentia en pipetten, wat ook leidde tot betere DNA-isolatie in het veld. Dit was ook te zien aan de interne controles, waarbij voornamelijk DNA-isolaties uit de eerste twee rondes werden afgekeurd. Dit

resulteerde, samen met een kleiner volume te filteren watermonster, in betere DNA- kwaliteit na de eerste twee monitoringsrondes. De kwaliteit van DNA-isolatie in het veld, zoals in deze studie uitgevoerd, geeft een goed perspectief voor verder toepassing van de UDetect methode in het veld door niet-specialisten.

4.4.2 Mobiele qPCR voor risicoanalyse zwemwater

Met de UDetect mobiele qPCR is het mogelijk om *E. coli*, *Leptospira*, en toxische blauwalggenen tegelijkertijd aan te tonen in hetzelfde DNA-monster en in een qPCR run. Dit is een verbetering met eerder gebruikte technieken in het veld, waarbij maar drie monster op slechts 1 parameter doorgemeten konden worden. Dit biedt de mogelijkheid om zowel aan elkaar ondersteunende parameters, zoals *E. coli*, en blauwalgen simultaan te analyseren, of juist een set van verschillende indicatoren of ziekteverwekkers zoals in de huidige studie is gedaan.

E. coli

E. coli concentraties zijn gemeten met zowel MPN-methode als de verschillende qPCR-methodes. Het is belangrijk om te realiseren dat MPN en qPCR twee verschillende methodes zijn en dat de aantallen dan ook niet direct met elkaar kunnen worden vergeleken. De MPN-methode geeft een afspiegeling van het aantal levensvatbare *E. coli* bacteriën en gebruikt kweek methoden, terwijl de qPCR-methode DNA gebruikt voor detectie en zo ook alle niet-levensvatbare *E. coli* tijdens de analyse meeneemt. Bij de qPCR-methode worden specifieke primers gebruikt om alleen *E. coli* DNA te detecteren, dit zal mogelijk ook andere soorten meenemen dan gekweekt kunnen worden (inclusiviteit en exclusiviteit van verschillende *E. coli* soorten en gerelateerde soorten wordt getest in deelproject 3). De resultaten van de MPN-methode zijn vrijwel in alle gevallen lager dan de resultaten van de qPCR methodes.

E. coli is in de meeste locaties gevonden met de MPN-methode, gevolgd door de qPCR methode volledig uitgevoerd in het lab, UDetect in het veld, en als laatste qPCR in het lab uitgevoerd met UDetect DNA. In de meeste gevallen werd *E. coli* gedetecteerd met qPCR bij MPN-waarden hoger dan 80 MPN/100 mL. De resultaten van de MPN-methode zijn vrijwel in alle gevallen lager dan de resultaten van de qPCR methodes. Dit was verwacht, aangezien de MPN-methode een afspiegeling geeft van het aantal levensvatbare *E. coli* bacteriën, terwijl de qPCR-methodes ook alle niet-levensvatbare *E. coli* tijdens de analyse meenemen.

Van de qPCR methodes werd *E. coli* het vaakst gedetecteerd met de lab qPCR-methode. Voor de uitvoering van de qPCRs is verschillend DNA gebruikt, geïsoleerd uit het veld en geïsoleerd in het lab, maar de kwaliteit van dit DNA was hetzelfde (zie paragraaf 4.3.1). Het verschil in aanwezigheid komt mogelijk doordat het veld DNA 7,5x meer verdund is dan de DNA-extractie uit het lab. Hierdoor worden lagere aantallen van *E. coli* wel opgepikt door de qPCR uitgevoerd met DNA geïsoleerd in het lab.

Verder kan het verschil tussen de qPCR methodes ook veroorzaakt zijn door verschil in kalibratie van aantallen in het lab en door UDetect en/of, het over-pipeteren van primers en probes uit een klein epje naar de 96 well plaat.

De UDetect mobiele qPCR detecteert *E. coli* bij overschrijding van de norm (>1800 MPN/100 mL volgens MPN-methode). Dit is goed te zien bij de resultaten van locatie 2, waar gedurende het gehele onderzoek de hoogste concentratie *E. coli* zijn aangetroffen en UDetect ook een signaal geeft. Maar UDetect detecteert ook *E. coli* in een aantal monsters die volgens de MPN lage concentratie hebben (<1000 MPN/100 mL, zie Tabel 14). Bij de meeste locaties is de concentratie *E. coli* echter onder de detectielimiet van UDetect. Verdere validatie en praktijkervaring is nodig detectiegrenzen te kunnen vaststellen.

Leptospira

Leptospira is gedurende het onderzoek alleen op één1 locatie gedetecteerd met de volledige lab methode en niet met UDetect. Het is onbekend of *Leptospira* op de andere bemonsterde locaties volledig afwezig was, of onder de detectiegrens van de gebruikte methode zat. Hierdoor Omdat in deze studie slechts in 1 monster *Leptospira* zijn

aangetroffen, is het moeilijk conclusies te trekken over de betrouwbaarheid van *Leptospira* detectie met UDetect. Meer validatie met monsters waar bekende concentratie *Leptospira* in voorkomen is nodig voordat de methode daadwerkelijk in praktijk kan worden toegepast. Hiervoor zijn verschillende vervolgstudies mogelijk; primers kunnen getest worden op pure *Leptospira* culturen, spike testen kunnen worden uitgevoerd met verschillende bekende verdunningen van *Leptospira* in water, of bemonstering van locaties waarvan bekend is dat *Leptospira* aanwezig is.

Blauwalg toxine genen

De twee specifieke toxine genen *mcyE* en *ndaF* van blauwalgen werden op de meeste locaties, behalve nummer 3 en 4, gevonden met alle gebruikte methodes. De lab methode detecteerde de hoogste concentraties toxische blauwalggenen in het water, terwijl UDetect uitgevoerd in het veld de laagste concentraties gaf. Desalniettemin is de trend in aantal gedetecteerde toxinegenen hetzelfde voor de drie verschillende methodes. Deze genen lijken alleen gedetecteerd te worden door UDetect wanneer er meer dan 2×10^3 genkopiën/mL aanwezig zijn in het water (voor ronde 5), in dat geval heeft zowel UDetect als de lab methode een resultaat. Er is dus een drempelwaarde van vanaf wanneer UDetect toxische blauwalggenen detecteert, zodra de concentratie hierboven is geeft UDetect ook een signaal. Deze drempelwaarde is afhankelijk van de ervaring van de bemonsteraars en zo ook verbetering in DNA-isolatie. Met meer ervaring neemt de drempelwaarde af, in dit onderzoek tot 2×10^3 in ronde 5.

De aanwezigheid van toxische blauwalggenen gedetecteerd met de qPCR methodes komt overeen met de blauwalg detectie van de bemonsteraars volgens de richtlijnen van Zwemwaterprotocol. Op de locatie met structurele blauwalg problematiek, locatie 8, 10, 11 en 12, werd door alle qPCR methodes blauwalgtoxine-genen aangetoond. Op locatie 5 en 6 zijn regelmatig blauwalgen aanwezig, voor locatie 6 waren de concentraties hoger en de target genen werden dan ook door alle methodes opgepikt. Deze methode toont hiermee ook aan dat de op de plekken met blauwalg problematiek, ook toxische blauwalgen aanwezig zijn.

4.4.3 Praktijklessen en verbeterpunten van UDetect

UDetect is met succes gebruikt door niet-specialisten om DNA-isolatie en qPCR- analyses op alle locaties, zowel zoet- als zoutwater, in het veld uit te voeren. De bemonsteraars vonden de handelingen niet te moeilijk en waren in staat de DNA- isolatie en qPCR-analyse goed uit te voeren. Het UDetect systeem had een groot gebruiksgemak om op locatie analyses uit te voeren.

Tijdens de verschillende monitoringsronde werd kennis en feedback uitgewisseld over de werking en praktische hantering met de bemonsteraars van Aquon, Aqualysis en Deltares, en Orvion. Sommige punten konden tijdens het project al worden doorgevoerd. Zo is er een 'experienced user' protocol gemaakt met kortere instructies waardoor de stappen gemakkelijk te volgen zijn (Bijlage I), vond de DNA-isolatie niet plaats na elke monsternamen maar na bemonstering van twee locaties (de filtratie vindt wel op locatie plaats), zijn er twee katoenen pluggen geleverd in plaats van één om contaminatie bij gebruik te verkleinen, is er een stevigere houder gemaakt voor de qPCR-machine zodat de kans van vallen kleiner is wanneer de analyse rijdend plaatsvindt, en is de detectiegrens voor *E. coli* verlaagd. Daarnaast heeft het gebruik in het veld ook een aantal productiefouten aan het licht gebracht, welke zijn verholpen.

Om het in de toekomst mogelijk te maken dat gebruikers van UDetect zelf de qPCR-data verwerken, heeft Deltares een betaversie getest van de software tool die dit mogelijk maakt wat ontwikkeld is door Orvion. Met deze tool kon de interne controle (PASS/FAIL) en aantal genkopieën per mL worden berekend vanuit de qPCR-resultaten (cq-waarde). De feedback was positief en verdere ontwikkeling is gaande.

4.4.4 Algemene conclusies

Tijdens dit project zijn er maandelijks simultaan kwantitatieve analyses uitgevoerd van *E. coli*, *Leptospira*, en blauwalg toxine genen in verschillende oppervlaktewateren met behulp van het mobiele qPCR systeem UDetect met positief resultaat. Het systeem is gemakkelijk te gebruiken in het veld door niet-specialisten en na training en enige ervaring met de methode werden de analyses goed uitgevoerd. Deze methode is nu verder geoptimaliseerd met de nieuw opgedane praktijkervaring.

De kwaliteit van de DNA-isolatie met UDetect blijkt na enige ervaring vrijwel vergelijkbaar met de DNA-isolatie in het lab. Daarmee is een belangrijk doel bereikt, en opent de weg naar DNA-analyses op locatie in het veld waarmee veel tijdwinst kan worden geboekt.

UDetect detecteert *E. coli* wanneer de norm wordt overschreden (bepaald met MPN), maar de resultaten bij lagere *E. coli* concentraties zijn niet consistent in vergelijking met MPN-concentraties. Hetzelfde geldt voor de DNA-isolaten die geanalyseerd zijn op de qPCR in het lab. Dit zou mogelijk aan de gebruikte hoeveelheid template DNA kunnen liggen. Detectie van *E. coli* kan in vervolgonderzoek verder worden verbeterd, waarbij ook moet worden vastgesteld hoe de mobiele qPCR reageert rondom het afkeur-criterium dat gehanteerd wordt naar aanleiding van de MPN-waarden. Verdere validatie voor *E. coli* vindt plaats tijdens deelproject 2 en 3 (hoofdstuk 3 en 5). Het is onduidelijk of detectie van *Leptospira* mogelijk is met de UDetect. Vanwege het sporadische aantreffen van *Leptospira* in de huidige studie is het op dit moment moeilijk om verdere conclusies daarover te trekken. Het wordt aanbevolen hier verder onderzoek naar te doen. Als laatste, de toxine genen van blauwalgen werden gedetecteerd met UDetect vanaf een drempelwaarde concentratie van 2×10^3 genkopieën/mL. Dit geeft aan dat UDetect kan worden gebruikt voor risico-inschatting van blauwalgtoxine-genen. Een verder vergelijk van deze parameter met aangetroffen hoeveelheden blauwalgen in de praktijk zou helpen om het als screeningsmethode en risico-evaluatie te kunnen gebruiken.

5 Detectie fecale besmetting bij evenementenwater in stadsgrachten Breda

Samenvatting

Gemeente Breda heeft samen met het waterschap Brabantse Delta in 2020 en 2021 flink geïnvesteerd in het verkrijgen van inzicht in de hygiënische waterkwaliteit in het stedelijke oppervlaktewater. Hieruit komt het beeld naar voren dat de singels ten gevolge van riooloverstorten een aantal keer per zwemseizoen zodanig hygiënisch onbetrouwbaar worden dat zij op die momenten ongeschikt zijn voor waterrecreatie waarbij kans op contact met oppervlaktewater bestaat. Buiten deze periodes geldt dat de hygiënische waterkwaliteit voldoet aan de in de STOWA handreiking voor evenementen in, op, boven en rondom water opgenomen eisen.

In deze onderzoeken is ook verkend met welke meetmethoden deze hygiënische waterkwaliteit gemonitord kan worden. Onderzocht zijn de reguliere bemonstering (labanalyse), de BACTcontrol (semi-continue), en de mobiele qPCR (snelle, losse monsters).

Het onderzoek heeft een goed beeld opgeleverd van de toepasbaarheid van nieuwe en snellere meettechnieken in vergelijking met traditionele bemonstering. Op basis van de resultaten zijn de volgende conclusies getrokken:

- De reguliere bemonsteringen van de waterkwaliteit en aansluitende labanalyse geven een goed inzicht in de hygiënische waterkwaliteit in de singels van Breda.
- De hygiënische waterkwaliteit in de singels (uitgedrukt in *E. coli* en enterococcen) blijkt dominant beïnvloed te worden door riooloverstorten. Na een forse riooloverstort duurt het enkele dagen voordat de waterkwaliteit weer op orde is.
- De stroomrichting in de singels is van zuid naar noord en dat is ook zichtbaar in de ruimtelijke variatie in hygiënische waterkwaliteit: in de zuidelijk gelegen meetpunten liggen de *E. coli* gehaltes lager dan bij de noordelijke meetpunten en ook het aantal metingen >1.800 kve/100 ml ligt daar lager. De singels van Breda zijn echter wel zodanig robuust dat door de riooloverstorten geen zuurstofdips en daarmee samenhangende vissterfte is waargenomen. Dit maakt dat het voor de singels in Breda niet eenvoudig is om met een fysisch-chemische meetmethode de vinger aan de pols te houden voor riooloverstorten.

Nadeel van reguliere monsternamen en aansluitend labonderzoek is de lange doorlooptijd tussen het moment van besmetting en het beschikbaar komen van het meetresultaat. Dit maakt dat labanalyse voor een singelsysteem met een door riooloverstorten sterk variërende hygiënische waterkwaliteit geen geschikte meetmethode is om steeds te beschikken over een actueel beeld van de hygiënische waterkwaliteit.

De semi continue meting van de enzymatische activiteit, specifiek voor *E. coli*, met behulp van de BACTcontrol is zeer geschikt voor alarmering: de BACTcontrol geeft direct aan wanneer de waterkwaliteit door overstorten onvoldoende wordt. De BACTcontrol kan echter niet aangeven wanneer de waterkwaliteit weer voldoende goed is, doordat de gemeten enzymatische activiteit van *E. coli* sneller verdwijnt dan de kweekbare *E. coli* zelf. Om de BACTcontrol in te kunnen zetten als betrouwbaar alarmeringssysteem is het wel noodzakelijk om de databeschikbaarheid te verhogen.

De ad hoc meting met behulp van de mobiele qPCR is geschikt om, in het geval van evenementen of in het geval van een geconstateerde serieuze riooloverstorting, snel te bepalen of de hygiënische waterkwaliteit weer voldoet. Om de mobiele qPCR hiervoor goed in te kunnen zetten is het wel noodzakelijk om de meetopbrengst te verhogen door in het meetprotocol te voorzien voor inhibitie. In geval van inhibitie (de meting wordt belemmerd door talloze aanwezige verontreinigingen) het monster te verdunnen en nogmaals in te zetten.

5.1 Inleiding

5.1.1 Aanleiding

Stedelijk oppervlaktewater heeft talloze functies, waaronder waterhuishoudkundige, stedenbouwkundige en ecologische functies. De waterkwaliteit is de afgelopen decennia verbeterd en daarnaast willen burgers, mede onder invloed van de warmere zomers, steeds vaker gebruik maken van het stedelijk oppervlaktewater om te recreëren of gewoon even te verkoelen.

Ook de gemeente Breda stimuleert het benutten van het stadswater voor activiteiten als city-swims en Breda-drijft. Het gebruik van het oppervlaktewater voor ‘evenementen’ is ook landelijk volop in ontwikkeling. STOWA heeft daartoe in 2019 een eerste handreiking opgesteld: ‘Handreiking voor evenementen in, op, met, boven en rondom water’ [2]. De handreiking geeft suggesties voor grenswaarden voor veilig gebruik van het oppervlaktewater afhankelijk van het type activiteit.

In de gemeente Breda bevindt zich een flink aantal plassen, singels en vaarten die door de inwoners in toenemende mate worden benut voor waterrecreatie. De gemeente wil deze recreatie faciliteren en in goede banen leiden. Daarbij wordt onderscheid gemaakt in drie typen locaties:

- Type 1. Officiële zwemwaterlocatie. Op deze locaties is de Europese Zwemwaterrichtlijn van toepassing en tijdens het zwemseizoen wordt de waterkwaliteit routinematig onderzocht. De actuele situatie wordt met het publiek gedeeld via www.zwemwater.nl.
- Type 2. Locatie met waterrecreatie- en/of zwemverbod. Op deze locaties is zwemmen of waterrecreatie verboden in verband met de veiligheid.
- Type 3. Overige wateren. De overige wateren zijn geen officiële zwemwaterlocatie (en het is ook niet de bedoeling dat deze als zodanig worden aangewezen). Dergelijke locaties worden soms door het publiek gebruikt voor waterrecreatie en worden soms ook gebruikt voor de organisatie van een evenement.

Samen met het waterschap Brabantse Delta heeft de gemeente Breda in 2017, 2018 en 2019 de eerste metingen uitgevoerd naar de hygiënische waterkwaliteit in het stedelijke oppervlaktewater op de ‘type 3’ locaties. Deze metingen vormen de basis voor het afstudeerrapport ‘Recreational water quality in the Breda canals’ van Bahar Pasdar [11]. Uit deze initiële dataset komt het beeld naar voren dat de singels ten gevolge van riooloverstortingen een aantal keer per recreatieseizoen (mei-september) zodanig hygiënisch onbetrouwbaar worden dat zij op die momenten ongeschikt zijn voor waterrecreatie waarbij kans op contact met oppervlaktewater bestaat. Tussen de overstortingen door geldt dat de hygiënische waterkwaliteit over het algemeen voldoet aan de in de STOWA handreiking voor evenementen in, op, boven en rondom water [2] opgenomen eisen ten aanzien van de bacteriologische kwaliteit. Op basis van deze data was het overigens niet mogelijk om een eenduidige relatie af te leiden tussen riooloverstortingen en hygiënische waterkwaliteit door gebrek aan informatie over zowel de lozingen vanaf de riooloverstorten als over de impact daarvan op het oppervlaktewater.

5.1.2 Doelstelling

Het project ‘evenementwater’ heeft de volgende doelstellingen:

- Verkrijgen van inzicht in de hygiënische waterkwaliteit in de singels van Breda en in de factoren die deze waterkwaliteit beïnvloeden
- Verkennen van nieuwe meettechnieken die in staat zijn om snel en/of continue inzicht te geven in deze hygiënische waterkwaliteit

om op basis daarvan goed onderbouwd beleid te kunnen ontwikkelen voor de omgang met recreatief gebruik van oppervlaktewater in Breda

5.2 Methode en aanpak

5.2.1 Onderzoeksmethode

Riooloverstorten zijn de belangrijkste invloedsfactor voor de kwaliteit van het oppervlaktewater [12], waarbij piekcontaminatiegebeurtenissen plaatsvinden na intense neerslag [13]. De onderzoeksmethode is gericht op het verkrijgen van inzicht in de bacteriologische respons van het watersysteem Breda op buien. Dit is gekoppeld aan de andere delen van het project waarin nieuwe meettechnieken (BACTcontrol en mobiele qPCR) zijn onderzocht en onderling zijn vergeleken. De toegepaste meettechnieken zijn:

1. Meting kweekbare *E. coli*. Kwantificering van kweekbare *E. coli* wordt uitgevoerd via de filtratie en incubatie van het monster in het laboratorium gedurende 24-48 uur. De concentraties worden uitgedrukt in kolonievormende eenheden per 100 ml (kve/100 ml) of meest waarschijnlijke aantal per 100 ml (MPN/100 ml) afhankelijk van de gebruikte lab methode. Deze methode is uitgebreid beschreven in hoofdstuk 2.1.
2. Meting activiteit *E. coli* in oppervlaktewater met BACTcontrol. De BACTcontrol is een snelle, (semi)continue meettechniek voor het detecteren van de microbiologische activiteit in water en is gebaseerd op de bestaande relatie tussen de enzymactiviteit van β -glucuronidase en de *E. coli*-kolonies [14]. De BACT control meet de enzymactiviteit als een indicator van de aanwezigheid van *E. coli* bacteriële kolonies. De enzymactiviteit wordt gedetecteerd door toegevoegde reagentia met een fluorescerende indicator. De reagentia zijn substraatspecifiek voor het enzym β -glucuronidase. Hoe meer enzym aanwezig is in het monster, hoe hoger de te meten fluorescentie. Deze methode is uitgebreid beschreven in hoofdstuk 2.2.
3. Meting aanwezigheid DNA 'menselijke' *E. coli* met qPCR. De qPCR is een snelle methode die wordt toegepast op losse monsters. qPCR werkt op basis van DNA-extractie en amplificatie van gensequenties (bijv. van *E. coli*). Het resultaat wordt uitgedrukt in genomische kopieën per ml (gen kopieën/ml). Deze methode is uitgebreid beschreven in hoofdstuk 2.4.

5.2.2 Gevolgde aanpak

In 2020 en 2021 is in het kader van het project 'evenementenwater' onderzoek gedaan naar de hygiënische waterkwaliteit in het singelsysteem van Breda. Mede op basis van de inzichten uit eerdere verkennende meetprojecten [11, 15] was het meetprogramma van 2020 ingericht dat bestond uit:

- Tweewekelijkse monsternamen en labonderzoek op hygiënische oppervlaktewaterkwaliteit op 6 locaties door AQUON.
- (semi)-continue meting met BACTcontrol op 1 locatie door microLAN.
- Uitvoeren lokale qPCR meting test op een deel van de monsters die gebruikt zijn door AQUON. Oorspronkelijk zouden deze metingen worden uitgevoerd door KWR met behulp van een qPCR van leverancier Biomeme, maar door problemen met leverantie van reagentia is uiteindelijk gekozen voor inzet van de UDetect qPCR van Orvion, waarbij de analyses zijn uitgevoerd door AQUON

- Neerslagmetingen in rioelstelsel door Breda, waarbij gebruik is gemaakt van de neerslagradar die beschikbaar is via Hydronet.

De gevolgde aanpak voor 2021 bestond uit:

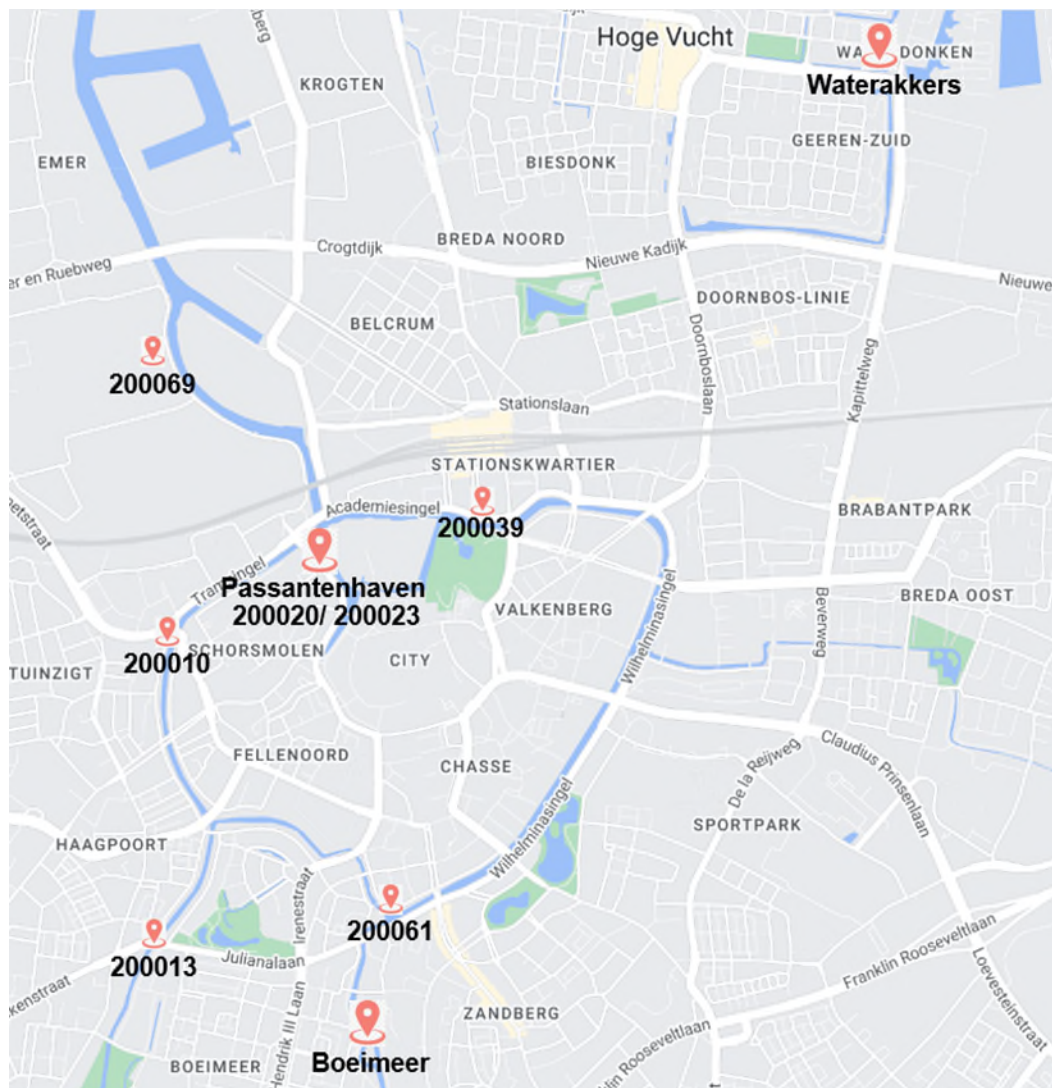
- 2 wekelijkse monsternamen uitgevoerd door AQUON op 1 locatie (Passantenhaven).
- (semi)-continue meting met BACTcontrol op dezelfde locatie (Passantenhaven) en twee aanvullende locaties (Waterakkers en Boeimeer) door microLAN.
- Na gedetecteerde grote pieklozing bij Passantenhaven inzet monsternamenamekast (met 4 flessen voor 4x 24-uurs monsters) om zo de hersteltijd van de singels in beeld te brengen. De monsters zijn door AQUON geanalyseerd met MPN methode en de UDetect qPCR.

De meetlocaties zijn weergegeven in Figuur 26. Meetpunt 200020 is hetzelfde als meetpunt 200023, de naam is gewijzigd vanwege een kleine verplaatsing van de exacte monsternamelocatie. De BACTcontrol is ingezet op Passantenhaven in 2020 en 2021 en daarnaast ook op de locaties Boeimeer en Waterakkers in 2021. De installatie van de BACTcontrol uit 2020 is opgenomen in Figuur 27. Een overzicht van alle metingen en locaties is weergegeven in Tabel 15.

Tabel 15. Meetlocaties en uitgevoerde metingen in Breda in 2020 en 2021

Meetlocatie (naam/nummer)	Uitgevoerde metingen + jaartal
Passantenhaven (200020)	In 2020 tot 17/8 2020: 2 maal per week handmatig steekmonster AQUON en labonderzoek op hygiënische oppervlaktewaterkwaliteit, een selectie van monsters ook met qPCR
Passantenhaven bij meetponton (200023)	In 2020 vanaf 20/8 2020: 2 maal per week handmatig steekmonster AQUON voor en labonderzoek op hygiënische oppervlaktewaterkwaliteit, een selectie van monsters ook met qPCR In 2020: BACTcontrol: semi continu In 2021: 2 maal per week handmatig steekmonster AQUON voor en labonderzoek op hygiënische oppervlaktewaterkwaliteit, een selectie van monsters ook met qPCR In 2021 BACTcontrol: semi continu
Tramsingel (200010)	In 2020: 2 maal per week handmatig steekmonster AQUON en labonderzoek op hygiënische oppervlaktewaterkwaliteit, een selectie van monsters ook met qPCR
Mark bij stadspark (200039)	In 2020: 2 maal per week handmatig steekmonster AQUON en labonderzoek op hygiënische oppervlaktewaterkwaliteit, een selectie van monsters ook met qPCR
Mark Juliananlaan (zuiden)(200061)	In 2020: 2 maal per week handmatig steekmonster AQUON en labonderzoek op hygiënische oppervlaktewaterkwaliteit, een selectie van monsters ook met qPCR
Weerij (uit zuiden)(220013)	In 2020: 2 maal per week handmatig steekmonster AQUON en labonderzoek op hygiënische oppervlaktewaterkwaliteit, een selectie van monsters ook met qPCR
Belcrum beach (200069)	In 2020: 2 maal per week handmatig steekmonster AQUON en labonderzoek op hygiënische oppervlaktewaterkwaliteit, een selectie van monsters ook met qPCR

Waterakkers	In 2021 BACTcontrol
Boeimeer	In 2021 BACTcontrol



Figuur 26. Meetlocaties in het singelsysteem bij Breda. Bij genummerde locaties zijn lab- en qPCR-metingen uitgevoerd. Bij Passantenhaven, Boeimeer en Waterakkers is de BACTcontrol ingezet.



Figuur 27. Meetlocatie 200020/ 200023 waarop het BACTcontrol systeem is geplaatst. De foto toont de meetcontainer uit 2020.

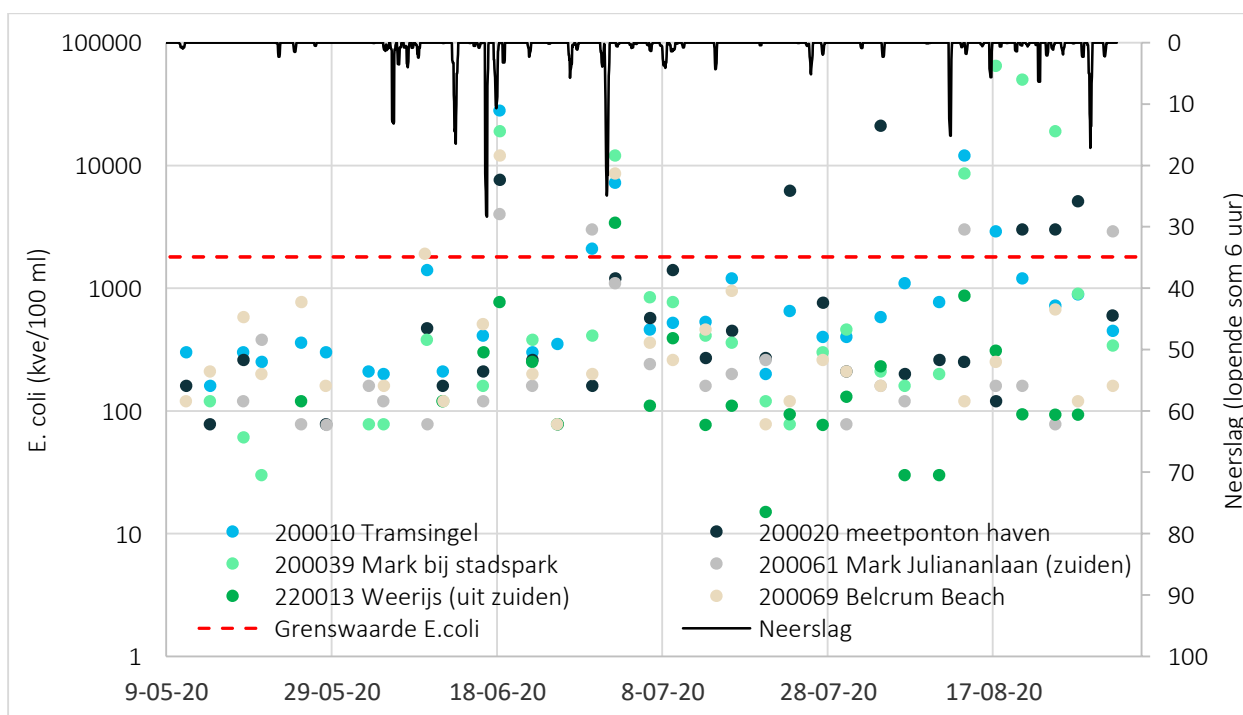
5.3 Resultaten

5.3.1 Laboratoriummetingen

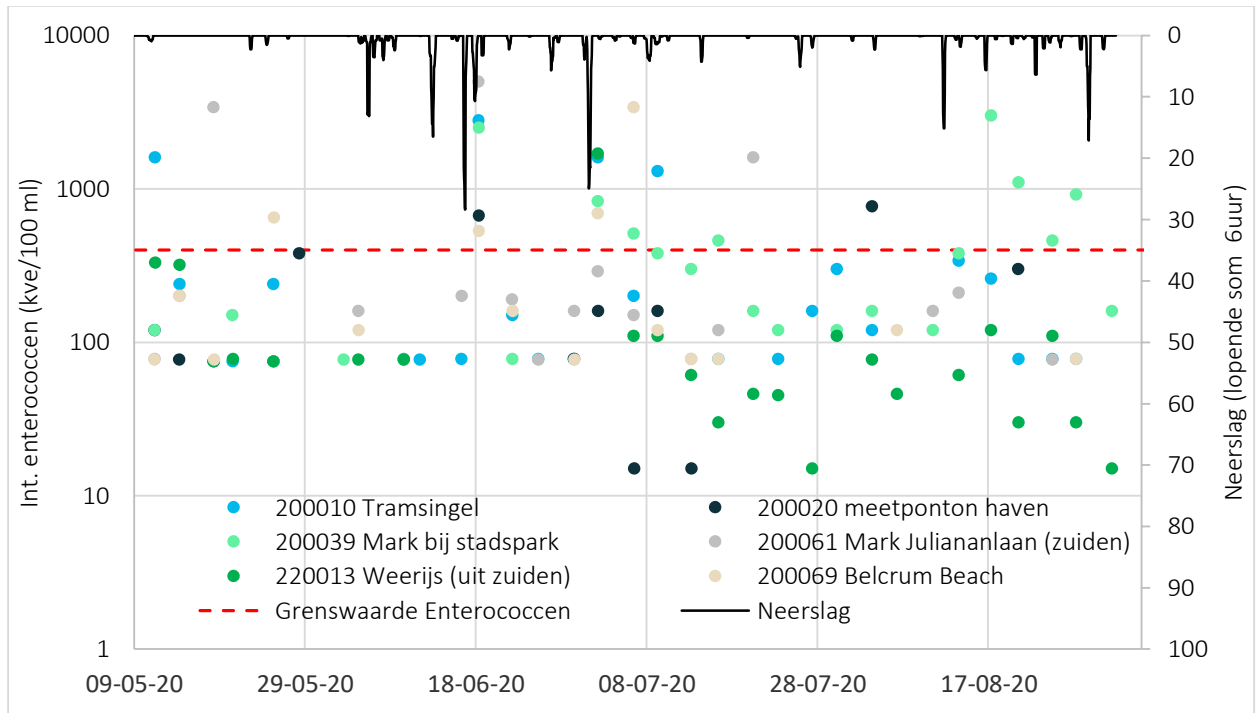
Op 6 locaties in 2020 (Figuur 28, Figuur 29) en 1 locatie (200020/200023) in 2021 (Figuur 30, Figuur 31) zijn metingen in het laboratorium voor *E. coli* en intestinale enterococconen uitgevoerd. De neerslag wordt ook weergegeven in de grafieken om de respons op de buien te verkennen.

De hygiënische waterkwaliteit in de singels komt jaarlijks een aantal keer boven de voor evenementenwater vastgestelde grens voor *E. coli* uit van 1800 kve/100 ml. Duidelijk zichtbaar is dat bij grote buien (> 20 mm in lopende som 6 uur) de waterkwaliteit in de singels op alle meetlocaties flink verslechtert en het hele singelsysteem hygiënisch onbetrouwbaar wordt. Dit is bijvoorbeeld het geval op 18 juni, 1 juli en 13 augustus 2020. Ook is te zien dat de waterkwaliteit bij het meetpunt bij de haven (meetpunt 200020) het slechtste is van alle 6 locaties. Figuur 68 (in bijlage III) toont voor de meetpunten het percentage van de lab metingen dat boven de grenswaarde voor een slechte waterkwaliteit ligt.

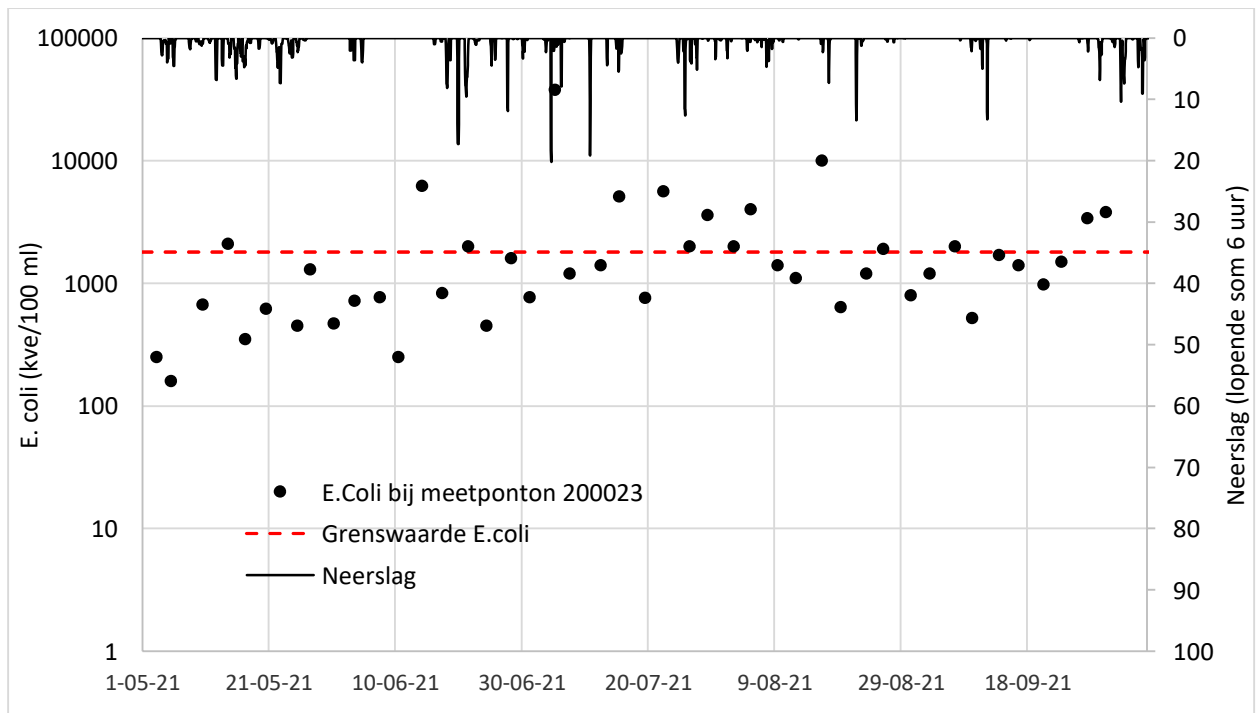
Voor Enterococconen ligt de grens voor evenementenwater op 400 kve/100 ml. Deze grens wordt bij grote buien regelmatig overschreden. Voor Enterococconen is de Mark bij het stadspark (meetpunt 200039) de locatie met de meeste overschrijdingen. Voor Enterococconen geldt dat ook de buien van 18 juni en 1 juli leiden tot duidelijk verhoogde aantallen op alle meetlocaties. Voor het overige is het beeld diffuser dan voor *E. coli*, met onregelmatige overschrijdingen die niet altijd neerslag gerelateerd zijn. Ook voor Enterococconen geldt dat de meest noordelijke locatie in de Mark de slechtste hygiënische waterkwaliteit heeft.



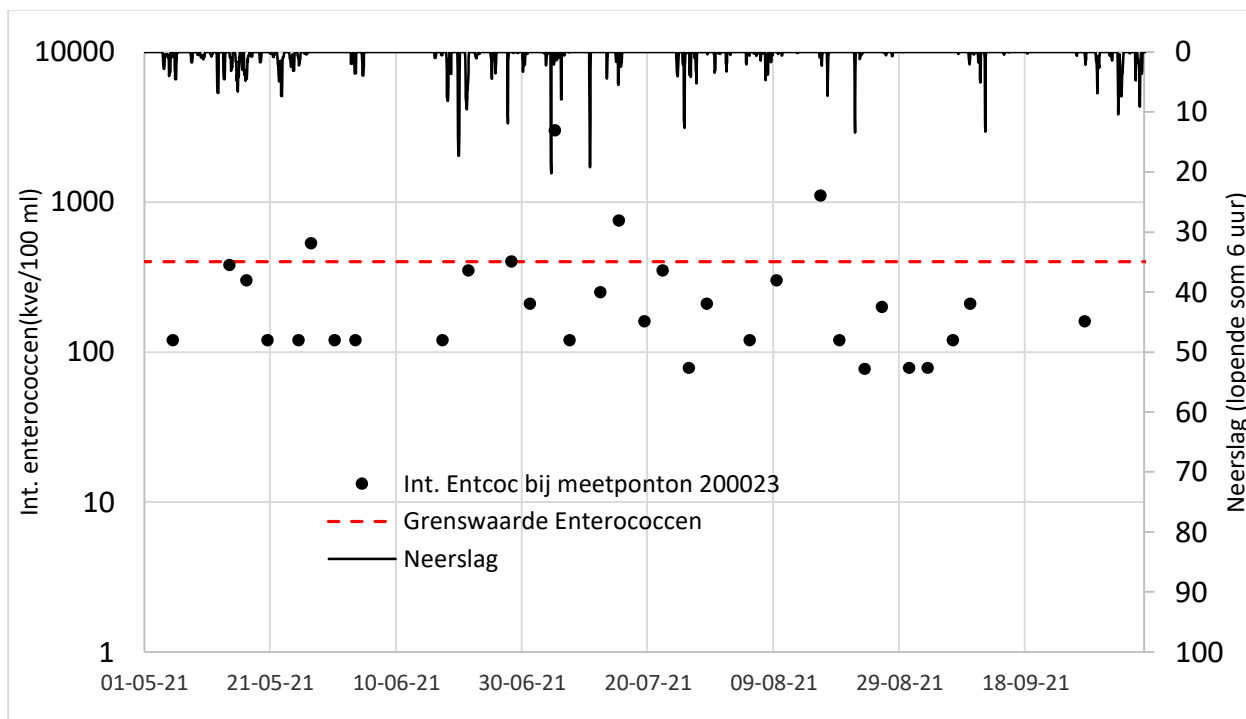
Figuur 28. Gemeten *E. coli* in 2020 op alle meetpunten op linker- en 6 uur lopend gemiddelde neerslag (radarmeting van Hydronet) op rechteras



Figuur 29. Gemeten Enterococci in 2020 op alle meetpunten op linker- en rechteras en 6 uur lopend gemiddelde neerslag (radarmeting van Hydronet) op rechteras



Figuur 30. Gemeten E. coli in 2021 op alle meetpunten op linker- en rechteras en 6 uur lopend gemiddelde neerslag (radarmeting van Hydronet) op rechteras



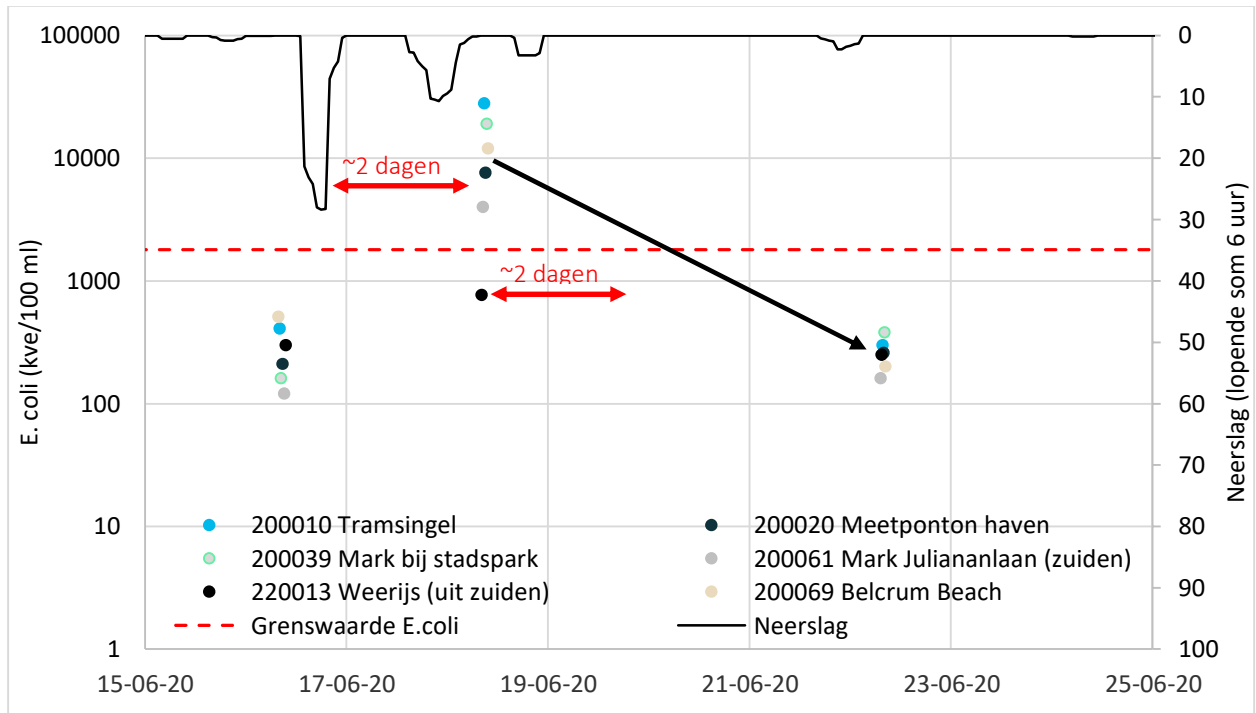
Figuur 31. Gemeten Enterococci in 2021 op alle meetpunten op linker- en rechteras en 6 uur lopend gemiddelde neerslag (radarmeting van Hydronet)

5.3.2 Schatting van de hersteltijd

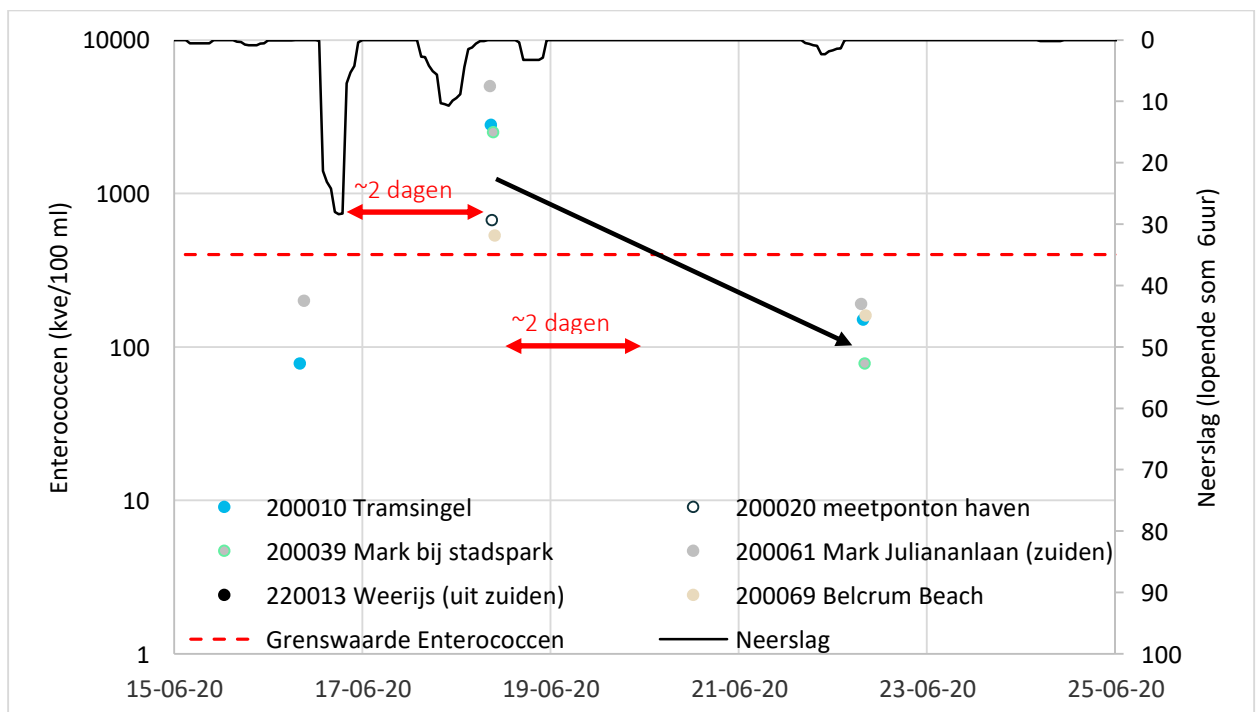
Een belangrijk onderdeel van dit onderzoek is om te vaststellen wanneer het water weer hygiënisch betrouwbaar wordt (d.w.z. dat de *E. coli* weer onder de grenswaarde komt). De hersteltijd na een bui is afhankelijk van de temperatuur, verblijftijd, zonneschijn en de initiële concentratie na een overstorting in de singels. Deze initiële concentratie is de meest onzekere factor.

De dynamiek van de *E. coli*- en Int. Enterococci-kolonies is in beeld gebracht voor een aantal dagen met stevige neerslag. Figuur 32 en Figuur 33 tonen de gemeten aantallen *E. coli*- en Int. Enterococci samen met de neerslag. Het is duidelijk dat de regenbuien op 16-18 juni de toename van de bacteriekolonies (zowel *E. coli* als Int. Enterococci) in het water veroorzaakten. Als we uitgaan van een lineair verband tussen opeenvolgende metingen, dan kan een schatting worden gemaakt voor de hersteltijd. Uit de vervolgmetingen op 22 juni blijkt dat een periode van circa 4 dagen vanaf de grootste bui nodig is om de *E. coli* en Enterococci tot een acceptabel niveau te laten dalen.

Deze resultaten uit 2020 komen overeen met de bevindingen uit het afstudeerproject van Bahar Pasdar [11], die op basis van de data uit 2018 en 2019 liet zien dat de hersteltijd na een bui in de orde van grootte ligt van enkele dagen. Met het oog op het kunnen informeren van recreanten en organisatoren van waterevenementen is het wel van belang om op de dag van de activiteit zekerheid te hebben over de hygiënische betrouwbaarheid. Deze en de vorige grafieken illustreren dan ook de behoefte aan een meettechniek die op de dag voorafgaand aan of op de dag zelf van een activiteit of evenement een uitspraak kan doen.



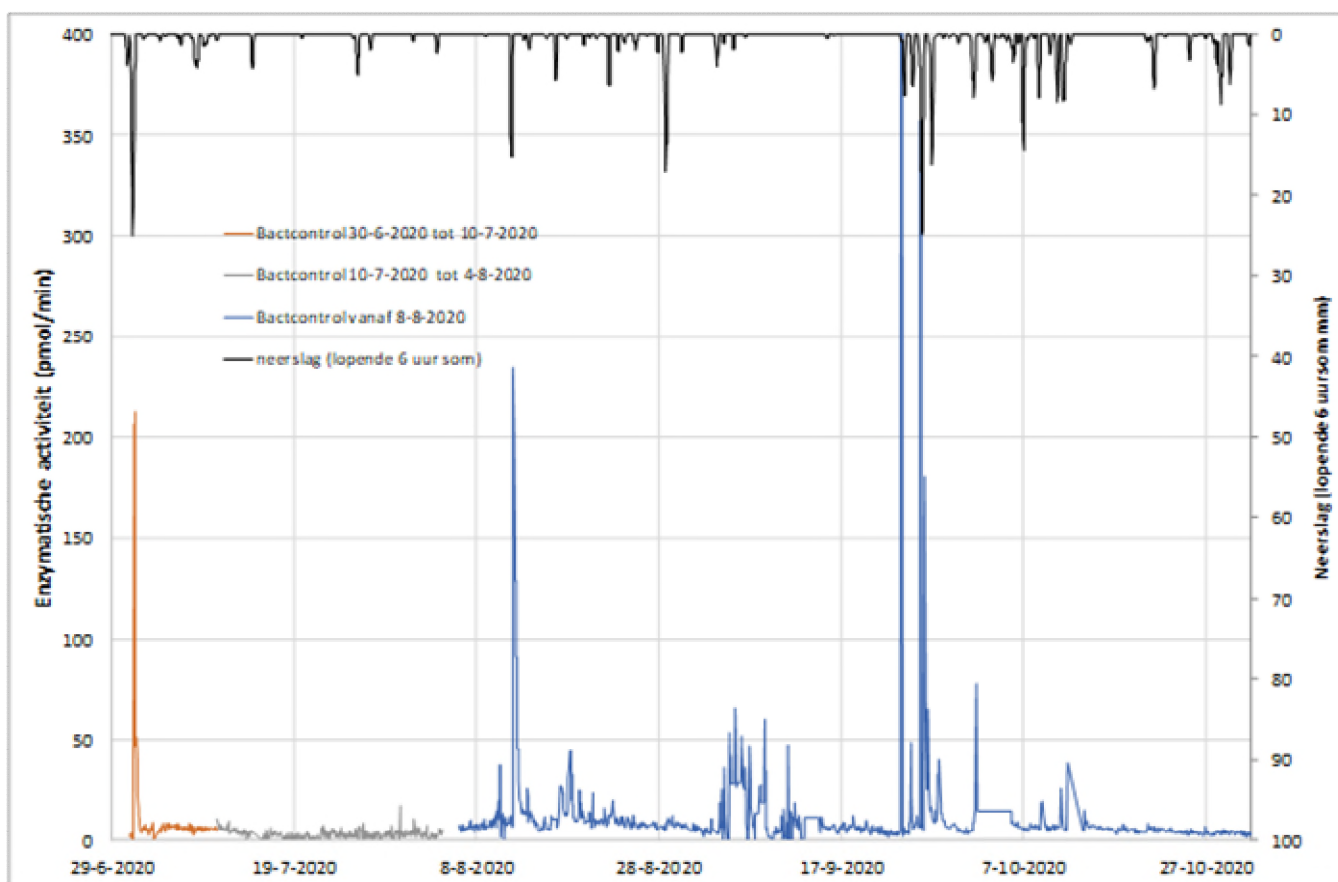
Figuur 32. Gemeten E. coli na bui van 16 juni 2020 op alle meetpunten op linker as en 6 uur lopende gemiddelde neerslag (radarmeting van Hydronet) op rechter as



Figuur 33. Gemeten intestinale enterococci na bui van 16 juni 2020 op alle meetpunten op linker as en 6 uur lopende gemiddelde neerslag (radarmeting van Hydronet) op rechter as

5.3.3 BACTcontrol-metingen

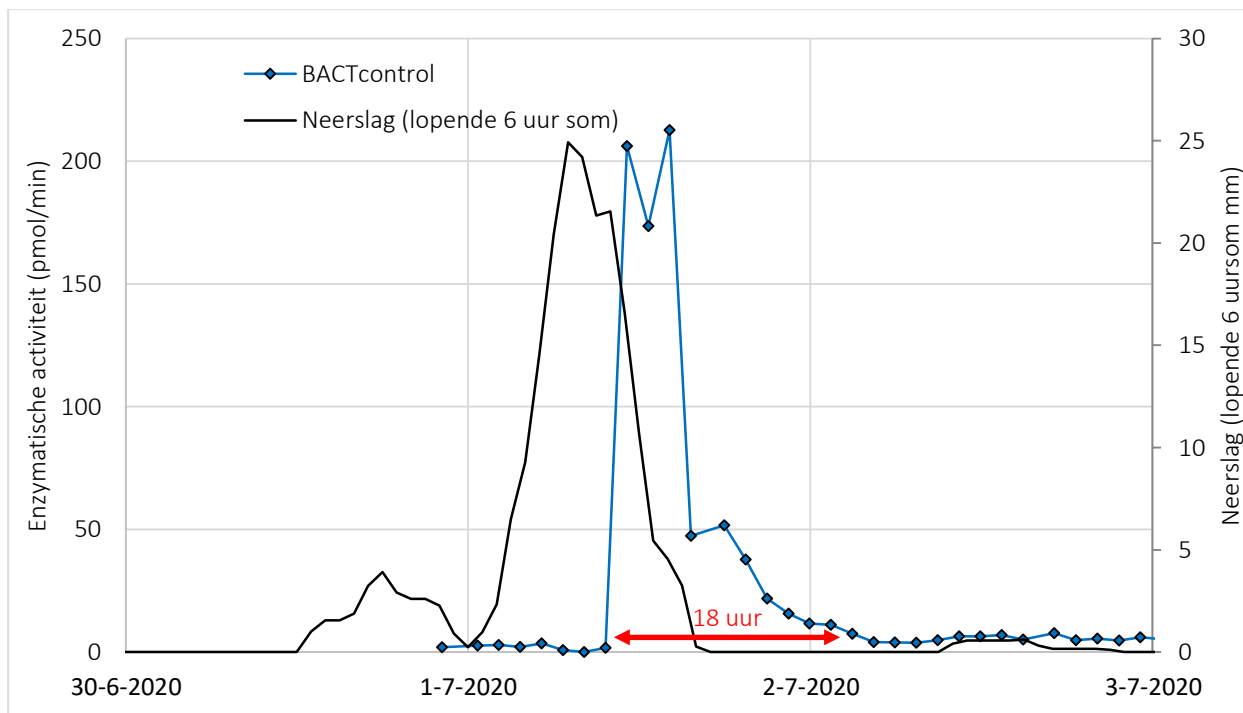
De BACTcontrol was in 2020 op meetlocatie 200020/200023 geplaatst om (semi)continue metingen van de enzymatische activiteit in water te verkrijgen. Figuur 34 toont de resultaten van meer dan 3 maanden metingen. De data is in drie 'batches' aangeleverd, overeenkomend met periodes waarin technische aanpassingen aan de BACTcontrol en/of het data acquisitiesysteem zijn verricht. De metingen van de BACTcontrol geven een snelle en duidelijk herkenbare respons aan bij grotere buien (>20 mm). Bij kleinere buien is de respons afwezig of vrij beperkt. Door deze grafiek te combineren met de getoonde resultaten in paragraaf 5.3.1 is geconcludeerd dat de BACTcontrol goed in staat is om bij de buien die leiden tot *E. coli* concentraties die uitkomen boven de grens voor evenementenwater alarm te slaan. Tevens illustreert de geringe respons op kleinere buien dat het vooral de riooloverstorten zijn die pas gaan lozen bij grotere buien die de hygiënische waterkwaliteit bepalen en niet zozeer de regenwateruitlaten (met bijbehorende foutaansluitingen) die al bij geringe neerslag lozen.



Figuur 34. Enzymatische activiteit geregistreerd door BACTcontrol op verschillende tijdvakken op linker as en gemeten neerslag op rechter as.

In Figuur 35 is de gemeten neerslag van de bui van 1 juli 2020 en de respons van de BACTcontrol-metingen weergegeven. De enzymatische activiteit bereikt hoge waarden (~200 pmol/min), hetgeen duidt op een forse *E. coli* besmetting. Opvallend is dat het BACTcontrol signaal snel (binnen 18 uur) naar het achtergrondniveau terugkeren. De respons van de BACTcontrol lijkt te kort om de langdurige aanwezigheid van kweekbare *E. coli* in het oppervlaktewater te volgen, al zou dit met een kweektest die rond het piekmoment wordt ingezet bevestigd moeten worden. Kennelijk houden bacteriën in oppervlaktewater al snel op met sterke enzymatische activiteit, dit in tegenstelling tot de resultaten uit de validatietesten (hoofdstuk 3) waar het BACTcontrol signaal langer meetbaar is (dit wordt in hoofdstuk 8.4 verder toegelicht). Dit maakt dat de BACTcontrol wel kan signaleren of er

vers rioolwater is geloosd, maar niet of de singel al weer hygiënisch betrouwbaar is. Een gedetailleerde vergelijking en toelichting is opgenomen in paragraaf 5.3.4.

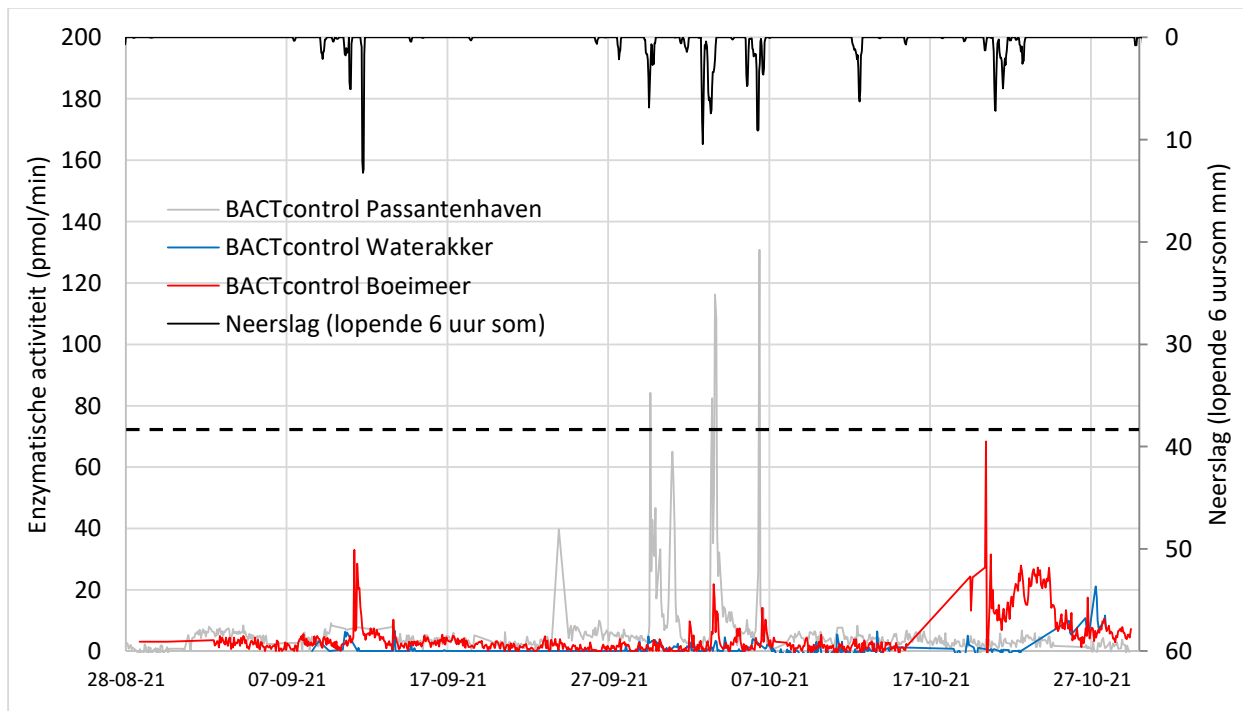


Figuur 35. Enzymatische activiteit geregistreerd door BACTcontrol op linkerass en gemeten neerslag op rechterass

In augustus en begin september is sprake van een relatief hoge achtergrondvariatie in de enzymatische activiteit, hoewel het tijdens een droge periode is. Dit valt samen met een periode waarin de AQUON monsternemers een verminderd doorzicht vaststellen en het AQUON lab een verhoogd chlorofyl gehalte heeft gemeten (zie Figuur 69 en Figuur 70 in Bijlage III). In de droge periode eind augustus verslechtert de waterkwaliteit, wat kennelijk ook leidt tot hogere achtergrondvariaties van enzymatische activiteit. Deze relatie tussen hogere enzymatische activiteit en hogere temperatuur is ook te vinden in de wetenschappelijke literatuur [16, 17]. Op basis van de analyse van de metingen is een waarde van 75 pmol/min vastgesteld als veilige grenswaarde. Zolang de BACTcontrol metingen daar onder liggen is geen sprake van een verse besmetting met *E. coli*, zodra deze daar boven komt is de kans zeer groot dat het gehalte *E. coli* boven de grenswaarde van 1.800 kve/100 ml uitkomt. De pieken in de data op 23 en 25 september 2020 zijn te veroorzakt door testen en onderhoud en zijn derhalve niet te beschouwen als representatieve metingen.

Figuur 36 toont de metingen voor de periode van 28-31 augustus waarin de regenradar een significante regengebeurtenis (>15 mm) heeft gemeten maar waar geen verhoogde metingen van de BACTcontrol zijn geconstateerd. Mogelijke oorzaken daarvoor zijn:

- Meting BACTcontrol zelf onjuist (kleine kans, onzekerheid klein)
- Monsternamen BACTcontrol onjuist
- Neerslag uit grafiek niet representatief
- Rioleringsberekening gemaakt met ruimtelijke variatie in neerslag

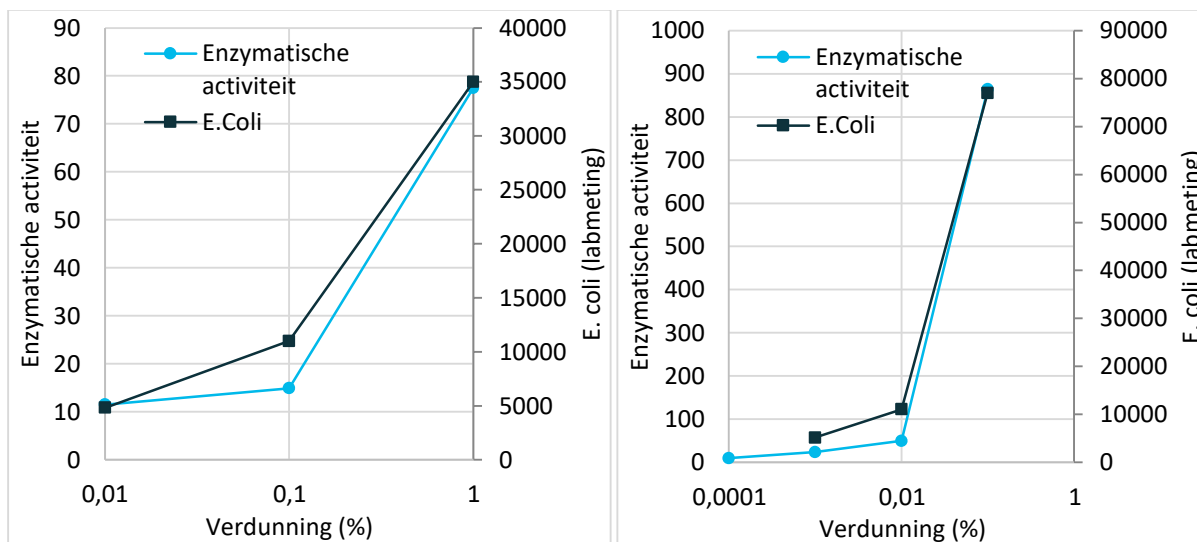


Figuur 38. Enzymatische activiteit geregistreerd door BACTcontrol op verschillende tijdvakken op 3 meetpunten (Passantenhaven, Waterakkers, Boeimeer) op linker as en gemeten neerslag op rechter as. De zwarte stippellijn toont de grenswaarde voor de BACTcontrol.

5.3.3.1 Betrouwbaarheid en databeschikbaarheid BACTcontrol

Betrouwbaarheid

De BACTcontrol is een methode voor het snel kunnen bepalen van de hygiënische kwaliteit van het oppervlaktewater. In deze paragraaf zijn de resultaten van BACTcontrol vergeleken met de resultaten van de traditionele methode (d.w.z. labmetingen). De labmetingen zijn hierbij als referentie gebruikt om de betrouwbaarheid van BACTcontrol te testen. Figuur 39 toont spike testen waarin de enzymatische activiteit (BACTcontrol) is vergeleken met de hoeveelheid *E. coli* kolonies (labmetingen) voor 0,0001 – 1% vers rioolwater verdund in oppervlaktewater. De spike testen laten zien dat de BACTcontrol voor verse lozingen/verse verdunningen tot betrouwbare resultaten leidt. De verdunning van de *E. coli* zoals bepaald in het lab wordt goed gevolgd.



Figuur 39. De relatie tussen de enzymatische activiteit en *E. coli* voor verschillende verdunningsniveaus.

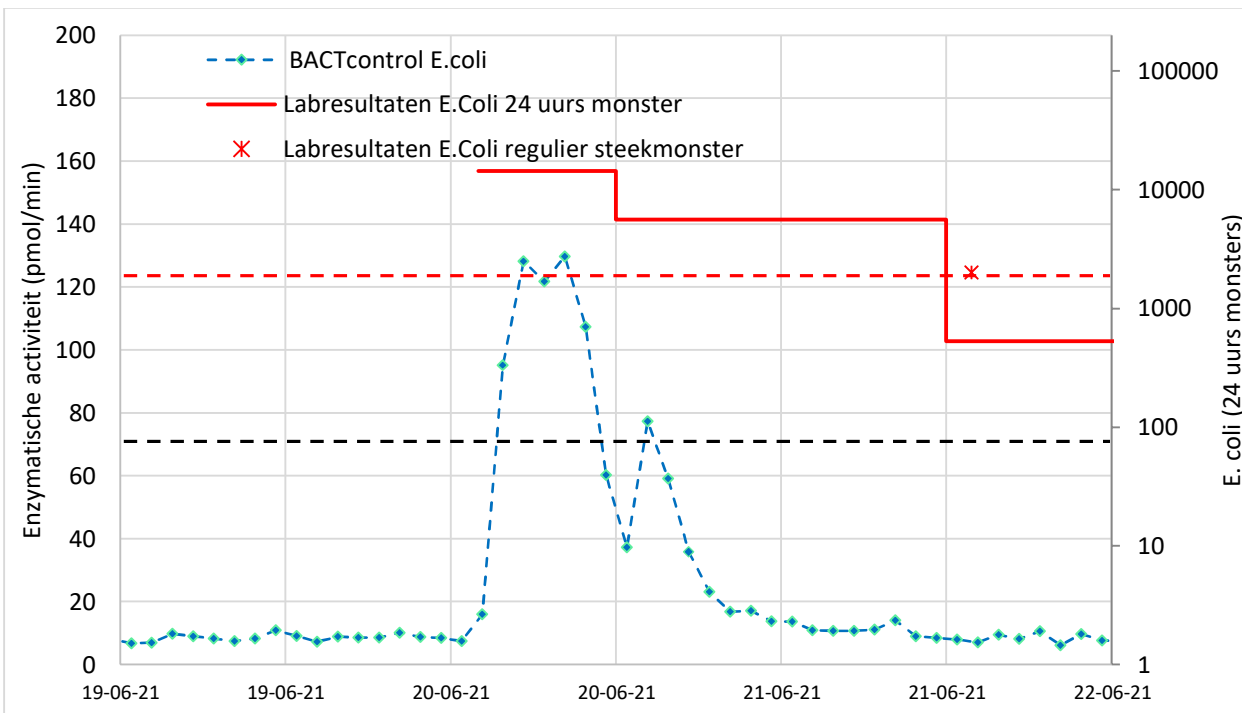
Databeschikbaarheid

De BACTcontrol kan meten met een instelbare, variabele meetfrequentie. Om pieken te kunnen waarnemen bedraagt het maximale meetinterval 3 uur, hoewel 1,5 uur te verkiezen is. Voor het meetpunt Passantenhaven is voor de jaren 2020 en 2021 geanalyseerd wat de bereikte data opbrengst is. Daartoe is bepaald voor hoeveel blokken van 3 uur wel data beschikbaar is en voor hoeveel dit niet het geval is. Negatieve waarden, nulwaarden of een repetitie van exact dezelfde waarde gedurende meerdere tijdstappen zijn daarbij beschouwd als blokken zonder goede data. In 2020 was de data opbrengst 86% en in 2021 87,1%. Dit betekent dat er aanzienlijke gaten in de tijdreeks zitten die in de toekomst beperkt moeten worden door het optimaliseren van het beheer van de BACTcontrol en het borgen van de datacommunicatie.

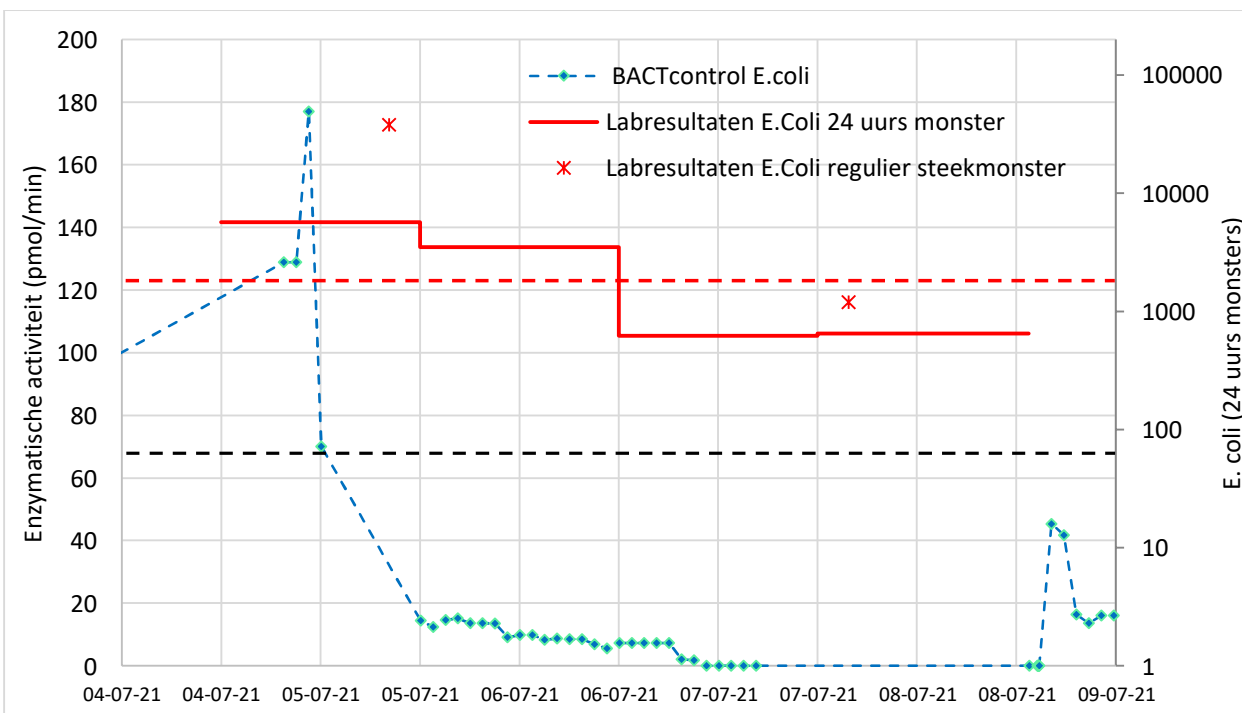
5.3.4 Nadere analyse hersteltijd

Op basis van de resultaten in paragraaf 5.3.2 en 5.3.3 is het duidelijk dat de hersteltijd niet kan worden verkregen uit de BACTcontrol-metingen. Deze paragraaf verkent dit effect in meer detail. Figuur 40 en Figuur 41 bevatten de vergelijking tussen de resultaten van BACTcontrol, 24-uurs monsternamen en individuele labmetingen. De stippellijnen tonen de alarmwaarden voor de BACTcontrol (zwart) en de grenswaarde voor de labresultaten (rood) op basis van de handreiking van STOWA [2]. Deze resultaten komen na een significante regenbui (17 mm in 6 uur) en tonen de meetresultaten van verschillende meettechnieken met betrekking tot de pieklozingen na een overstorting. De enzymatische activiteit neemt relatief sneller af dan de hoeveelheid *E. coli*-bacteriekolonies uit 24-uurs monsters (getrokken rode lijn) en reguliere steekmonsters (rode ster). De waarde van de reguliere steekmonsters blijkt ook niet gelijk aan de 24-uurs monsters, wat verklaard wordt doordat de 24-uurs-monsters de gemiddelde concentratie gedurende een periode weergeven. Een vergelijkbaar verschil tussen de enzymatische activiteit en labmetingen is ook te vinden in de literatuur [18], hoewel de auteurs niet opmerkten dat dit een systematisch effect betreft. Duidelijk is dat de respons van BACTcontrol op overstortingen relatief kortdurend is, maar wel lang genoeg om met een gangbaar meetinterval van 90 minuten te kunnen vaststellen. BACTcontrol kan wat oude *E. coli* wel detecteren, maar het signaal daalt in de tijd door factoren die een rol spelen in deze signaalafname zoals zonlicht en stroming (verdunning).

BACTcontrol lijkt ideaal om de pieklozingen met een negatief effect op hygiënische kwaliteit *betrouwbaar* en *snel* te detecteren, maar het is *niet* geschikt om aan te geven wanneer het water weer hygiënische betrouwbaar is.



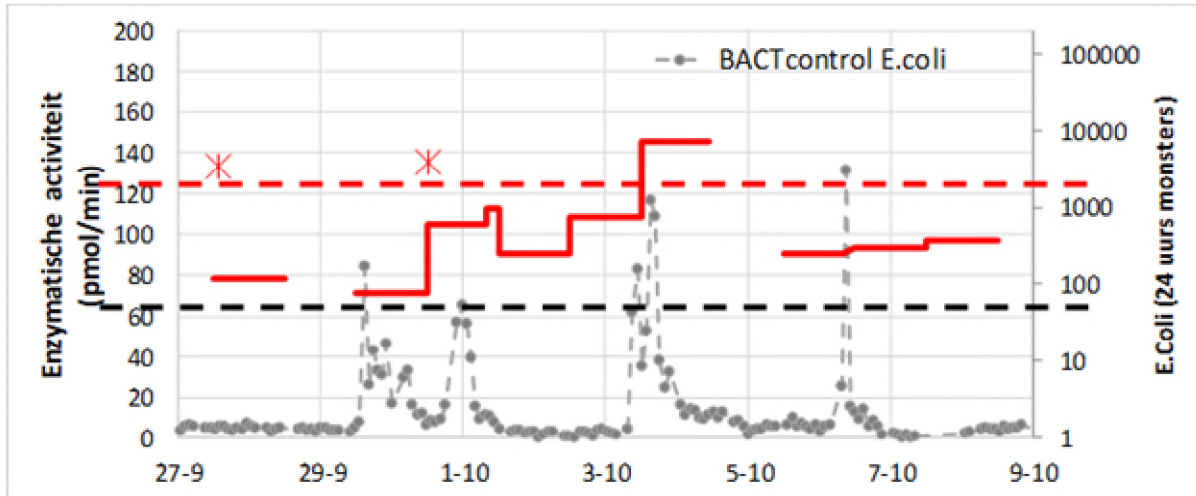
Figuur 40 Enzymatische activiteit geregistreerd door BACTcontrol op verschillende tijdstippen. Neerslag wordt ook gegeven op een secundaire as (jaar 2021). De zwarte stippellijn toont de grenswaarde voor de BACTcontrol en de rode stippellijn voor de labmetingen.



Figuur 41. Enzymatische activiteit geregistreerd door BACTcontrol op verschillende tijdstippen. Neerslag wordt ook gegeven op een secundaire as (jaar 2021). De zwarte stippellijn toont de grenswaarde voor de BACTcontrol en de rode stippellijn voor de labmetingen.

Figuur 42 toont dezelfde vergelijking tussen de meettechnieken tijdens een periode van opeenvolgende regenbuien. De pieken van de BACTcontrol op 29 september wordt zowel bevestigd door de reguliere monsternamen als door de 24 uurs meting, terwijl de meting op 3 oktober eveneens wordt bevestigd door de 24 uurs labmeting. De piek van 6 oktober daarentegen is minder duidelijk zichtbaar in de labresultaten. Uit de

vergelijking van de BACTcontrol data met de labanalyses volgt dat met het gekozen alarmniveau van 75 pmol/min voor de BACTcontrol een veilig alarmniveau is gekozen. Onder deze waarde komen de corresponderende labanalyses niet boven de grenswaarde van 1.800 kve/100 ml uit en boven deze waarde is de kans groot dat dit wel het geval is.

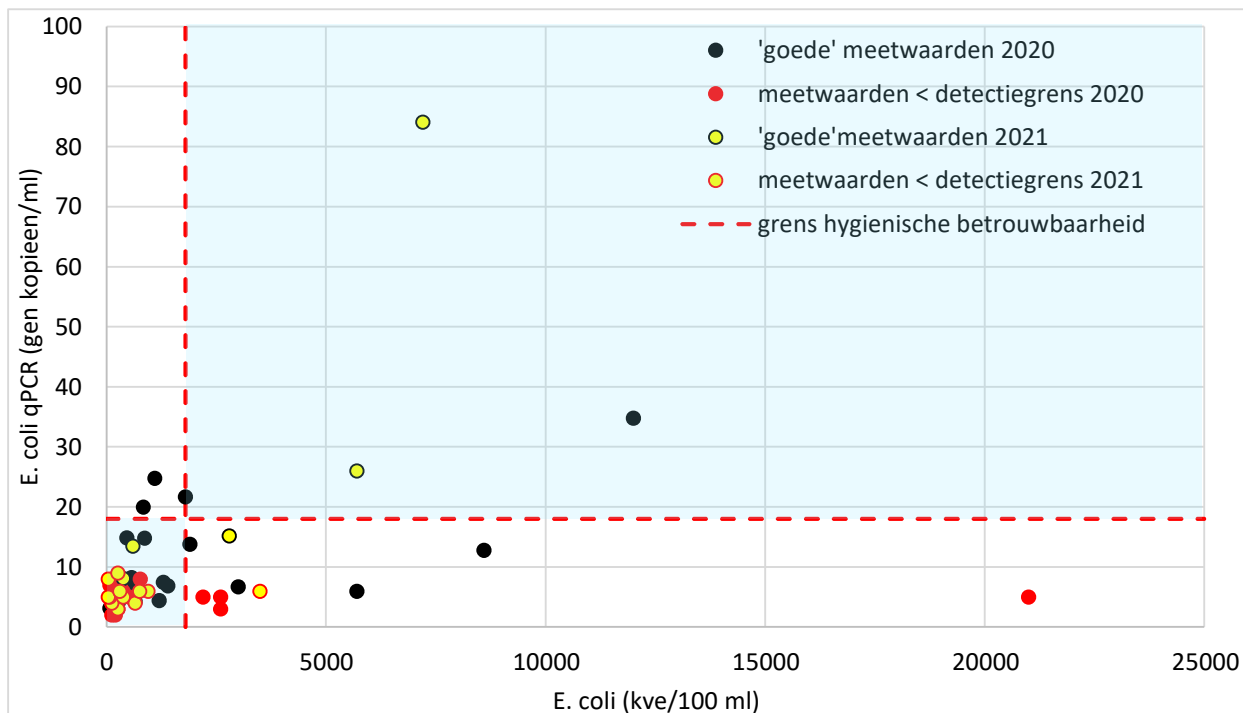


Figuur 42. Enzymatische activiteit geregistreerd door BACTcontrol op verschillende tijdvakken. Neerslag wordt ook gegeven op een secundaire as (jaar 2021). De zwarte stippellijn toont de grenswaarde voor de BACTcontrol en de rode stippellijn voor de labmetingen.

5.3.5 qPCR-metingen

De qPCR-metingen zijn op dezelfde monsters uitgevoerd als de labmetingen. Om logistieke redenen zijn de monsters van 2020 en 2021 eerst ingevroren en naderhand geanalyseerd. Zoals eerder aangegeven, is daarbij zowel gekozen voor een andere leverancier als uitvoerder dan aanvankelijk beoogd.

Figuur 43 toont de relatie tussen de qPCR-metingen en de labmetingen. De labresultaten zijn als referentie gebruikt. De rode stippellijnen tonen de grenswaarden voor het lab- (horizontaal) en de qPCR-metingen (verticaal). De delen van de grafiek met de lichtblauwe achtergrond bevatten de metingen waarbij beide methoden overeenkomen. Opvallend is dat relatief veel monsters een waarde hebben opgeleverd < detectiegrens. Daarbij moet worden aangegeven dat de detectiegrens van de qPCR per monster kan verschillen. Waarschijnlijk was regelmatig sprake van inhibitie, hetgeen ondervangen zou kunnen worden door het monster te verdunnen. Hiervoor was tijdens de uitvoering van de analyse van de monsters van 2020-2021 nog geen protocol afgesproken, waardoor heranalyse met een verdund monster achterwege is gebleven.

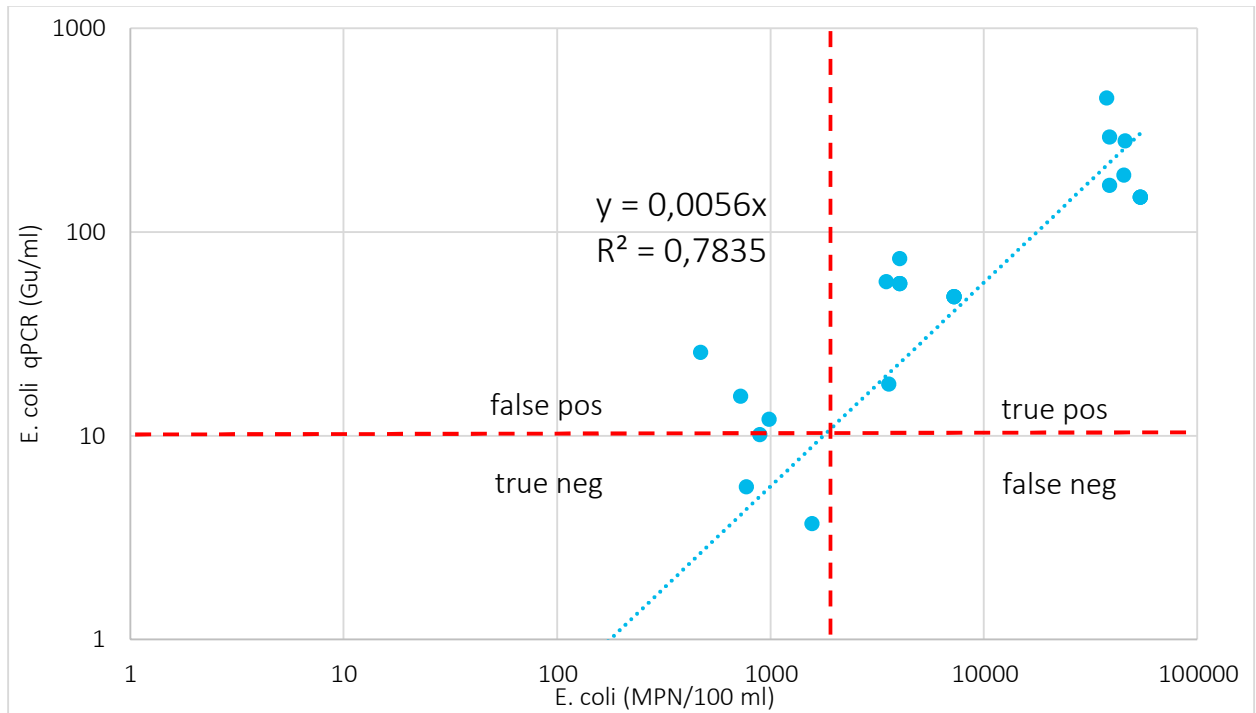


Figuur 43. Relatie tussen de hoeveelheid *E. coli* gemeten door de lab- en qPCR-methode. De rode stippellijnen geven de grenswaarden aan van de hygiënische betrouwbaarheid. Voor *E. coli* is dit 1.800 kve/100 ml en voor de qPCR is daarvoor 18 gen kopieën/ml aangehouden met als uitgangspunt dat dit overeenkomt met 1.800 gen kopieën/100 ml.

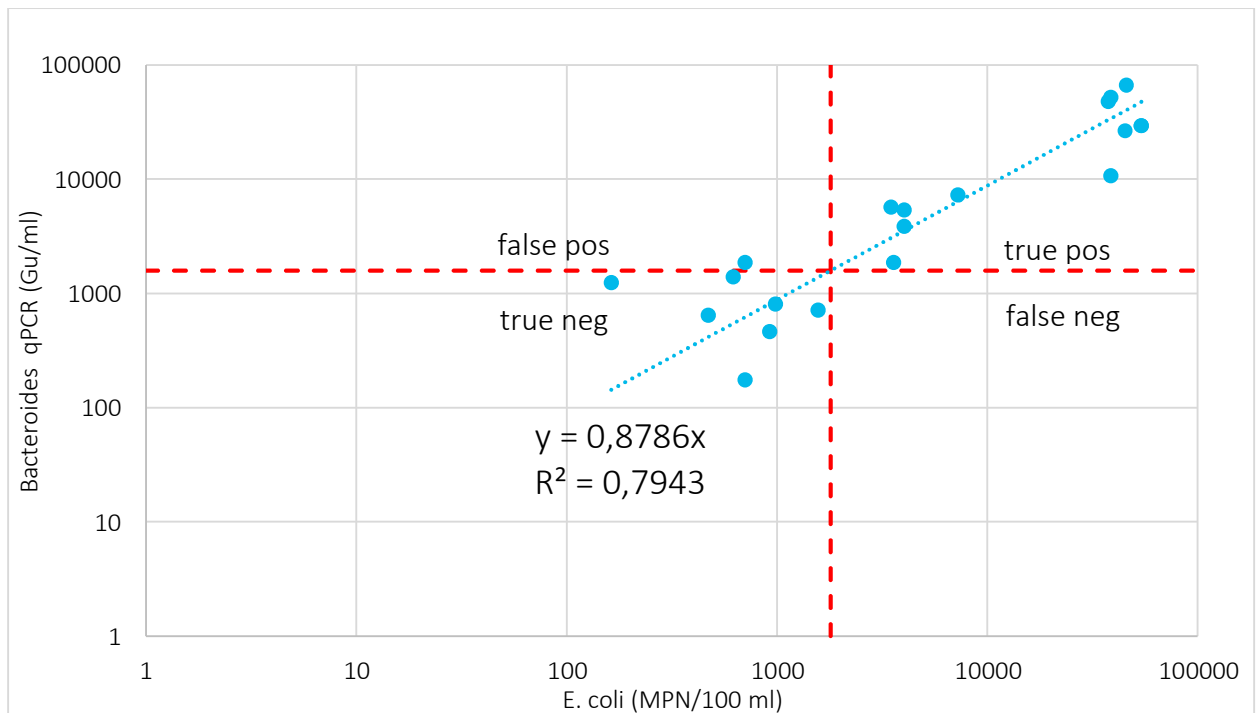
Linksboven in de grafiek zijn er een paar metingen die “vals alarm” zijn, wat zou leiden tot een verbod op het gebruik voor evenementen zonder daadwerkelijk risico. Er zijn echter verschillende qPCR-metingen die niet als hygiënisch riskant worden gedetecteerd, hoewel de bijbehorende labmetingen ruim boven de grenswaarden liggen (rechtsonder).

Zoals hiervoor aangegeven heeft het invriezen en ontdooien wellicht een negatieve invloed gehad. Om dit te verifiëren zijn in 2022 6 verdunningsreeksen van vers rioolwater met oppervlaktewater door AQUON doorgemeten met de qPCR en labmetingen, waarbij voor de qPCR zowel een analyse is uitgevoerd op *E. coli* als op *Bacteroides*.

Figuur 44 geeft de relatie tussen qPCR- en labmetingen voor *E. coli* en Figuur 45 geeft de relatie tussen qPCR-metingen voor *Bacteroides* en labmetingen voor *E. coli*. Op basis van de relatie tussen de metingen zijn ijklijnen vastgesteld, die geforceerd zijn door de oorsprong. De ijklijnen zijn vervolgens gebruikt om de hygiënische grenswaarden voor de qPCR-test vast te stellen op basis van de bekende labgrenswaarde van 1.800 mpn/100 ml. De metingen van de verdunningsreeksen tonen dat de qPCR-methode geen vals negatieven geeft (wel een paar vals positieven). Opvallend is dat qPCR-metingen van *Bacteroides* een vergelijkbare lineaire regressie heeft voor de qPCR methode. Dat geeft biedt perspectief om op termijn *Bacteroides* als indicator voor humane fecaliën te gebruiken omdat deze organismen in hogere concentraties dan *E. coli* voorkomen en dus een meer gunstige onderste detectiegrens kennen.



Figuur 44. Relatie tussen de hoeveelheid E. coli gemeten door de lab- en qPCR-methode. De rode stippellijnen geven de grenswaarden aan van de hygiënische betrouwbaarheid.



Figuur 45. Relatie tussen de hoeveelheid E. coli gemeten door de membraanfiltermethode (lab) en Bacteroides gemeten door de qPCR-methode. De rode stippellijnen geven de grenswaarden aan van de hygiënische betrouwbaarheid.

5.4 Conclusies en vooruitblik

5.4.1 Conclusies op basis van meetresultaten

Stedelijk water wordt steeds belangrijker voor gemeenten in het kader van evenementen en recreatie. Dit is mede mogelijk doordat de algemene en vaak zichtbare waterkwaliteit is verbeterd, terwijl de onzichtbare hygiënische waterkwaliteit daar soms bij achter blijft. Voor het singelsysteem in Breda blijken de riooloverstorten de bepalende factor. In dit onderzoek zijn verschillende methoden toegepast om inzicht te verkrijgen in de factoren die de kwaliteit van de oppervlaktewateren beïnvloeden. Behalve de traditionele labmetingen zijn er snellere alternatieve meettechnieken uitgetest, met name de BACTcontrol en qPCR testen. Op basis van de resultaten zijn de volgende conclusies getrokken:

- De singels van Breda zijn bovenstrooms van de stad in hygiënisch opzicht over het algemeen schoner dan benedenstrooms van de stad.
- Bij grotere buien (indicatief >15-20 mm) wordt gehele singelsysteem hygiënisch onbetrouwbaar met *E. coli* waardes >1.800 kve/100 ml en intestinale enterococcon waardes >400 kve/100 ml en wordt niet voldaan aan de getalswaarden uit de handreiking evenementenwater.
- Onduidelijk is nog na hoeveel dagen het singelwater weer hygiënisch betrouwbaar is. Uit de metingen volgt dat dit tussen de 2 en 7 dagen na de bui met riooloverstorten het geval is.
- De BACTcontrol (semi-continue meting enzymatische activiteit van *E. coli* in het oppervlaktewater) leidt tot betrouwbare resultaten waarmee een *verse* piekbesmetting met *E. coli* kan worden gesignaleerd. De activiteit van de *E. coli* in het oppervlaktewater neemt echter snel af, zodat de BACTcontrol niet kan worden gebruikt om aan te tonen of het oppervlaktewater weer hygiënisch betrouwbaar is.

5.4.2 Vooruitblik 2022-2025

Ook voor de komende jaren voorziet gemeente Breda dat bij burgers (en bedrijven) de behoefte zal blijven bestaan om het stedelijke oppervlaktewater te benutten voor recreatie. Om dit te faciliteren is het nodig om hen te informeren over de actuele hygiënische waterkwaliteit. Dit betekent dat een doorontwikkeling nodig is van een project dat gericht was op verkrijgen van inzicht in de werking van meetmethodes en de hygiënische waterkwaliteit naar een meer permanent systeem van monitoring en informatievoorziening voor de burgers (en bedrijven). Het jaar 2022 wordt daarbij gezien als transitiejaar, waarin de meetopzet en bijbehorende protocollen worden getest en de meetresultaten worden vertaald naar concrete informatie over de hygiënische waterkwaliteit. In de jaren 2023-2025 is het de bedoeling om te beschikken over een operationeel waarschuwingssysteem.

6 BACTcontrol als early warning systeem voor afsluiting van de Spiegelwaal

Samenvatting

De Spiegelwaal is een nevenstroom van de Waal nabij Nijmegen en een geliefde locatie voor waterrecreatie en zwemmen. De geul wordt nu aan het begin van het zwemseizoen afgesloten om de instroom van water uit de Waal met microbiologisch slechte waterkwaliteit te voorkomen. In een pilot onderzoek wil Rijkswaterstaat bekijken om het bovenstrooms meten van de waterkwaliteit bij Bimmen met snelle detectiemethoden kan helpen om de Spiegelwaal tijdig af te sluiten als er vanuit bovenstrooms slechtere waterkwaliteit wordt gemeten. Zowel BACTcontrol, als MPN methoden zijn toegepast bij Bimmen, de Spiegelwaal en Nijmegen om de *E. coli* concentratie in het water te monitoren. Het pilotonderzoek heeft plaatsgevonden in de periode mei – november 2020.

In totaal zijn er negen duidelijke pieken van verhoogde enzymactiviteit met de BACTcontrol systemen in Bimmen en Nijmegen gemeten, waarbij de tijd tussen detectie op de twee systemen varieert van 1,5 uur tot 7 uur, wat ongeveer overeenkomt met de stroomsnelheid van de Waal. Niet alle (kleine) pieken in enzymactiviteit in Nijmegen worden ook in Bimmen gezien en pieken die wel in Bimmen worden gemeten worden niet altijd in Nijmegen gezien. De BACTcontrol pieken komen ook niet goed overeen met de verhoogde *E. coli* concentraties op basis van MPN-metingen. Dit kan onder andere verklaard worden door het verschil in meetmoment van MPN en BACTcontrol, en doordat het MPN-meetpunt in Nijmegen aan de andere kant van de rivier als de BACTcontrol was gepositioneerd.

Omdat niet alle *E. coli* verontreinigingen gemeten en verklaard kunnen worden met de BACTcontrol metingen in Bimmen is het op dit moment geen volledig early-warning systeem, maar zou er bij grote pieken in Bimmen wel gewaarschuwd kunnen worden voor een aankomende fecale verontreiniging naar de Spiegelwaal om deze eventueel af te sluiten.

6.1 Inleiding

6.1.1 Aanleiding

Nabij Nijmegen ligt de Spiegelwaal, een nevengeul van de Waal (Figuur 46). Dit is een geliefde locatie voor waterrecreatie (zwemmen, watersport) maar waaraan ook vanuit de Kaderrichtlijn Water (KRW) specifieke doelen worden gesteld. Vanuit de KRW is doorstroming in de Spiegelwaal gewenst zodat vislarven vanuit de Waal in het voorjaar en zomer de Spiegelwaal in kunnen stromen. Met de instroom van water vanuit de Waal stromen niet alleen vislarven de Spiegelwaal in, maar ook fecale ziekteverwekkers. Daarom heeft het vanuit het oogpunt van de microbiologische zwemwaterkwaliteit de voorkeur om de instroom van de Spiegelwaal gedurende het zwemseizoen af te sluiten om de microbiologische waterkwaliteit beter te kunnen waarborgen. Echter is doorstroming gewenst voor de vissen en het voorkomen van blauwalgenbloei.

Het zwemseizoen overlapt met de maanden waarin, vanuit de KRW, de inlaat van de Spiegelwaal in principe open zou moeten staan. Dit creëert een spanningsveld tussen de microbiologische zwemwaterkwaliteit (inlaat dicht) en de instroom van vislarven (inlaat open). Rijkswaterstaat-Oost is verantwoordelijk voor de waterkwaliteit in de Spiegelwaal en heeft eind 2019, in samenspraak met de gebiedspartners (provincie en gemeente), besloten de Spiegelwaal jaarlijks vanaf 1 mei af te sluiten, totdat er een betere oplossing is gevonden om een goede

waterkwaliteit voor waterrecreanten te garanderen. Voorafgaand aan het zwemseizoen van 2023 wordt opnieuw besloten over hoe met de problematiek rondom de zwemwaterkwaliteit en de KRW-functie zal worden omgegaan.



Figuur 46. Luchtfoto van schiereiland 'Veur-Lent' in westelijke richting. Rechts de meestromende nevengeul, de Spiegelwaal

Eén van de mogelijkheden om zowel de instroom van vislarven mogelijk te maken als de microbiologische waterkwaliteit te waarborgen, is door een dynamisch en reguleerbaar afsluitsysteem aan het begin van de Spiegelwaal te hanteren. Door de microbiologische waterkwaliteit bovenstrooms van de Spiegelwaal te meten met een snelle testmethode, is een uitslag beschikbaar voordat dit water de Spiegelwaal instroomt. Mocht dit water een té hoge concentratie van de indicator voor fecale verontreiniging (maat voor ziekteverwekkers) bevatten dan kan de inlaat worden afgesloten voordat het verontreinigde water naar binnen stroomt. Het meetstation bij Bimmen ligt ongeveer 2-4 uur stroomopwaarts (afhankelijk van de waterafvoer en stroomsnelheid van de Waal) van de Spiegelwaal en zou hiervoor gebruikt kunnen worden. Er is echter nog geen ervaring met snelle technieken en of die voor deze situatie geschikt zijn. De snelheid van de meting is vrij cruciaal om tijdig de Spiegelwaal te kunnen afsluiten, aangezien dit een handmatig proces is.

In eigen onderzoek heeft Rijkswaterstaat een aantal kansrijke snelle monitoringstechnologieën geïdentificeerd: de BACTcontrol en de mobiele qPCR. In eigen onderzoek en in dit TKI-onderzoek zijn de methoden getest voor de specifieke situatie bij Bimmen-Spiegelwaal.

6.1.2 Doel

Hierbij wordt vooral gekeken naar de volgende onderzoeksvragen:

- Is het mogelijk om snel (binnen ongeveer 2 uur) een betrouwbare en accurate uitslag van de concentratie fecale indicatoren (*E. coli*) in het oppervlaktewater van de Waal te krijgen?
- Hoe nauwkeurig, betrouwbaar en kosteneffectief zijn deze meetmethodieken t.o.v. de gangbare MPN-methode?
- Zijn één of meerdere snelle meetmethoden voor fecale ziekteverwekkers bij Bimmen geschikt om hiermee het openen en sluiten van de inlaat van de Spiegelwaal te sturen?

Hiervoor zijn op meerdere plekken in de Waal en Spiegelwaal *E. coli*-metingen uitgevoerd met de conventionele MPN-methode en de snelle BACTcontrol-sensor.

6.2 Monitoringsprogramma en dataverwerking

6.2.1 Monitoringsprogramma

In de Waal en Spiegelwaal zijn vier meetlocaties aangewezen: Bimmen, instroom Spiegelwaal, zwemlocatie Spiegelwaal en de verkeerspost Nijmegen (Figuur 47). Op deze locaties zijn in de zomer en najaar van 2020 metingen uitgevoerd met de BACTcontrol en/of de *E. coli* MPN-methode volgens Tabel 16.



Figuur 47. Meetlocaties Waal (Bimmen) en Spiegelwaal (Nijmegen)

Tabel 16. Monitoringsprogramma Bimmen en de Spiegelwaal

Meetlocatie	Methode	Meetperiode in 2020	Frequentie
Bimmen	BACTcontrol	20 juli – 19 november	Elke 2 uur (13-14x per dag)
	<i>E. coli</i> MPN	4 augustus – 12 november	2x per week
Instroom Spiegelwaal	<i>E. coli</i> MPN	11 mei – 28 september	1x per week
Zwemlocatie Spiegelwaal	<i>E. coli</i> MPN	20 april – 22 september	1x per 2 weken
Verkeerspost Nijmegen	BACTcontrol	18 september – 19 november	Elke 2 – 2,5 uur (11-12x per dag)
	<i>E. coli</i> MPN	15 oktober – 12 november	2x per week

Resultaten van de BACTcontrol- en *E. coli* kweekresultaten zijn gecombineerd met informatie over neerslag (Nijmegen en Düsseldorf) en de waterafvoer (Millingen aan de Rijn en Pannerdense Kop) op verschillende plekken langs de Waal. Deze zijn afkomstig van www.waterinfo.rws.nl en www.wetterkontor.de/de/wetter/deutschland/rueckblick.asp?id=50.

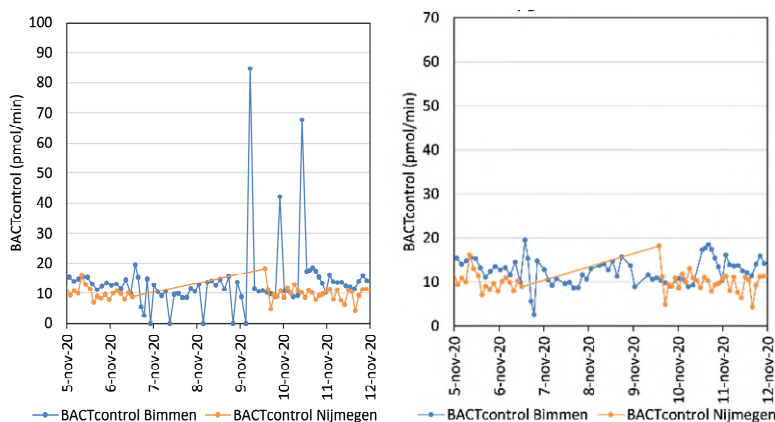
6.2.2 Dataverwerking

De BACTcontrol dataset is opgeschoond door de volgende metingen te verwijderen:

- Resultaten van spike-experimenten die op locatie zijn uitgevoerd

- Metingen met als resultaat 0 pmol/min, dit wordt veroorzaakt door een te lage waterstand in de Waal waardoor geen water ingenomen kan worden in de BACTcontrol. Een andere mogelijkheid is een storing in het systeem.
- ‘1-punts pieken’. Dit zijn resultaten waarbij er één (zeer) hoge meting is, voorafgegaan en gevolgd door een reeks min of meer stabiel lage metingen. Het is zeer onwaarschijnlijk dat dit een echte verhoging in het aantal *E. coli* bacteriën is, maar eerder dat dit b.v. veroorzaakt wordt door een moeilijke watermatrix (troebel) of andere fouten tijdens meten.

Een voorbeeld van metingen die zijn verwijderd, is gegeven in Figuur 48.



Figuur 48. Voorbeeld van ‘1-punts pieken’ en 0 pmol/min-resultaten (links). Deze metingen worden als onbetrouwbaar beschouwd en zijn uit de dataset gehaald (rechts).

6.2.3 Cross correlatie

De verwachting is dat variaties in het aantal bacteriën in de Waal bij Nijmegen mogelijk te voorspellen zijn aan de hand van BACTcontrol-metingen bovenstrooms bij Bimmen. Op basis van cross-correlaties is een eerste verkenning gemaakt van de relatie tussen de enzymactiviteit bij Bimmen en bij Nijmegen; en de vertragingstijd tussen deze locaties. Om deze cross correlatie uit te voeren is de opgeschoonde dataset uit paragraaf 6.2.2 gebruikt.

Simpele cross correlatie

Een cross-correlatie bestaat uit het berekenen van correlaties (Pearson's r) tussen twee tijdreeksen, waarvan één van de datasets telkens één tijdstap verschoven wordt ten opzichte van de andere dataset. Hiermee wordt gekeken of er een (min of meer) constante vertraging is tussen de BACTcontrol-resultaten van Bimmen en bij Nijmegen.

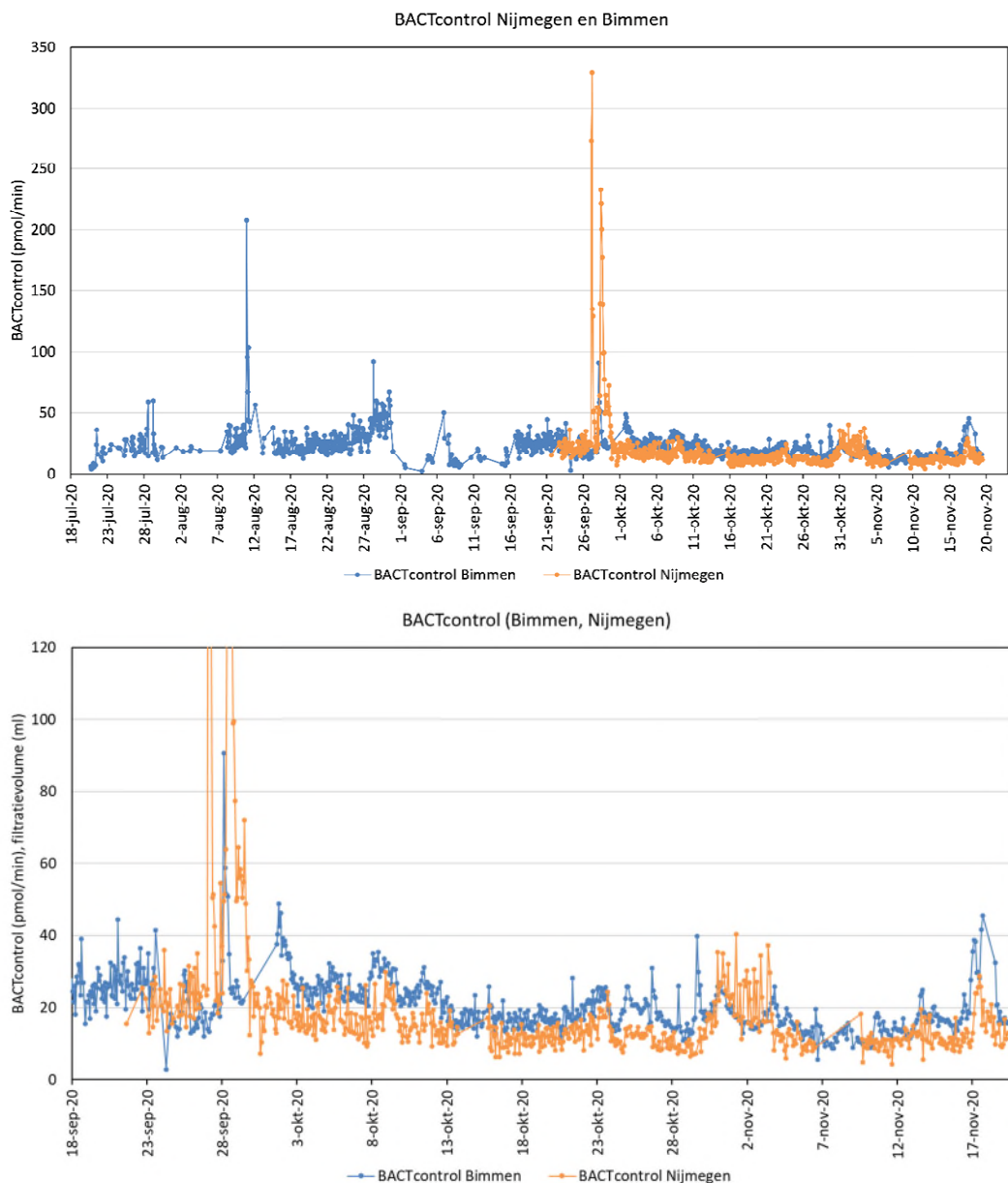
‘Windowed’ cross correlatie

De mate van samenhang en de vertragingstijd zijn in werkelijkheid waarschijnlijk niet constant over de tijd. Bij een hoge afvoer zou bijvoorbeeld een kortere vertragingstijd te verwachten zijn dan bij lage afvoer en een sterke piek kan voor een lokale sterke correlatie zorgen. Een ‘windowed’ cross-correlatie voert een cross-correlatie uit op sub-periodes van de tijdreeksen, zodat de verandering in correlaties over de tijd kan worden bekeken. De waterafvoer van de Waal varieert in de meetperiode op een tijdschaal in de orde van grootte van een week. Daarom zijn de windowed cross-correlaties uitgevoerd met tijdstappen van een week en van 3 dagen.

6.3 Resultaten en discussie Bimmen en Nijmegen (Spiegelwaal)

6.3.1 BACTcontrol en MPN *E. coli* resultaten

De opgeschoonde BACTcontrol-datasets van Nijmegen en Bimmen laten op hoofdlijnen hetzelfde patroon in enzymactiviteit zien (Figuur 49). In de meetreeks zijn een aantal duidelijke pieken zichtbaar, maar over het algemeen zijn er voornamelijk geleidelijke verhogingen en verlagingen van de enzymactiviteit gemeten.



Figuur 49. BACTcontrol *E. coli* resultaten nabij Bimmen en Nijmegen gedurende de hele meetperiode (boven) en de periode 16 september – 19 november 2020 (onder). In Bijlage IV, Figuur 71, is aan de onderste grafiek het filtratievolume toegevoegd.

In totaal zijn er negen duidelijke pieken en of langer durende verhogingen in de enzymactiviteit gemeten (Figuur 49, Tabel 17). De meeste pieken en verhogingen zijn gedetecteerd met beide BACTcontrol-systemen, waarbij de tijd tussen detectie op de twee systemen varieert van 1,5 uur tot 7 uur (Tabel 17). Twee pieken zijn alleen in Bimmen gedetecteerd (1/2 oktober en 29 oktober) en twee pieken alleen in Nijmegen (27 en 29 september). De

afwezigheid van duidelijke pieken kan mogelijk betekenen dat er weinig pieken in fecale verontreiniging aanwezig zijn in de Waal, maar ook dat fecale verontreinigingen mogelijk door de grote watermassa van de Waal (te) ver worden verdund en dus een laag meetresultaat geeft dat niet of nauwelijks boven het achtergrondsignaal uitkomt.

Om na te gaan of de BACTcontrol in Bimmen verhoogde *E. coli* aantallen in Nijmegen kan voorspellen, wordt verderop ingezoomd op de individuele pieken en daarnaast worden deze vergeleken met de neerslag, waterafvoer en MPN-gegevens (Figuur 54, paragraaf 6.3.2).

De stroomsnelheid van het water in de Waal wordt beïnvloed door onder andere de waterstand en de hoeveelheid neerslag. Uit modellen is bekend dat het water in ongeveer 2 tot 6 uur van Bimmen naar Nijmegen stroomt. Dit komt ongeveer overeen met de gemeten tijd tussen pieken die met beide BACTcontrol-systemen zijn gedetecteerd (Tabel 17). Een verdere analyse tussen beide BACTcontrol-systemen is uitgevoerd in paragraaf 6.3.3 met een cross-correlatie.

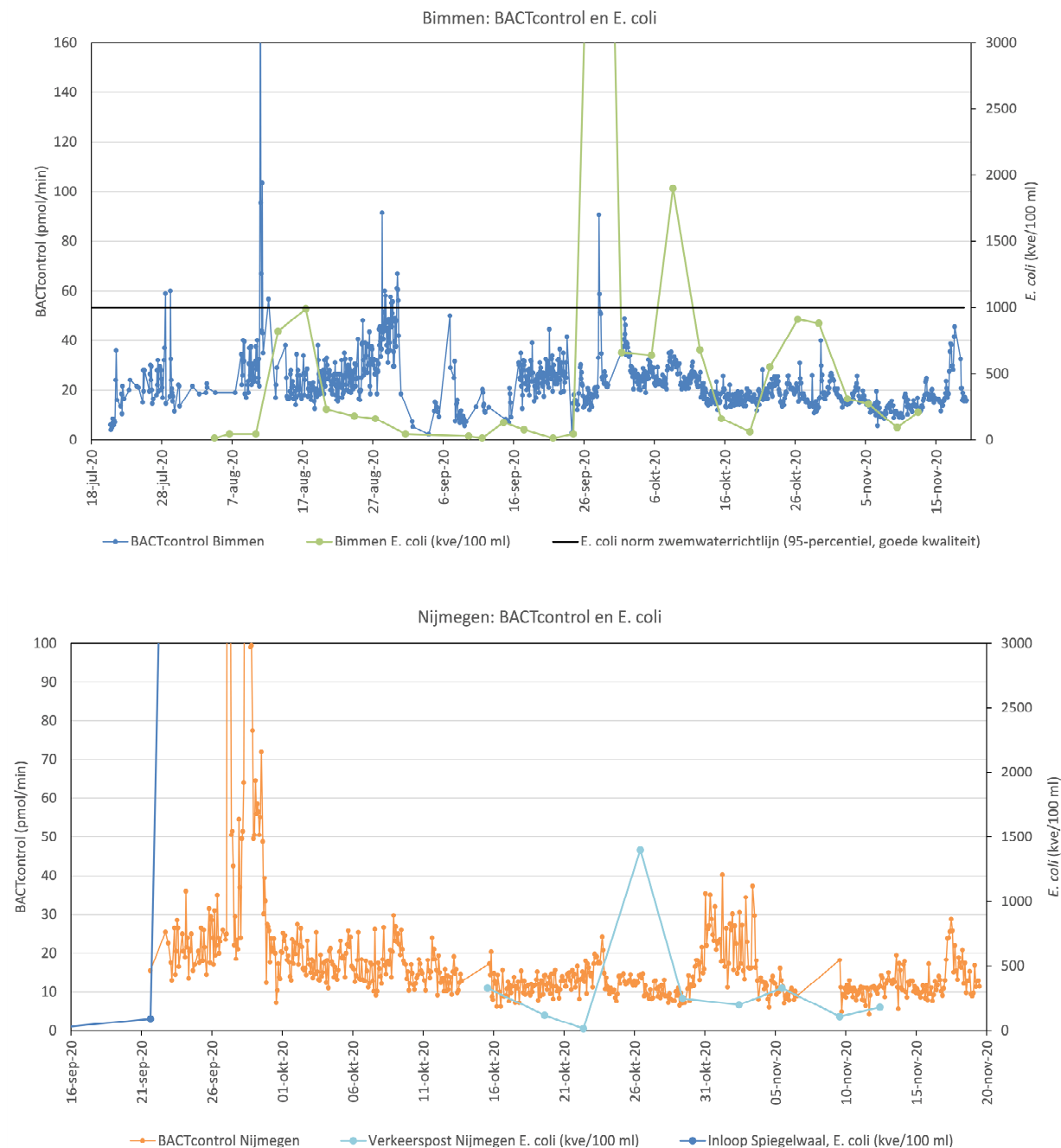
Tabel 17. Detectie van pieken in enzymactiviteit door de BACTcontrol-systemen in Nijmegen en Bimmen. Gegeven is het tijdsverschil tussen de detectie van dezelfde piek op beide locaties.

Datum piek	Gedetecteerd in		Tijdsverschil (uren)
	Bimmen	Nijmegen	
27-9-2020		X	-
28-9-2020	X	X	6,5
29-9-2020		X	-
1/2-10-2020	X		-
8/9-10-2020	X	X	1 dag
23-10-2020	X	X	1,5
25/26-10-2020	X	X	n.v.t.
29-10-2020	X		-
31-10/3-11-2020	X	X	n.v.t.
17-11-2020	X	X	7

Tweewekelijks is op meerdere punten in Bimmen en rondom Nijmegen het aantal *E. coli* bacteriën in de (Spiegel)Waal bepaald met de MPN methode (Figuur 47, Tabel 16). In Figuur 50 zijn de resultaten van de BACTcontrol vergeleken met die van de MPN-methode, verderop wordt in Figuur 54 verder ingezoomd op de individuele BACTcontrol pieken.

Uit Figuur 50 blijkt dat pieken van de BACTcontrol en MPN methode niet altijd overeen komen. Zo zijn er een aantal BACTcontrol-pieken die niet zichtbaar zijn met de MPN methode (b.v. Bimmen: 27-30 augustus, 6 september; Nijmegen: 31 oktober-3 november) en andersom (b.v. Bimmen: 17 augustus, 8, 26 en 29 oktober; Nijmegen: 26 oktober). In het eerste geval (wel BACTcontrol-piek, maar geen MPN-piek) kan dit mogelijk veroorzaakt worden doordat het verschil in meetfrequentie. De BACTcontrol voert elke 2 uur een meting uit, maar met de MPN-methode worden slechts twee metingen per week uitgevoerd. Kortdurende pieken, die tussen twee MPN-meetmomenten vallen, worden dan gemist met de MPN-methode. In het tweede geval (geen BACTcontrol-piek, wel een MPN-piek) gaat het mogelijk om *E. coli* bacteriën die al langer in de Waal aanwezig zijn en 'oud' zijn. Op basis van experimenten in Breda (hoofdstuk 5) bestaat het vermoeden dat oude *E. coli* bacteriën niet (goed) gedetecteerd worden met de BACTcontrol, maar wel met de MPN methode. Dat zou hier een rol kunnen spelen. Dit vermoeden werd echter niet bevestigd in de validatie-experimenten (hoofdstuk 3). Een andere

belangrijke verklaring is dat het meetpunt in Nijmegen (Verkeerspost) wordt beïnvloed door riooloverstorten uit Nijmegen, wat niet het geval is bij Inloop Spiegelwaal (aan de overliggende Oever en stroomopwaarts) en Bimmen.



Figuur 50. E. coli resultaten van de kweek en BACTcontrol nabij Bimmen (boven) en Nijmegen (onder).

Databeschikbaarheid

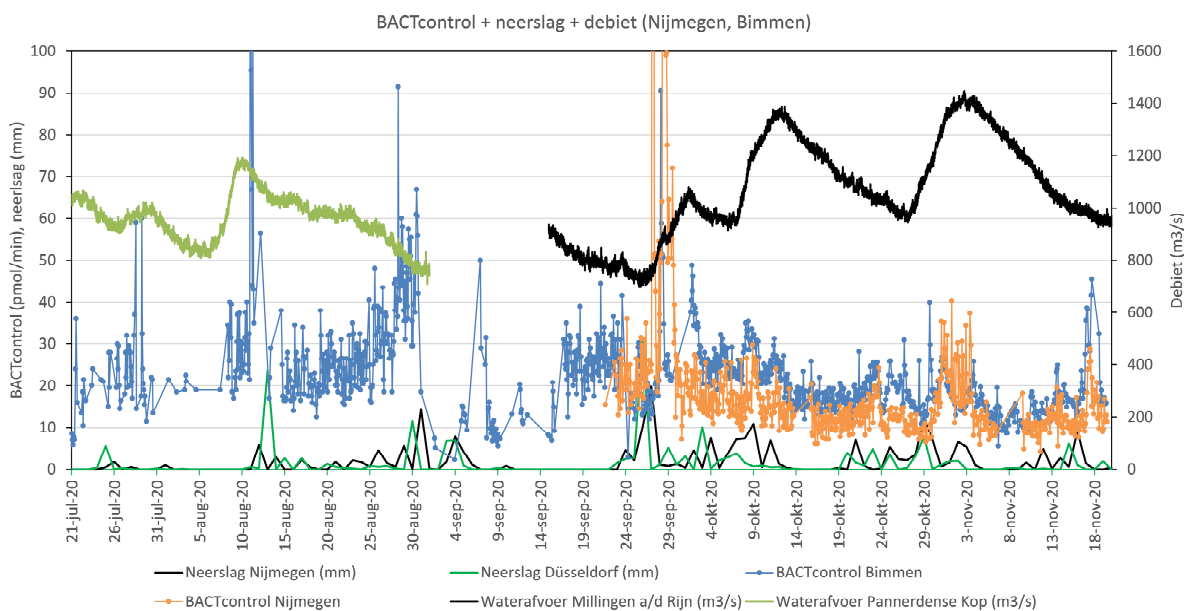
De BACTcontrol kan meten met een instelbare, variabele meetfrequentie. Om pieken te kunnen waarnemen bedraagt het maximale meetinterval 3 uur, hoewel 1,5 uur te verkiezen is. Voor de meetlocaties is geanalyseerd wat de bereikte data opbrengst is. Daartoe is bepaald voor hoeveel blokken van 3 uur wel data beschikbaar is en voor hoeveel dit niet het geval is. Negatieve waarden, nulwaarden of een repetitie van exact dezelfde waarde gedurende meerdere tijdstappen zijn daarbij beschouwd als blokken zonder goede data.

Voor Nijmegen was de data opbrengst 88,7% over de meet periode 18-09 t/m 19-11, en dus vergelijkbaar met de meetopbrengst voor de locatie Breda (hoofdstuk 5). Voor Bimmen was de meetopbrengst met 55,9% (metingsperiode 20-07 t/m 19-11) aanzienlijk lager. Dit betekent dat er aanzienlijke gaten in de tijdreeks zitten die in de toekomst beperkt moeten worden door het optimaliseren van het beheer van de BACTcontrol en het borgen van de datacommunicatie.

6.3.2 Correlatie BACTcontrol met neerslag en afvoer Waal

Fecaal materiaal, en daarmee o.a. *E. coli* bacteriën, komen continu in het oppervlaktewater terecht via het effluent van de rioolwaterzuiveringen. Piekbelasting komt meestal voor na één of meerdere zware regenbuien. Door zware regenbuien kan feces (van b.v. koeien) vanaf het maaiveld naar het oppervlaktewater stromen en kunnen ook de riooloverstorten in werking gaan waardoor ongezuiverd rioolwater op oppervlaktewater wordt geloosd en de fecale belasting in korte tijd erg hoog is. Daarnaast is het zuiveringsrendement van een RWZI lager bij hevige regenval, waardoor ook het effluent hogere waarden heeft.

Om de pieken in *E. coli*-aantallen (MPN-methode) of enzymactiviteit (BACTcontrol) te verklaren, zijn deze resultaten vergeleken met het debiet van de Waal bij Millingen aan de Rijn en de Pannerdense Kop (net bovenstrooms van Bimmen) en met neerslagegegevens van Nijmegen en Düsseldorf (Figuur 51).



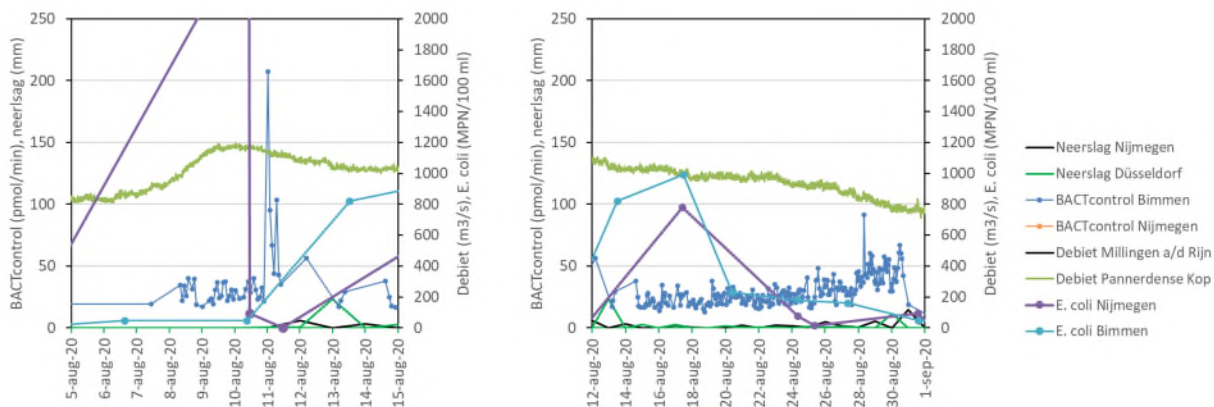
Figuur 51. BACTcontrol-resultaten vergeleken met de waterafvoer van de Waal en neerslag bij Nijmegen en Düsseldorf.

In Figuur 52 - Figuur 54 zijn gedetailleerde grafieken gegeven van de MPN- en BACTcontrol-resultaten bij Bimmen en Nijmegen op de momenten dat één van de metingen korte of lange tijd verhoogd is. Hieronder worden deze pieken kort beschreven.

10-11 augustus: op 10 augustus is er een MPN-piek in Nijmegen, maar zijn er geen metingen beschikbaar van de BACTcontrol in Nijmegen (Figuur 52). Op 11 augustus geeft de BACTcontrol in Bimmen een piek, maar omdat er ook op deze dag geen metingen zijn van de BACTcontrol in Nijmegen kunnen deze niet met elkaar vergeleken

worden. Vlak voor deze verhogingen zijn er geen regenbuien in Nijmegen of bij Düsseldorf gemeten, maar stijgt wel de afvoer van de Waal.

14 – 30 augustus: op 14 en 18 augustus is het *E. coli*-aantal (MPN) twee keer verhoogd in Bimmen en één keer (18 augustus) in Nijmegen (Figuur 52). Vanaf ongeveer 18 augustus stijgt ook langzaam de enzymactiviteit van de BACTcontrol in Bimmen. Van de BACTcontrol in Nijmegen zijn nog geen gegevens voor deze periode. De MPN-pieken van 18 augustus worden mogelijk veroorzaakt door een regenbui in Düsseldorf op 13 augustus, al is niet bekend hoe lang het water erover doet om van Düsseldorf naar Bimmen en Nijmegen te stromen. De langzame maar continue stijging in de BACTcontrol kan niet verklaard worden met de neerslag- en debietgegevens.



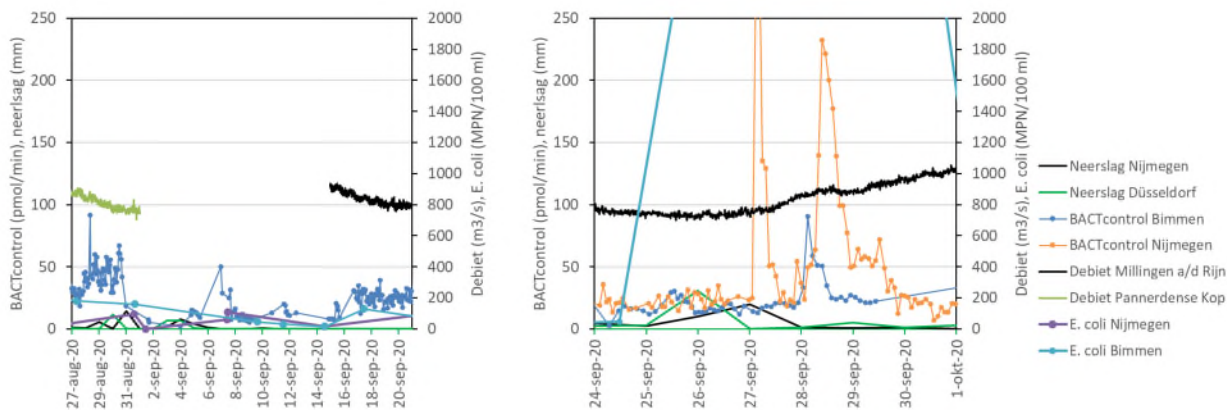
Figuur 52. Omstandigheden tijdens piekmetingen met de BACTcontrol-resultaten bij Bimmen en Nijmegen in de periode 5 augustus – 1 september 2020.

7 september: een (kleine) piek in de enzymactiviteit in Bimmen, maar niet in de MPN resultaten (Figuur 53). Het lijkt onwaarschijnlijk dat de kleine regenbui van 4 september groot genoeg is geweest om deze piek te veroorzaken.

27 september: een piek in enzymactiviteit van ongeveer vier metingen bij Nijmegen, maar niet bij Bimmen (Figuur 53). Vanwege de vorm van de BACTcontrol-piek (snelle stijging, langzamere daling,) gecombineerd met zware regenval op 27 september in Nijmegen, lijkt het hier wel om een echte fecale vervuiling te gaan die niet in Bimmen is gedetecteerd of niet aanwezig was. Op 28 september is ook het MPN resultaat in Bimmen en Nijmegen (valt buiten de grafiek) sterk verhoogd. Mogelijk is hier de zware regenval van 27 september (19,8 mm in Nijmegen) de oorzaak voor de hoge resultaten.

28 – 29 september: Op 28 september is er een piek in de BACTcontrol- en MPN-resultaten in Bimmen, kort daarna gevolgd door een piek in de BACTcontrol en MPN in Nijmegen (valt buiten de grafiek, Figuur 53). Deze pieken volgen elkaar kort op en laten zien dat het om dezelfde fecale besmetting gaat. De 6,5 uur verschil tussen beiden pieken komt ook overeen met de verwachte stroomtijd tussen Bimmen en Nijmegen. Mogelijk wordt deze piek veroorzaakt door de zware regenval op 26 september (Düsseldorf) en 27 september (Nijmegen), met als gevolg een stijging in het debiet van de Waal, al is de tijd tussen regen en het aantreffen van verhoogde aantallen *E. coli* wel lang.

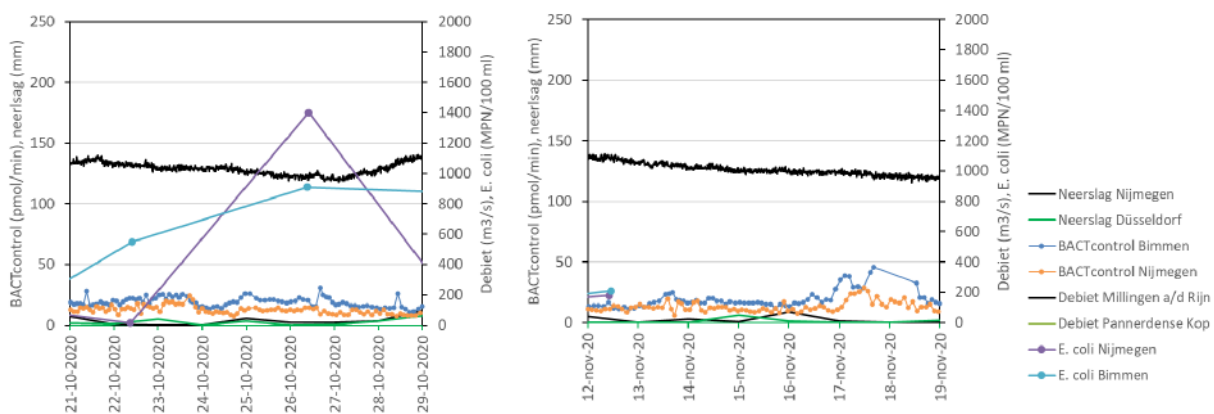
29 september: verhoging in enzymactiviteit in Nijmegen, maar niet in Bimmen (Figuur 53). Van de MPN zijn alleen gegevens van 28 september (hoog MPN). Mogelijk is dit nog de nasleep van de piek op 28 september.



Figuur 53. Omstandigheden tijdens piekmetingen met de BACTcontrol-resultaten bij Bimmen en Nijmegen in de periode 27 augustus – 1 oktober 2020.

25 – 28 oktober: In deze periode is enzymactiviteit van de BACTcontrol-systemen in Bimmen en Nijmegen constant licht verhoogd (ong. 8 – 20 pmol/min, Figuur 54), waarbij de enzymactiviteit in Bimmen hoger is dan in Nijmegen. Dit komt overeen met een verhoogd *E. coli*-aantal. Er is geen duidelijke verklaring voor deze verhoging: het heeft niet noemenswaardig geregend, ook is er geen verandering in het debiet van de Waal. Pas vanaf 27/28 oktober stijgt het debiet snel.

17 – 18 november: Op 17 en 18 november is er verhoogde enzymactiviteit in Bimmen en enigszins in Nijmegen (Figuur 54). Dit kan niet vergeleken worden met MPN-resultaten aangezien die analyse niet uitgevoerd is in deze periode. Het lijkt onwaarschijnlijk dat de lichte regenbuien van 15 en 16 november deze verhoging hebben veroorzaakt.



Figuur 54. Omstandigheden tijdens piekmetingen met de BACTcontrol-resultaten bij Bimmen en Nijmegen in de periode 21 -29 oktober en 12-19 november 2020.

Er zijn verschillende mogelijkheden waarom pieken in Bimmen niet ook in Nijmegen worden gedetecteerd: i) de fecale verontreiniging is inmiddels (te) ver verdund waardoor deze niet meer te onderscheiden is van het achtergrondsignaal of ii) de bacteriën zijn (te) oud waardoor ze in Bimmen nog wel gedetecteerd worden maar in Nijmegen niet meer. Andersom, als de BACTcontrol in Nijmegen wel een piek detecteert, maar de BACTcontrol in Bimmen niet, komt door een verontreiniging die veroorzaakt wordt ergens tussen Bimmen en Nijmegen. Dit kan o.a. zijn: een lozing vanuit het riool(overstort) tussen Bimmen en Nijmegen, een lozing van boten, problemen bij

een RWZI waardoor tijdelijk slechtere effluentkwaliteit, of afspoeling van het land tussen Bimmen en Nijmegen na hevige regenval.

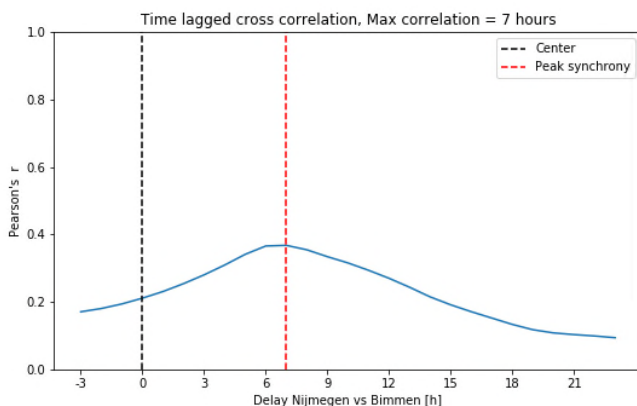
6.3.3 Cross-correlatie tussen BACTcontrol in Bimmen en Nijmegen

De hypothese is dat variaties in de enzymactiviteit, gemeten met de BACTcontrol, in de Waal bij Nijmegen mogelijk te voorspellen zijn aan de hand van metingen bovenstrooms bij Bimmen. Op basis van cross-correlaties is een eerste verkenning gemaakt van de relatie tussen de enzymactiviteit bij Bimmen en bij Nijmegen; en de vertragingstijd tussen deze locaties.

Een cross-correlatie wordt weergegeven in een grafiek met de vertragingstijden op de x-as en de correlatiecoëfficiënt op de y-as. Op basis van de reistijden in de rivier werd een vertraging in de orde van enkele uren verwacht. Daarom zijn vertragingstijden tussen -3 uur (Nijmegen loopt 3 uur vóór) en 23 uur (Nijmegen loopt 1 dag achter) berekend (Figuur 55).

Hieruit blijkt dat de dominante vertragingstijd rond 6-7 uur ligt, maar de correlatiecoëfficiënt van 0,37 is laag. In deze analyse is nog geen rekening gehouden met de autocorrelatie in de reeksen. Voor het inschatten van de werkelijke correlatie en de significantie hiervan moet hiervoor worden gecorrigeerd. Ook kunnen lokale pieken in de reeksen de totale cross-correlatie mogelijk beïnvloeden.

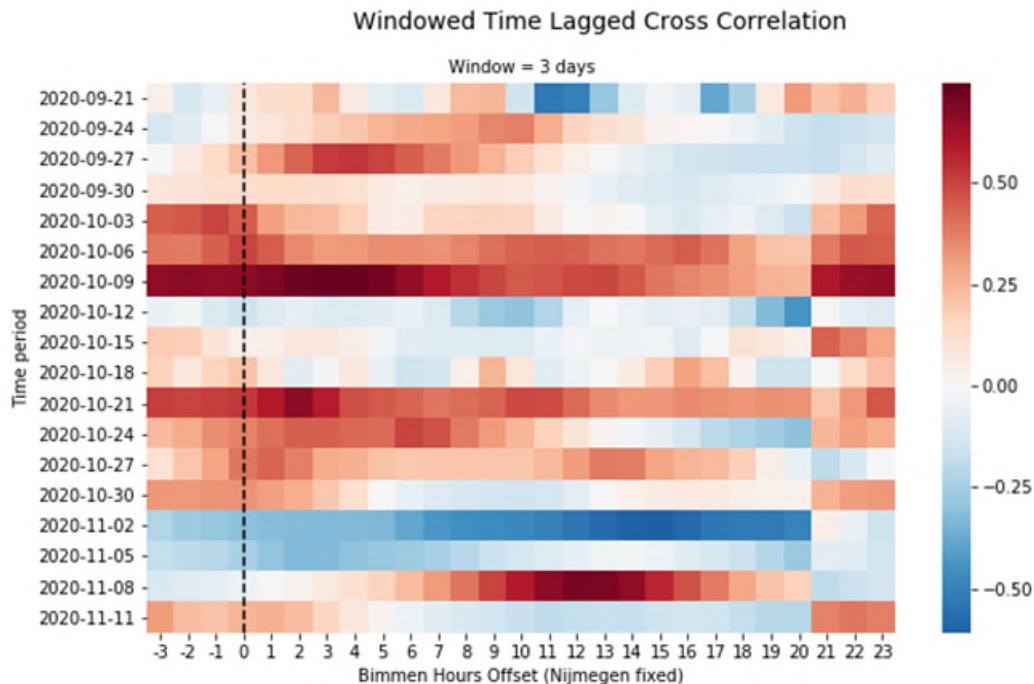
Er zijn ook verkenningen gemaakt van de cross-correlatie met een breder tijdvak (-48 tot +48 uur, resultaten niet getoond in dit rapport). Dit liet ook correlaties zien op -24 uur. Deze correlatie heeft echter geen fysieke betekenis, aangezien het water in de Waal dan van Nijmegen naar Bimmen zou moeten stromen, in plaats van Bimmen naar Nijmegen) wat laat zien dat de aanwezigheid van een correlatie voorzichtig geïnterpreteerd moet worden en (gedeeltelijk) op toeval kan berusten.



Figuur 55. Simpele cross-correlatie.

Omdat de afvoer van de Waal varieert op een tijdschaal in de orde van een week, zijn de 'windowed' cross-correlaties uitgevoerd met tijdstappen van een week (Figuur 57) en van 3 dagen (Figuur 56).

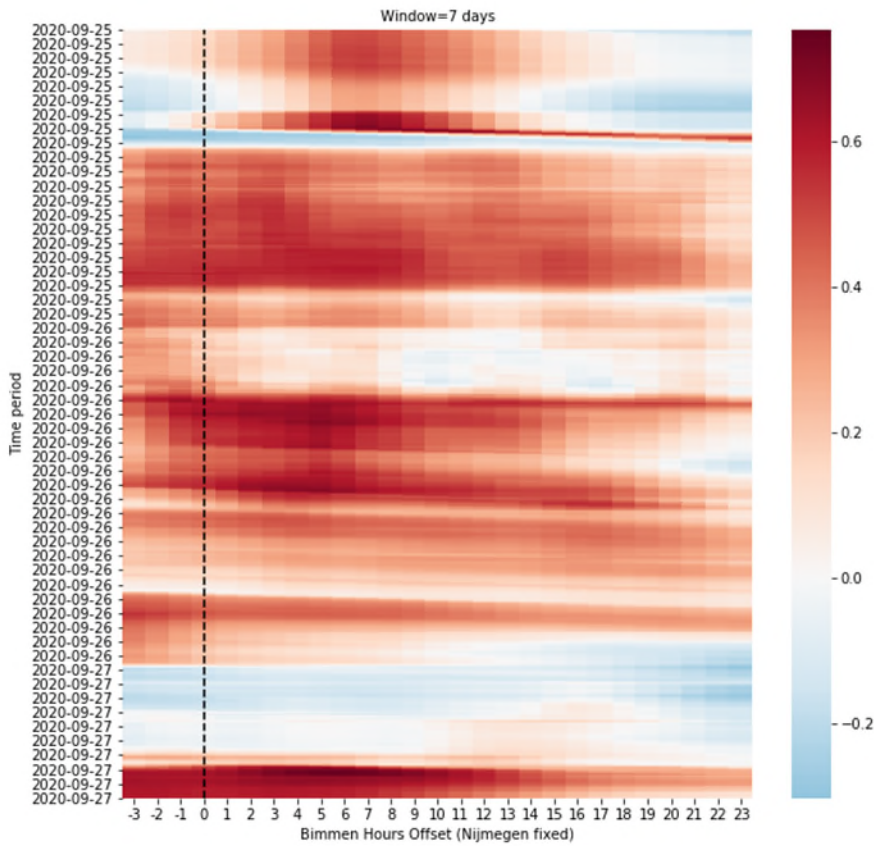
Er is een sterke variatie in de mate van correlatie over de tijd. Ook komen lokaal negatieve correlaties voor (blauw in Figuur 57 en Figuur 56), waarvoor geen verklaring beschikbaar is behalve dat het hier om toeval gaat.



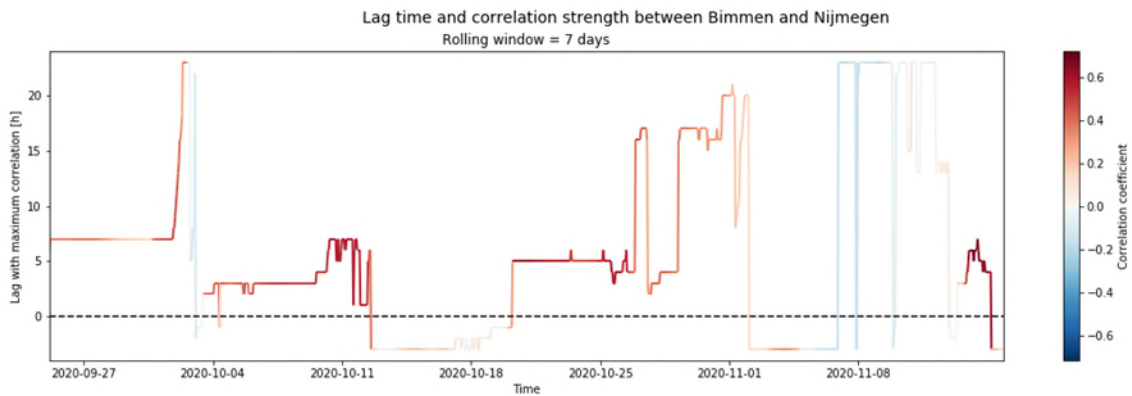
Figuur 56. 'Windowed' cross-correlatie met tijdstappen van 3 dagen. Tijd van boven naar beneden op de y-as (gegeven is de datum), vertragingstijden tussen de twee reeksen (Bimmen vergeleken met Nijmegen) op de x-as. De kleur geeft de mate van correlatie weer. Rood = sterke positieve correlatie, blauw = sterke negatieve correlatie, wit = geen correlatie.

Bij een 'rolling window' cross-correlatie wordt het tijdsinterval waarover de correlaties worden berekend telkens één tijdstap naar voren verschoven, waardoor een meer geleidelijk beeld ontstaat (Figuur 57). De resultaten van de verkennende 'rolling window' cross-correlatie zijn samengevat in Figuur 58. De lijn geeft aan bij welke vertragingstijd de correlatie het sterkst is (y-as) en de kleur geeft de sterkte van deze correlatie aan. Een hoge waarde op de y-as betekent b.v. dat de vertraging tussen beide BACTcontrol-resultaten hoog is (15 – 20 uur). Hier zijn de vertragingstijden beperkt tot de fysiek logische range (ongeveer 0 tot 24 uur vertraging tussen Bimmen en Nijmegen). De hoogste correlaties (oranje-rode lijn) liggen tussen zo'n 1 en 10 uur vertraging en zijn vrij lokaal (Figuur 58). Om een volledig beeld te krijgen van de mogelijkheid om de waarden bij Nijmegen te voorspellen op basis van de metingen bij Bimmen is een uitgebreidere correlatie/regressieanalyse nodig die deze factoren (en mogelijk externe invloeden) meeneemt. Om echter goede resultaten uit een dergelijke correlatie/regressieanalyse te krijgen, zijn er meer grote of duidelijke pieken nodig in beide datasets waarop een cross-correlatie uitgevoerd zou kunnen worden.

Windowed Time Lagged Cross Correlation



Figuur 57. 'Rolling window' cross-correlatie met een tijdstap van 7 dagen. De analyse van de eerste drie dagen is hier weergegeven ter illustratie. De resultaten van de verkennende rolling window cross-correlatie zijn samengevat in Figuur 58.



Figuur 58. Optimale vertragingstijd en correlatiecoëfficiënt (Pearson's r) over de tijd op basis van rolling window cross-correlatie met een tijdstap van 7 dagen.

6.4 Ervaringen Rijkswaterstaat-Oost

Er is een mooie pilot uitgevoerd met twee BACTcontrol systemen in de hoop zo de pieken van fecale verontreiniging tijdig te kunnen detecteren.

Helaas bleek deze methode niet geschikt om alle pieken van verontreinigingen te kunnen detecteren, vooral 'oudere' verontreinigingen werden niet gedetecteerd.

Wel heeft deze pilot de partners veel geleerd over de dynamiek van verontreinigingen in de Waal.

De ervaring was waardevol en het was prettig samen te werken met alle betrokken partijen.

6.5 Conclusie

De twee BACTcontrols-systemen in Bimmen en Nijmegen geven voor sommige pieken dezelfde trends in enzymactiviteiten. Echter, niet alle pieken in enzymactiviteit in Nijmegen worden ook in Bimmen gezien en pieken die wel in Bimmen worden gemeten worden niet altijd in Nijmegen gezien.

Dat maakt dat de BACTcontrol niet als volledig early warning systeem kan worden gebruikt om de Spiegelwaal af te sluiten op basis van metingen in Bimmen.

Daarnaast komen de verhogingen van de enzymactiviteit slechts enkele keren overeen met hogere *E. coli*-aantallen met de MPN-methode. Het anders positioneren van de monstername locatie in Nijmegen zou een meer betrouwbaar beeld kunnen opleveren. De BACTcontrol stond aan de andere oever van de Waal dan de Spiegelwaal ligt, terwijl het meetpunt voor MPN juist wel bij de Spiegelwaal ligt.

Verhogingen met de BACTcontrol die in Bimmen worden aangetroffen maar niet in Nijmegen, komt vermoedelijk omdat de afstand tussen de besmettingslocatie en de BACTcontrol vrij groot is, en er daardoor te vaak oude *E. coli* bacteriën langs komen die niet met de BACTcontrol worden gedetecteerd.

Vergelijking van de MPN- met de BACTcontrol-resultaten laat zien dat *E. coli*-pieken zeer kort kunnen zijn en worden daardoor niet altijd, of meestal niet, gedetecteerd met de MPN-methode die op officiële zwemwaterlocatie 1x per 2 weken wordt uitgevoerd. Met de BACTcontrol is de kans dat je deze korte pieken wel detecteert groter. Dat maakt dat de BACTcontrol extra informatie kan geven. Zeker in geval van grote pieken bij Bimmen is een verhoogde fecale verontreiniging enkele uren later bij de Spiegelwaal / Nijmegen waarschijnlijk. Optimalisatie van het monitoringsplan zou hier verdere duidelijkheid in kunnen geven. Zo kan bijvoorbeeld ook mobiele qPCR worden ingezet om snel en flexibel metingen uit te voeren rondom een (vermoedelijke) piekconcentratie in fecale verontreiniging.

7 Monitoring zwemwater Marineterrein Amsterdam

Samenvatting

Bij het Marineterrein in Amsterdam wil men een officiële zwemwaterlocatie realiseren, alleen is de microbiologische waterkwaliteit niet altijd goed genoeg. Om inzicht te krijgen in de variatie van de waterkwaliteit en om een early-warning systeem te ontwikkelen om maatregelen te treffen als het aantal *E. coli* en/of intestinale enterococci bacterie-aantallen te hoog zijn, is er in de zomer van 2021 een pilot onderzoek uitgevoerd met een BACTcontrol systeem die automatische de aantallen *E. coli* en intestinale enterococci kan monitoren. Parallel zijn er metingen met MPN uitgevoerd als validatie van de BACTcontrol metingen, en zijn neerslaggegevens verzameld en vergeleken met eventuele piek-concentraties van *E. coli*. In de periode eind juni t/m eind september is met de MPN methode één keer een overschrijding van de signaalwaarde voor geconstateerd en tijdens drie piek-momenten de grens van “uitstekende” kwaliteit overschreden voor *E. coli* en één keer voor intestinale enterococci. De toename van *E. coli* kon worden gerelateerd aan momenten van neerslag.

Door diverse oorzaken zijn er tijdens drie periodes van enkele weken data met de BACTcontrol verzameld. Deze momenten vallen niet samen met de piekmomenten die met de MPN methode zijn gevonden, waardoor er geen uitspraak kan worden gedaan over de overeenkomst tussen *E. coli* MPN en de BACTcontrol. Wel is er praktische ervaring opgedaan met het inrichten en opzetten met een early-warning systeem bij het Marineterrein.

7.1 Inleiding

7.1.1 Aanleiding

Bij het Marineterrein in het centrum van Amsterdam wordt veel gezwommen, maar het is geen officiële zwemlocatie. Bij Waternet en het Projectbureau Marineterrein is er wel de wens om hier in de toekomst een officiële zwemlocatie van te maken. Eén van de hindernissen hiervoor is dat de microbiologische waterkwaliteit van het water (op basis van *E. coli* en intestinale enterococci) momenteel nog niet goed genoeg is. De afgelopen en komende jaren is daarom met meerdere methoden het zwemwater gemeten om meer inzicht te krijgen in de waterkwaliteit en hoe deze varieert gedurende het zwemseizoen en hoe de waterkwaliteit eventueel verbeterd kan worden.

7.1.2 Doel

In dit project was het doel van Waternet om:

- Inzicht te krijgen in de microbiologische variatie en dynamiek in het zwemwater van het Marineterrein,
- Te testen met een early warning syteem dat kan waarschuwen bij overstorten of anderszins te hoge fecale belasting van het zwemwater,
- (Semi-) real-time meekijken en acteren op hoge *E. coli*-aantallen in het water.

7.2 Meetprogramma en dataverwerking

7.2.1 Monitoringsprogramma

In de zomer van 2021 zijn op het Marineterrein meerdere metingen uitgevoerd:

- *E. coli* enzymactiviteit met de BACTcontrol in de meetcontainer aan de noordkant van het Marineterrein (Figuur 60, Figuur 71)
- *E. coli* en intestinale enterococcen met de MPN-methode (uitgevoerd door Waterproef)
- Neerslag op gebouw 002 aan de zuidkant van het Marineterrein (Figuur 60)



Figuur 59. Plattegrond van het Marineterrein met daarop aangegeven de meetcontainer met de BACTcontrol en de locatie van de regensensor op gebouw 002. Met de rode cirkel is de locatie van de overstort aangegeven.



Figuur 60. Container met BACTcontrol op het Marineterrein. Op de linkerfoto is de aanvoerslang naar het zwemwater onder de zwarte matten zichtbaar.

Met een pomp wordt continu water uit de zwemplas naar de meetcontainer gepompt. In de container staat een vat dat continu wordt verversd en waarvan het water terug wordt gevoerd naar de zwemplas. Vanuit dit vat worden door monsternemers van Stichting Waterproef 2x per week op maandag en woensdag watermonsters

genomen voor *E. coli* en intestinale enterococcon-metingen met de MPN-methode conform de Zwemwaterriichtlijn (Tabel 18). De BACTcontrol neemt ook uit dit overloopvat water in voor analyse van de enzymactiviteit.

Daarnaast staat op gebouw 002 een regensensor waarmee naast de neerslaghoeveelheid onder andere ook de luchttemperatuur elke 5 minuten wordt gemeten.

Tabel 18. Monitoringsprogramma Marineterrein Amsterdam van juni – oktober 2021.

Methode	Frequentie
<i>E. coli</i> MPN	2x per week (maandag en woensdag)
Int. Enterococcon MPN	2x per week (maandag en woensdag)
BACTcontrol	Elke 2 uur (13-14x per dag)
Luchttemperatuur	Elke 5 minuten
Neerslag	Elke 5 minuten

7.2.2 Dataverwerking

De BACTcontrol dataset is opgeschoond door de volgende metingen te verwijderen:

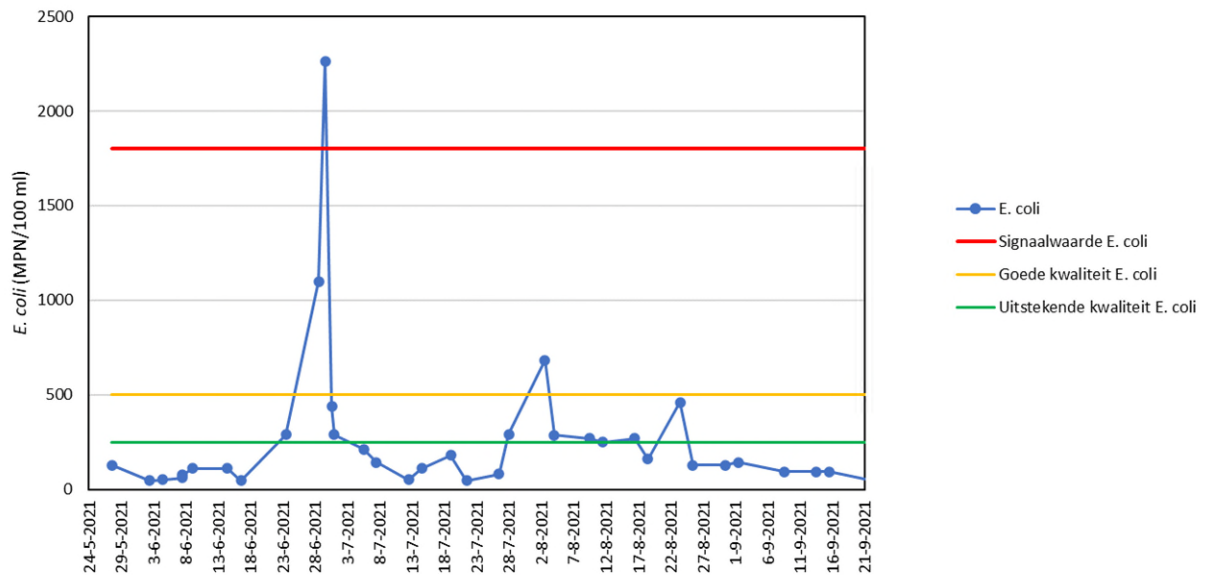
- Metingen met als resultaat 0 pmol/min, dit wordt veroorzaakt als het BACTcontrol systeem om een of andere reden geen water kan innemen. Een andere mogelijkheid is een storing in het systeem.
- ‘1-punts pieken’. Dit zijn resultaten waarbij er één (zeer) hoge meting is, voorafgegaan en gevolgd door een reeks min of meer stabiel lage metingen. Het is zeer onwaarschijnlijk dat dit een echte verhoging in het aantal *E. coli* bacteriën is, maar eerder dat dit b.v. veroorzaakt wordt door een moeilijke watermatrix (troebel) of andere fouten tijdens meten.

De neerslag is elke 5 minuten gemeten, maar voor verwerking van de resultaten is de totale neerslag per dag berekend. Voor de luchttemperatuur is het gemiddelde per dag berekend.

7.3 Resultaten en discussie Marineterrein

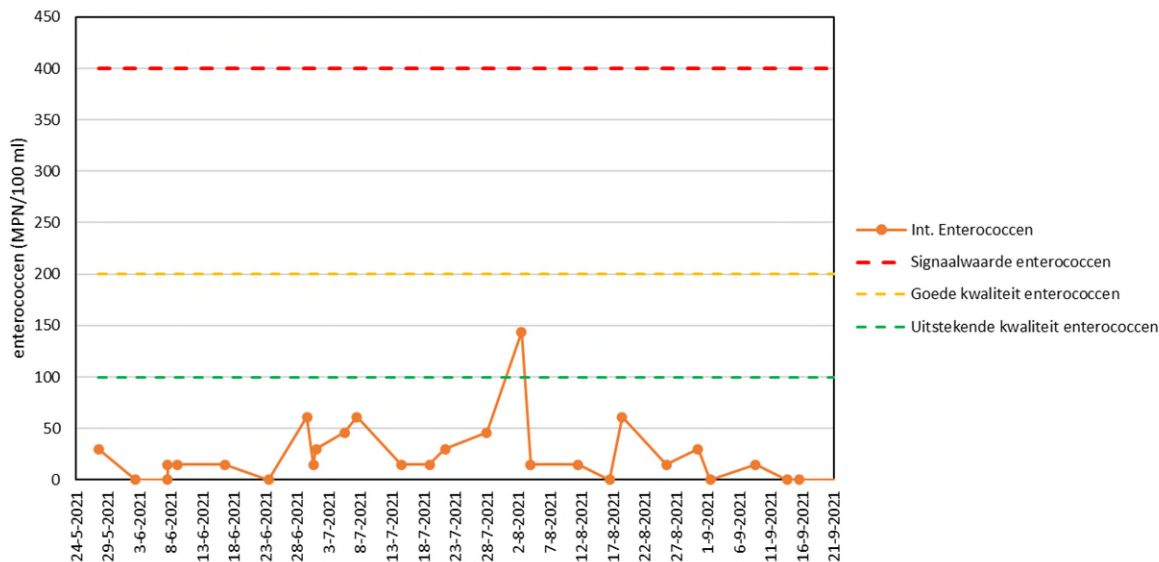
7.3.1 *E. coli* en int. enterococcon

De resultaten van de *E. coli* analyse staan in Figuur 61. Gedurende de meetperiode is er één keer een overschrijding van de signaalwaarde (2263 MPN/100 ml op 29 juni 2021), twee keer overschrijding van goede kwaliteit (1100 MPN/100 ml op 28 juni 2021 en 683 MPN/100 ml op 2 augustus 2021) en acht keer overschrijding van uitstekende kwaliteit (23 en 30 juni 2021, 1 en 28 juli 2021, 4, 8, 16 en 23 augustus 2021).



Figuur 61. Concentratie *E. coli* (MPN/100 ml) in het water van het Marineterrein gedurende de meetperiode in zomer 2021.

De resultaten van int. enterococcon analyse staan in Figuur 62. Gedurende de meetperiode zijn er geen overschrijdingen van de signaalwaarde en goede kwaliteit. Er is één keer overschrijding van de uitstekende kwaliteit (144 MPN/100 ml op 2 augustus 2021).



Figuur 62. Concentratie intestinale enterococcen (MPN/100 ml) van het water van het Marineterrein gedurende de meetperiode in zomer 2021.

Er is één gelijktijdige verhoging in zowel de *E. coli* als de int. enterococcen meetreeks (2 augustus 2021). In tegenstelling tot eerdere jaren, waarbij de fecale belasting van het Marineterrein hoog was, is dat in de zomer van 2021 dus slechts in zeer beperkte mate het geval. Het lage aantallen *E. coli* en intestinale enterococcen maakt vergelijking van de MPN-getallen met de BACTcontrol lastig. Idealiter zijn hiervoor enkele piekmomenten nodig, welke nu nagenoeg afwezig zijn.

7.3.2 BACTcontrol

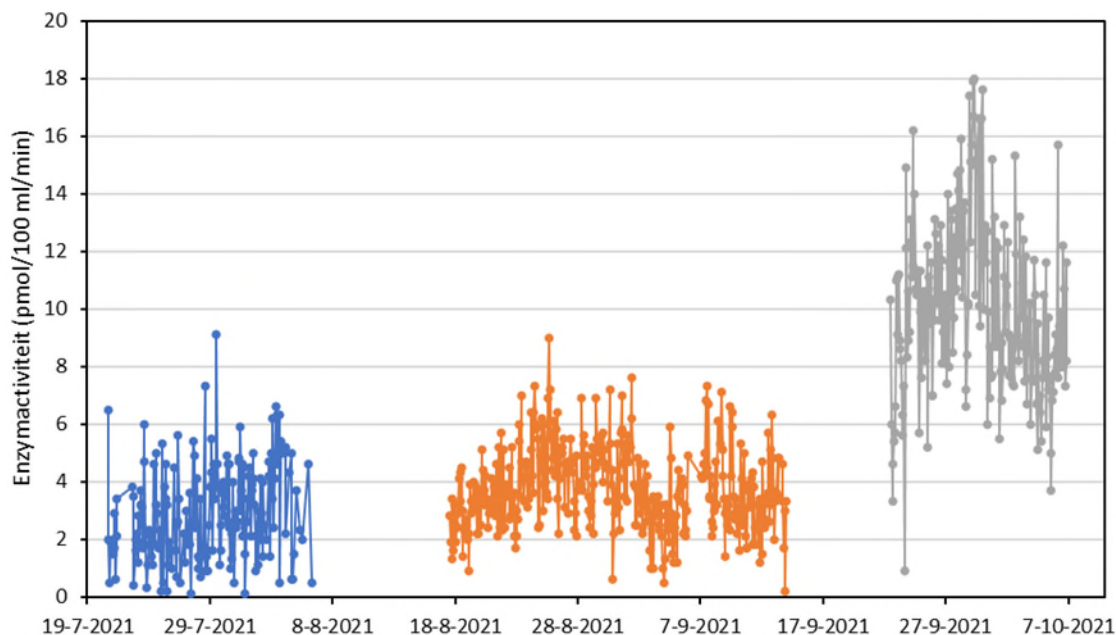
Van eind juni tot eind oktober heeft de BACTcontrol het water van het Marineterrein gemeten (Figuur 63), gedurende deze tijd zijn er, door verschillende oorzaken, van vier periodes geen (betrouwbare) resultaten beschikbaar (Tabel 19). Samen met microLAN is bepaald welke analysesresultaten als wel of niet betrouwbaar kunnen worden beschouwd. Van 25 juni tot 19 juli functioneerde de pomp die het water van het Marineterrein naar de BACTcontrol pompt niet goed. De oorzaak van de onbetrouwbare metingen van 6 – 17 augustus is onbekend. Van 14 tot 22 september heeft een te lage temperatuur geleid tot stolling van de reagentia en konden deze niet worden opgezogen in de BACTcontrol. Hierdoor waren er geen metingen mogelijk.

Daarnaast is gevarieerd met het wel of niet plaatsen van een filter in de BACTcontrol om zo grotere volumes te kunnen meten, maar ook een grotere kans te hebben op verstopping van het filter.

Tabel 19. BACTcontrol meetperiodes en betrouwbaarheid.

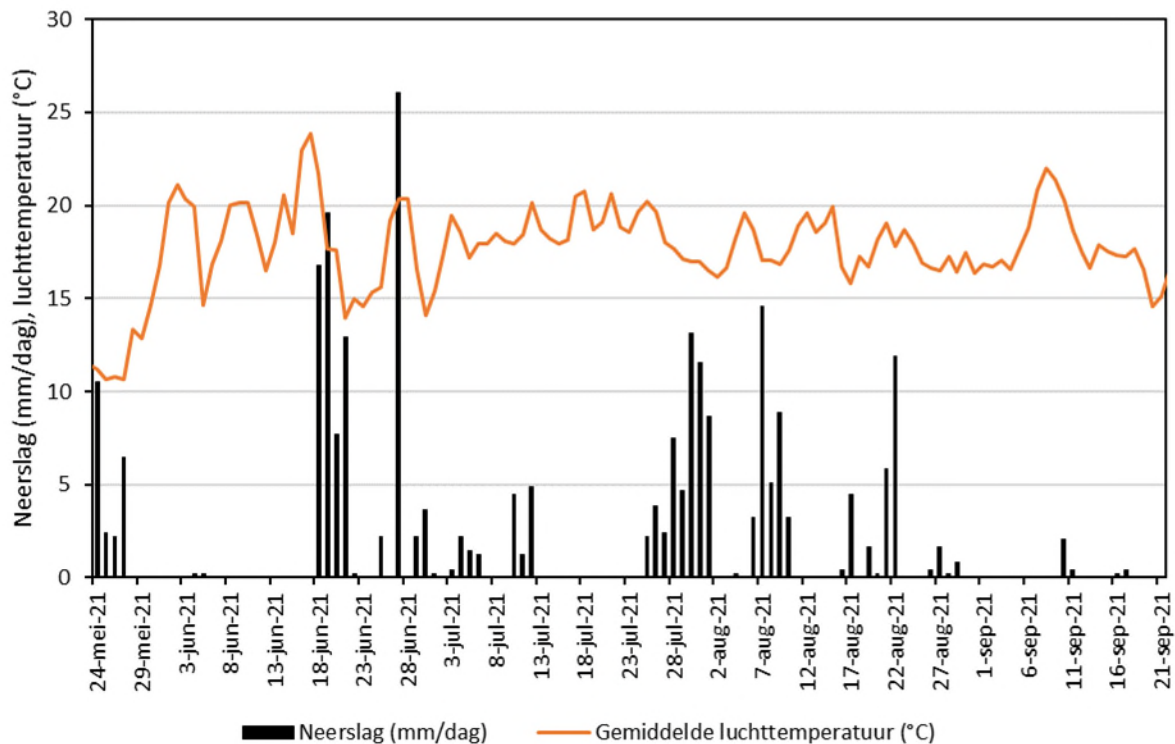
Periode	Betrouwbaarheid	Probleem
25 juni – 19 juli	Fout	Pomp defect
20 juli – 6 augustus	Goed (geen filter)	
6 – 17 augustus	Fout	Oorzaak onbekend
18 augustus – 13 september	Goed (met filter), exclusief 6 september	
14 – 22 september	Fout	Te koud
23 september – 6 oktober	Goed (met filter)	
7 – 21 oktober	Fout	Verstopt filter

De resultaten van de BACTcontrol laten weinig echte pieken zien. De resultaten van september en oktober laten een verhoogd signaal zien t.o.v. de andere maanden. Dit verhoogde signaal komt doordat er een overstort 4 dagen heeft aangestaan (29 september 2021 – 2 oktober 2021, voor de locatie van de overstort ten opzichte van de BACTcontrol zie Figuur 59). Tijdens de periode 20 juli – 6 augustus heeft er geen filter in het systeem gezeten. Dit heeft tot gevolg dat er een hogere detectiegrens is dan als er wel een filter in het systeem zit en een groter volume geanalyseerd kan worden.



Figuur 63. BACTcontrol resultaten van het water van het Marineterrein gedurende de meetperiode in zomer 2021. In Tabel 19 is aangegeven voor welke perioden een betrouwbaar resultaat is verkregen. De onbetrouwbare meetresultaten zijn niet weergegeven in deze grafiek.

In Figuur 64 is de neerslag en gemiddelde temperatuur te zien van de meetperiode. Het is een natte en koele zomer geweest met weinig hoosbuien met een gemiddelde temperatuur van 15-20 °C. Er waren eind juni, eind juli en eind augustus wat regenbuien. Maar dit waren continue regen buien, en geen hoosbuien. Waardoor er ook weinig kans op riooloverstorten was.

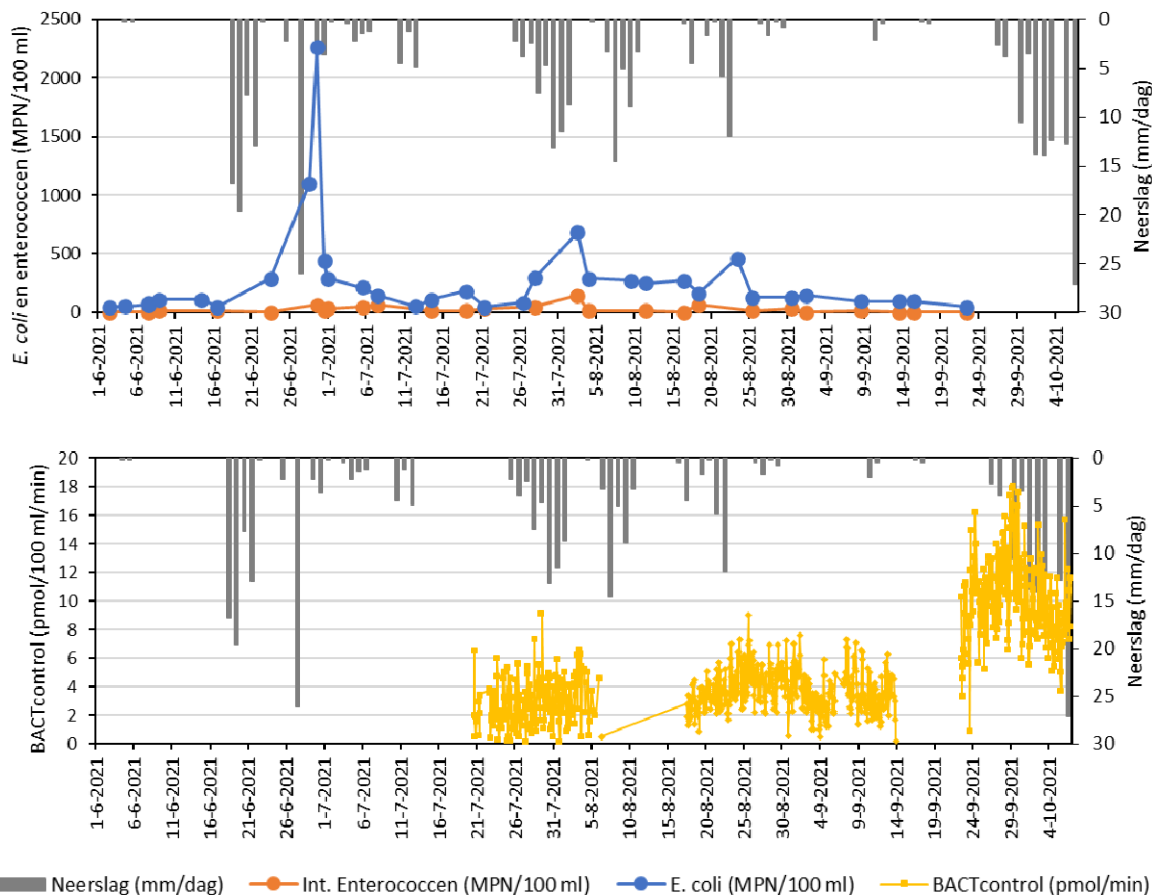


Figuur 64. Neerslag (mm/dag) en luchttemperatuur (°C) resultaten Marineterrein gedurende de meetperiode in zomer 2021.

Figuur 65 laat het effect van de neerslag zien op de *E. coli* en int. enterococcon metingen: in enkele gevallen leidt de regen tot verhoogde *E. coli* MPN resultaten, maar vaak is er ook geen duidelijk effect zichtbaar.

- De twee pieken in neerslag (18 en 19 juni) laten ook een toename in *E. coli* aantallen zien.
- De hoge neerslag piek (27 juni) daarna geeft ook een sterk verhoogde *E. coli* concentratie.
- Begin augustus was er ook wat meer regen en dat is ook terug te zien in de *E. coli* resultaten.

De neerslag heeft nauwelijks effect op de int. enterococcon resultaten.



Figuur 65. Vergelijking van (boven) *E. coli*, int. enterococcen en neerslag (mm/dag) resultaten en de (onder) BACTcontrol (pmol/min/100 ml) en neerslag (mm/dag) resultaten van het Marineterrein gedurende de meetperiode in zomer 2021.

Vergelijking van de neerslag en BACTcontrol data in één figuur (Figuur 65), laat zien dat de neerslag nauwelijks tot geen effect heeft op het BACTcontrol signaal. Waar begin augustus wel effect werd gezien bij *E. coli* is dit niet terug te zien bij BACTcontrol. Mogelijk wordt dit veroorzaakt doordat er toen geen filter in de BACTcontrol zat en het kleine analysevolume voor een te hoger detectiegrens heeft gezorgd. In augustus en september is verder weinig regen gevallen. In oktober wordt de verhoging in BACTcontrol resultaten veroorzaakt door een riooloverstort op het Marineterrein die door een defecte pomp vier dagen (29 september 2021 tot 2 oktober 2021) heeft aangestaan. Aangezien dit buiten het zwemseizoen valt, zijn er in deze periode geen MPN-metingen uitgevoerd in opdracht van Waternet. De BACTcontrol-verhoging kan dus niet vergeleken worden met MPN-resultaten.

Vergelijking van alle resultaten met elkaar laat zien dat een regen piek op 18 juni zorgt voor een (lichte) stijging van het aantal *E. coli* op 23 juni. Door een communicatiefout is er geen kweek monster genomen op 21 juni. Het is daardoor onduidelijk wat het directe effect van de regenbui was op de *E. coli* en int. enterococcen resultaten. De regenbui op 27 juni heeft een sterke stijging in de aantallen van *E. coli* tot gevolg. Rond 30 juli is er regen en er wordt een (lichte) stijging in de *E. coli* aantallen waargenomen, maar geen BACTcontrol verhoging. De regenbui van 7 augustus laat een verhoging zien in *E. coli* aantallen daarna tot 16 augustus. De regenbui van 22 augustus laat ook weer een (lichte) stijging zien in *E. coli* aantallen en dit keer is het BACTcontrol signaal ook iets verhoogd. Het signaal van BACTcontrol blijft daarna wat verhoogd maar de MPN aantallen niet. In oktober is het BACTcontrol signaal continue verhoogd, dit kwam door de overstort op het Marineterrein. De MPN monsternamen waren toen net gestopt en er is verder geen onderhoud (zoals vervanging van filters) gedaan op de BACTcontrol.

7.3.3 Semi real-time monitoring

Bij de start van het project was het doel dat Waternet en de Stichting Marineterrein real-time zouden kunnen meekijken met de resultaten van de metingen. De bezoekers van het Marineterrein zouden semi real-time mee kunnen kijken doordat de BACTcontrol- en MPN-resultaten twee tot vierwekelijks geüpload zouden worden naar een dashboard dat op de informatieborden op het Marineterrein getoond zou worden.

Door verschillende redenen is dit niet gelukt. Door de problemen met een defecte pomp aan het begin van de meetreeks, heeft het werk aan het dashboard op een laag pitje gestaan. Daarna is in overleg met de projectpartners besloten om het dashboard niet verder op te zetten, redenen hiervoor waren o.a. het uitblijven van hoosbuien, overstorten of andere pieken in *E. coli*-aantallen en dat het lastiger was dan gedacht om de verschillende databestanden geschikt te maken voor plaatsing op een dashboard.

Voor de BACTcontrol is bepaald voor hoeveel blokken van 3 uur wel data beschikbaar is en voor hoeveel dit niet het geval is. Negatieve waarden, nulwaarden of een repetitie van exact dezelfde waarde gedurende meerdere tijdstappen zijn daarbij beschouwd als blokken zonder goede data. Voor de metingen aan het Marineterrein is de databeschikbaarheid 43,6% over de periode 20-07 t/m 21-10, en daarmee lager dan voor de locaties Breda (hoofdstuk 5), Nijmegen en Bimmen (hoofdstuk 6).

7.4 Ervaringen Waternet, Marineterrein en microLAN

Tijdens een evaluatie van de meetperiode op het Marineterrein zijn door de betrokken partijen de volgende punten benoemd:

- Waternet: het was een interessant project om met alternatief microbiologische methode te meten (BACTcontrol). Daarnaast was het voor Waternet zelf ook erg interessant om de MPN-metingen hoog frequenter uit te voeren en zo meer inzicht te krijgen in de variatie in de microbiologische waterkwaliteit van het Marineterrein. Dit project en het Marineterrein waren voor Waternet een proeftuin, het Marineterrein wordt voorlopig nog geen officiële zwemlocatie. Hoog frequenter meten was al langere tijd een wens van Waternet. Helaas zijn er weinig hoosbuien gevallen en hebben we de resultaten van de eerste hoosbui niet optimaal kunnen benutten omdat in die periode de BACTcontrol geen betrouwbare meting heeft uitgevoerd.
Vanuit de praktische kant was het aardig wat regelwerk om de container met BACTcontrol op het Marineterrein te krijgen en de monsternamen door Waterproef aangepast te krijgen. Voor het plaatsen van de container was het ook lang onduidelijk of er wel of niet een vergunning nodig was.
- Stichting Marineterrein: Na wat opstartproblemen verliep de praktische samenwerking prima. Goed contact met de projectpartners in de voorbereiding en gedurende de meetperiode.
- microLAN: we hadden gehoopt op meer *E. coli* pieken door hoosbuien, zoals we die wel in Breda hebben gezien (hoofdstuk 5). Praktisch gezien liep het goed op het Marineterrein. Van deze pilot locatie heeft microLAN geleerd dat het makkelijker moet zijn om de BACTcontrol te plaatsen en uit te lezen. microLAN kijkt nu naar een minicontainer, zodat alles door hun geïnstalleerd kan worden en daarna makkelijk op locatie geplaatst kan worden. Door een minicontainer te gebruiken sta je dicht bij het water en hoeft er geen vergunning geregeld te worden.

7.5 Conclusie

De zomer van 2021 was een relatief koele zomer met veel regen, maar met weinig hoosbuien op het Marineterrein.

Door het gebrek aan hoosbuien, en daarmee overstorten, zijn er ook nauwelijks hoge *E. coli* MPN-aantallen gemeten en is er slechts één grote *E. coli* MPN piek gedetecteerd. Ten tijde van deze piek was de BACTcontrol buiten bedrijf waardoor de MPN-piek niet met een eventuele BACTcontrol-piek vergeleken kan worden.

Omdat er geen pieken met beide methoden (MPN en BACTcontrol) tegelijkertijd zijn gemeten, kan er geen uitspraak worden gedaan over de overeenkomst tussen *E. coli* MPN en de BACTcontrol bij het Marineterrein.

Voor een eventueel vervolg, om MPN en BACTcontrol in de praktijk met elkaar te vergelijken, zal het onderzoek bij een locatie met een grotere fecale belasting beter uit te voeren zijn. Bij Waternet zou b.v. het Slotterstrand een optie kunnen zijn. Een aandachtspunt is dat goed op elkaar afstemmen van MPN metingen en BACTcontrol analyse essentieel is om een goed vergelijk te kunnen maken.

Het (semi-) real-time inzicht in de BACTcontrol en MPN-resultaten voor de projectpartners en de gebruikers van het Marineterrein is door verschillende omstandigheden niet gelukt.

8 Evaluatie geschiktheid en toepassing snelle detectie *E. coli* voor monitoring zwemwateren

8.1 Vergelijking toepassing BACTcontrol op drie locaties

Bij de BACTcontrol pilot in Breda werd gevonden dat als er meer dan 20 mm regen valt er een riooloverstort volgt en daardoor ook een verhoging van het BACTcontrol signaal (>75 pmol/min), waarbij de kans erg groot is dat het *E. coli* MPN aantal boven de 1800 MPN/100 ml uitkomt. De kanttekening bij de situatie in Breda is wel dat de BACTcontrol daar in een gracht/singel staat en in de directe invloedssfeer van een stroomopwaarts gelegen overstort. Er wordt tevens gezien dat met BACTcontrol een relatief snelle toename en afname van het signaal wordt waargenomen, terwijl met de MPN methode de invloed van de overstort langer wordt gemeten.

Op het Marineterrein zijn geen hoosbuien geweest op het moment dat de BACTcontrol aan stond. Eind september viel de pomp uit bij het riool op het Marineterrein en stond de overstort continue aan. Het basissignaal van de BACTcontrol ging daardoor van 5 naar 20 pmol. Het rioolwater lijkt dus wel gemeten te worden door de BACTcontrol, echter tijdens de pilot op het Marineterrein niet als een korte piek maar als een continue verhoogde waarde door de continue overstort. Net als in Breda is de ligging en het open staan van een riool overstort erg belangrijk voor de BACTcontrol metingen.

In de Spiegelwaal is twee maal een BACTcontrol-piek gemeten vlak na zware regenbuien (15-20 mm) bij Nijmegen en Düsseldorf. De afzonderlijke beïnvloeding van de twee BACTcontrol systemen door meerdere bronnen en diverse reistijden, maakt dat het niet zondermeer geschikt is om bij Bimmen als early-warning systeem te dienen om op tijd de Spiegelwaal af te kunnen sluiten bij een piek bij Bimmen. Grote pieken bij Bimmen duiden echter op een flinke fecale belasting van het Waal-water die bij Nijmegen terug gemeten kunnen worden.

8.2 Alarmwaarde BACTcontrol

Bij gebruik van de BACTcontrol is het belangrijk om alarm- of grenswaarden te kennen. Hiermee kan vastgesteld worden welke waarde te hoog is en er actie moet worden ondernomen.

Een alarmwaarde bepalen kan op verschillende manieren:

1. Het gemiddelde plus drie keer de standaarddeviatie ($3 \times SD$), zoals in eerder in wetenschappelijke artikelen is gebruikt [19]. Op deze manier kan een relevante verhoging van de enzymactiviteit ten opzichte van het achtergrondsignaal worden bepaald. Een verhoging van een bepaald aantal pmol/min (voor de BACTcontrol) of een bepaalde vermenigvuldigingsfactor zou hiervoor gebruikt kunnen worden.
2. Een bepaalde percentielwaarde kiezen, b.v. het 99-percentiel. Dat betekent dat 1% van alle metingen boven de alarmwaarde uitkomen.
3. Tijdens validatie-experimenten testen welke enzymactiviteit verwacht kan worden bij een bepaald aantal *E. coli* bacteriën (MPN/100 ml).

Voor alle drie deze methoden zijn argumenten voor en tegen aan te voeren om te gebruiken, die hieronder kort worden besproken.

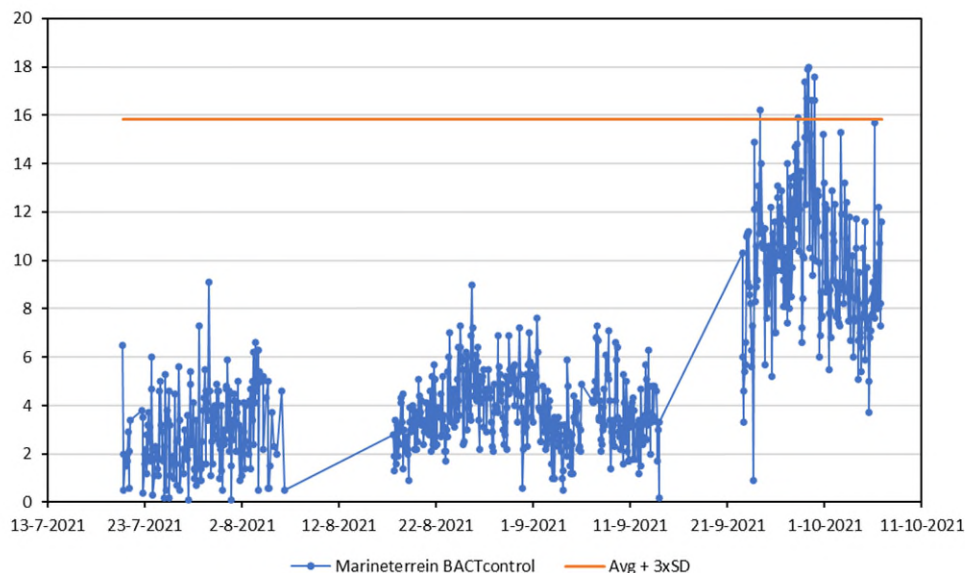
8.2.1 Average + 3x SD

Het vaststellen van een alarmwaarde op basis van de achtergrondwaarde heeft als voordeel dat variatie van het basissignaal door lokale omstandigheden wordt meegewogen. Wel is het moeilijk om een generieke alarmwaarde af te leiden waarbij meerdere locaties onderling kunnen worden vergeleken, als de onderlinge variatie vrij groot is. Dit wordt zichtbaar als we bijvoorbeeld de gegevens van het basissignaal bij Marineterrein en Nijmegen met elkaar vergelijken.

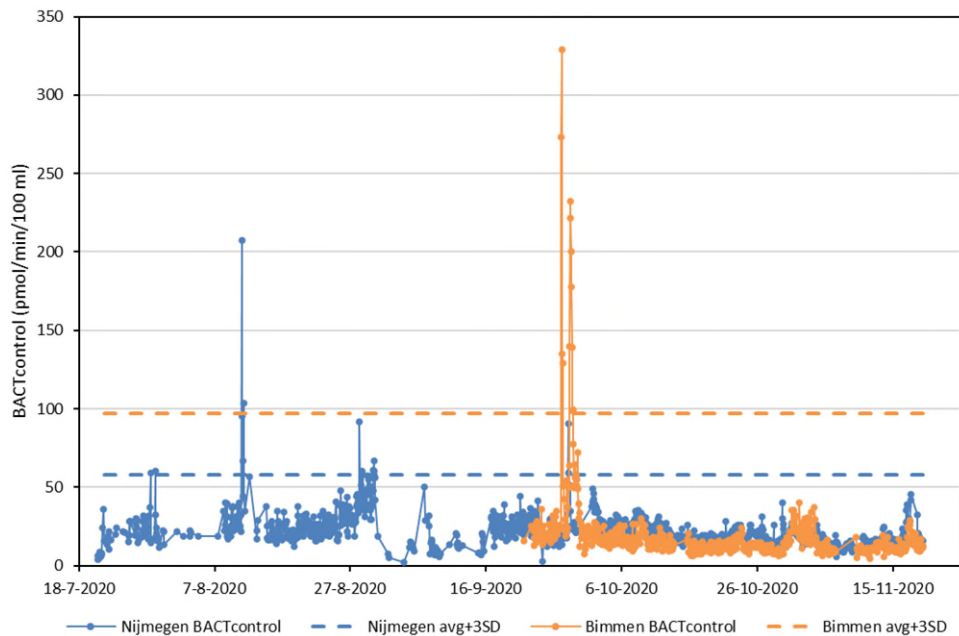
Op basis van de BACTcontrol metingen bij Marineterrein zou de afgeleide alarmwaarde (3xSD) moeten uitkomen op 15,8 pmol/min. Bij de metingen bij Nijmegen en Bimmen zou de alarmwaarde volgens deze methode worden vastgesteld op respectievelijk 96,8 en 57,9 pmol/min. Hier blijken verschillen te zijn waardoor enkel een locatie-specifieke alarmwaarde is vast te stellen. Ook waren de MPN-waarden hierbij niet eenduidig.

Ook binnen locaties worden verschillen in het basissignaal waargenomen die een vastgestelde alarmwaarde op basis van achtergrondsignaal, zoals bij Marineterrein waar in de periode eind september – begin oktober het basissignaal met meer dan een factor 2 is toegenomen.

Voor het afleiden van één alarmwaarde voor de BACTcontrol op basis van het gemiddelde achtergrondsignaal van de huidige twee pilot-onderzoeken blijkt niet mogelijk door variatie in het basissignaal. Het is voor individuele locaties wel mogelijk om op deze manier veranderingen in de waterkwaliteit in een vroeg stadium waar te nemen.



Figuur 66. Gemiddelde + 3xSD Marineterrein: 15,8 pmol/min



Figuur 67. Gemiddelde + 3xSD Nijmegen: 96,8 pmol/min/100 ml; Bimmen: 57,9 pmol/min/100 ml.

8.2.2 Percentielwaarden

Het vaststellen van een alarmwaarde op basis van pieken is in het huidige onderzoek gedaan op basis van de data van Breda. Hier is 75 pmol/min vastgesteld als veilige grenswaarde. Zolang de BACTcontrol metingen daar onder liggen is geen sprake van een verse besmetting met *E. coli*, zodra deze daar boven komt is de kans zeer groot dat het gehalte *E. coli* boven de grenswaarde van 1.800 kve/100 ml uitkomt.

Bij de locatie Marineterrein Amsterdam zijn geen pieken gemeten en is een afleiding van de alarmwaarde met deze methode niet mogelijk. Bij Nijmegen/Bimmen zijn er wel een aantal pieken gemeten, alleen hebben deze geen overlap met MPN-metingen waardoor een direct verband tussen BACTcontrol pieken en MPN-pieken niet is te leggen.

Op basis van percentielwaarden van de metingen bij Bimmen en Nijmegen is onderzocht op welke alarmwaarde men uit zou komen. In Tabel 20 zijn een aantal percentielwaarden weergegeven en in Tabel 21 of de gemeten pieken boven de alarmwaarde uit zouden komen. Hieruit blijkt dat bij een 90 percentielwaarde alle visueel beoordeelde pieken de alarmwaarde overschrijden.

Tabel 20. Percentielwaarden van enzymactiviteit gemeten met de BACTcontrol bij Bimmen (1272 metingen) en Nijmegen (686 metingen).

	Nijmegen (pmol/min)	Bimmen (pmol/min)
90 percentiel	27	34
95 percentiel	39	40
98 percentiel	78	51
99 percentiel	159	60

Tabel 21. Percentielwaarden vergeleken met de enzymactiviteit van enkele pieken of verhogingen in enzymactiviteit gemeten met de BACTcontrol bij Bimmen en Nijmegen. X: waarde boven percentielwaarde, -: waarde niet boven percentielwaarde, nvt: geen piek geïdentificeerd.

Datum piek	90 percentiel		95 percentiel		98 percentiel		99 percentiel	
	Bimmen	Nijmegen	Bimmen	Nijmegen	Bimmen	Nijmegen	Bimmen	Nijmegen
27-9-2020	X	nvt	X	nvt	X	nvt	X	nvt
28-9-2020	X	X	X	X	X	X	X	X
29-9-2020	nvt	X	nvt	X	nvt	-	nvt	-
23-10-2020	X	X	X	X	-	-	-	-
25/26-10-2020	X	X	X	X	X	X	-	-
29-10-2020	nvt	X	nvt	X	nvt	X	nvt	X
31-10/3-11-2020	X	X	X	X	X	X	-	X
17-11-2020	X	X	X	X	X	X	-	X

Met deze methode zal per definitie 1 -10% van de pieken de alarmwaarde overschrijden. Aangezien we een directe koppeling met MPN-metingen alleen incidenteel kunnen maken, is niet in te schatten in hoeverre deze pieken het gehalte *E. coli* boven de grenswaarde van 1.800 kve/100 overschrijden.

8.2.3 Op basis van validatie-experimenten

In hoofdstuk 3 zijn voor verschillende kwaliteitsniveaus van water experimentele grenswaarden vastgesteld, zoals hieronder te zien. Opgemerkt moet worden dat het aantal data-punten dat tot deze data leidt, nog beperkt is tot alleen de huidige studie en er daarom met voorzichtigheid moeten worden geïnterpreteerd.

- Acut risico: >1800 MPN/100 ml → >11,67 pmol/min
- 1000-1800 MPN/100 ml → 8,19 – 11,67 pmol/min
- 500-1000 MPN/100 ml → 5,4 – 8,19 pmol/min
- <500 MPN/100 ml → <5,4 pmol/min

De alarmwaarde op basis van het validatie experiment is daarmee vastgesteld op 11,67 (=12) pmol/min. Tijdens het validatie-experiment is water vanuit de locaties Tull en 't Waal en Spiegelwaal meegenomen. De metingen met BACTcontrol met water van de overige vijf locaties bleek er een technisch probleem met de BACTcontrol te zijn waardoor deze niet in de evaluatie konden worden meegenomen. Hierdoor is de variatie in het validatie-experiment voor verschillende wateren beperkt. De verwachting is dat de onzekerheid rondom de vastgestelde waarde groter is als het gebaseerd wordt op meer verschillende watertypes, waardoor deze waarde vermoedelijk hoger zou komen te liggen.

8.2.4 Conclusie BACTcontrol

De alarmwaarden die zijn vastgesteld met de verschillende methoden liggen in de range van 12 – 96,8 pmol/min en daarmee in dezelfde orde grootte.

De waarde van 12 pmol/min uit het validatie-experiment (hoofdstuk 3) en die van de praktijkexperimenten uit Breda (75 pmol/min) zijn gevalideerd met MPN-metingen en worden daarom als de meest relevante getallen beschouwd. Ook voor de BACTcontrol metingen bij de Spiegelwaal zou een alarmwaarde van 75 pmol/min voldoen. Dat de waarde vanuit de praktijkmetingen hoger uitkomt dan die van het validatie-experiment is te verklaren door de grotere variatie in de praktijk voor parameters die invloed hebben op het signaal van de

BACTcontrol, zoals stroming, troebelings door wind, variatie in *E. coli* belasting in de tijd met een mix van *E. coli* uit diverse bronnen en van verschillende versheid.

Op basis van de ervaringen in het huidige onderzoek wordt aanbevolen om voor 'nieuwe locaties' (daar waar BACTcontrol voor het eerst wordt toegepast) 75 pmol/min te hanteren, en parallel *E. coli* MPN -analyses uit te voeren om te beoordelen om deze alarmwaarde voor de specifieke locatie eventueel moet worden bijgesteld.

8.3 Alarmwaarde mobiele qPCR

8.3.1 UDetect (Orvion)

In het validatieonderzoek (hoofdstuk 3) is een grenswaarde voor *E. coli* vastgesteld voor de verschillende methoden die als alarmwaarde kan dienen voor een overschrijding van de 1800 kve/100 ml grens op basis van MPN analyse. Voor UDetect is deze alarmwaarde vastgesteld op $1,7 \times 10^3$ gen kopieën per 100 ml.

De veldmetingen van de zwemwaterlocaties beschreven in hoofdstuk 4 lieten voor één locatie bij elke meetronde een MPN-waarde van >1.800 kve/100 ml zien (62.000 – 15.000 kve/100 ml). Bij de eerste twee monitoringsronden was de meting met UDetect op die locatie onder detectieniveau, maar waren er ook nog optimalisatiestappen nodig. Bij de andere drie bemonsteringsrondes werd door UDetect een waarde van $3,1 \times 10^2$, $9,3 \times 10^2$ en $1,9 \times 10^2$ gen kopieën /100 ml gevonden. Als de UDetect in het laboratorium werd uitgevoerd werden tot een factor 500 hogere concentraties gevonden. In het veld lijken de gevonden waarden dus lager uit te vallen, mogelijk door minder efficiënte DNA isolatie in het veld dan in het lab.

8.3.2 Sopachem

In het validatieonderzoek (hoofdstuk 3) is een grenswaarde voor *E. coli* vastgesteld voor de verschillende methoden die als alarmwaarde kan dienen voor een overschrijding van de 1800 kve/100 ml grens op basis van MPN analyse. Voor het GeneSig systeem van Sopachem is deze alarmwaarde vastgesteld op $3,01 \times 10^2$ gen kopieën per 100 ml. Een beperkt aantal veldmetingen met Sopachem zijn uitgevoerd in Breda, maar konden niet gekoppeld worden aan MPN-metingen.

8.4 Geschiktheid snelle methoden voor de praktijk

E. coli bacteriën die koud worden, worden niet meer door de BACTcontrol gedetecteerd. Het ligt niet zozeer aan de duur na de besmetting (>18 uur), maar aan temperatuur. Want dit effect is niet gezien in de validatie waarbij het water op kamertemperatuur is bewaard.

Negatieve waarden, nulwaarden of een repetitie van exact dezelfde waarde gedurende meerdere tijdstappen zijn daarbij beschouwd als blokken zonder goede data. Breda: In 2020 was de data opbrengst 86% en in 2021 87,1%; voor Marineterrein was de dataopbrengst 43,6%; voor Nijmegen was de dataopbrengst 88,7%; voor Bimmen was de dataopbrengst 55,9%. Dit betekent dat er aanzienlijke gaten in de tijdreeks zitten die in de toekomst beperkt moeten worden door het optimaliseren van het beheer van de BACTcontrol en het borgen van de datacommunicatie.

Tabel 22. Vergelijking validatie van (indicatieve) grenswaarden van de snelle methoden BACTcontrol, UDetect qPCR en GeneSig qPCR vergeleken met de MPN en kweek-grenswaarden die zijn gebaseerd op bijlage I van de Europese Zwemwaterrichtlijn (2006/7/EG) [1]* Gebaseerd op een beoordeling van het 95-percentiel. ** Gebaseerd op een beoordeling van het 90-percentiel

Zwemwaterkwaliteit	MPN of kweek (MPN/100 ml)	BACTcontrol (pmol/min/100 ml)	UDetect qPCR (genkopieën/100 ml)	Sopachem qPCR (genkopieën/100 ml)
--------------------	------------------------------	----------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------------

Uitstekend	500 *	5,4	<5,2.10 ²	<8,78.10 ¹
Goed	1000 *	5,4 – 8,19	5,2.10 ² – 9,99.10 ²	8,78.10 ¹ – 1,7.10 ²
Aanvaardbaar	900 **	8,19 – 11,67	9,99.10 ² -1,73.10 ²	1,7.10 ² – 3,01.10 ²
Signaalwaarde	1800	11,67	1,73.10 ³	3,01.10 ²

In onderstaand overzicht (Tabel 23 - Tabel 25) is een overzicht gemaakt op basis van de ervaringen uit het huidige onderzoek van de eigenschappen van de verschillende methoden.

Tabel 23. Overzicht van performance characteristics conventionele en snelle *E. coli*-methoden voor de praktijk

	MPN of kweek	BACTcontrol	Lab qPCR	UDetect qPCR	GeneSig qPCR
Nauwkeurigheid	Zeer nauwkeurig	Onbekend	Zeer nauwkeurig	Nauwkeurig	Zeer nauwkeurig
Gevoeligheid	Voldoende gevoelig	Voldoende gevoelig	Voldoende gevoelig	Voldoende gevoelig	Voldoende gevoelig
Inclusiviteit	Niet bepaald in dit project. Gedaan door producent (Colilert) en vergelijkbaar met kweekmethode.	Kan niet worden bepaald	10 verschillende <i>E. coli</i> worden gedetecteerd	10 verschillende <i>E. coli</i> worden gedetecteerd	10 verschillende <i>E. coli</i> worden gedetecteerd
Exclusiviteit	Niet bepaald in dit project. Gedaan door producent (Colilert) en vergelijkbaar met kweekmethode.	Kan niet worden bepaald	10 niet- <i>E. coli</i> - stammen worden niet gedetecteerd	10 niet- <i>E. coli</i> - stammen worden niet gedetecteerd	10 niet- <i>E. coli</i> - stammen worden niet gedetecteerd
Bepalen zwemwaterkwaliteit volgens zwemwaterrichtlijn	Kan onderscheid maken tussen aanvaardbaar, goed, uitstekend en signaalwaarde	Kan onderscheid maken tussen aanvaardbaar, goed, uitstekend en signaalwaarde	Kan onderscheid maken tussen aanvaardbaar, goed, uitstekend en signaalwaarde	Kan onderscheid maken tussen aanvaardbaar, goed, uitstekend en signaalwaarde	Kan onderscheid maken tussen aanvaardbaar, goed, uitstekend en signaalwaarde

Tabel 24. Overzicht van technische karakteristieken conventionele en snelle *E. coli*-methoden voor de praktijk

	MPN of kweek	BACTcontrol	Lab qPCR	UDetect qPCR	Sopachem qPCR
Effect watertemperatuur	Geen	<i>E. coli</i> bacteriën die te koud zijn geworden, worden niet gedetecteerd	Geen	Geen	Geen
Duur één meting	24 uur	1,5 uur	4 uur	2 uur	2 uur
Hands-on time	2x 10 minuten	0 minuten	1 uur	10 min	40 min
Effect watermatrix		Variatie in achtergrondsignaal, hoger bij vies water.			
Geschikt voor welk soort locatie/water	Alles?	Redelijk afgesloten systeem (geen grote rivier) met een	Alles. Remming qPCR door humuszuren en oplosmiddelen.	Alles. Remming qPCR door humuszuren en oplosmiddelen.	Alles. Remming qPCR door humuszuren en oplosmiddelen.

		duidelijke fecale piekbelasting	Kan corrigeren door interne controle	Kan corrigeren door interne controle	
--	--	---------------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------	--

Tabel 25. Overzicht van gebruiksvriendelijkheid van conventionele en snelle E. coli-methoden voor de praktijk

	MPN of kweek	BACTcontrol	Lab qPCR	UDetect qPCR	Sopachem qPCR
Storingsgevoeligheid	Nauwelijks	Storingen kunnen regelmatig voorkomen, maar ook lange tijd afwezig zijn. B.v. verstopping filter, defect pompen	Inhibitie qPCR door remmende stoffen. Wel Interne controle	Inhibitie qPCR door remmende stoffen. Wel interne controle.	Inhibitie qPCR door remmende stoffen.
Gebruiksgemak algemeen	MPN (Colilert): makkelijk, wel lab nodig Kweek: getraind personeel en lab nodig	Varieert.	Alleen mogelijk op het lab.	Kan goed in het veld.	Geen veldmethode, met moeite kan in veld worden uitgevoerd
Uitvoering	Getraind personeel en lab nodig	Training en ervaring nodig	Getraind personeel en lab nodig	Training en ervaring nodig	Training en ervaring nodig.
Opslag reagentia en materialen	Koelkast (kweek) of kamertemperatuur (Colilert)	Koelkast of vriezer, maar vervangen reagentia 1x per 1-2 maanden	Reagentia in vriezer bewaren.	Reagentia op kamertemperatuur bewaren	Reagentia kamertemperatuur / bevroren bewaren
Databeschikbaarheid	Geïntegreerd in LIMS-syteem. Communicatie tussen lab en opdrachtgever.	Online, maar resultaten moeten vaak gecontroleerd worden of ze betrouwbaar zijn. Gaat nog niet (geheel) geautomatiseerd.	Geïntegreerd in LIMS-syteem. Communicatie tussen lab en opdrachtgever.	Aflezen, kan op termijn online beschikbaar worden gemaakt	Aflezen, kan op termijn online beschikbaar worden gemaakt
Voordelen				Goed in veld uit te voeren	
Beperkingen/Nadelen					Materialen moeten bevroren in het veld worden gebracht. Niet alle benodigde pipetten beschikbaar in de veldbox

8.5 Stappenplan bij in gebruik nemen snelle methoden

Een stappenplan is opgesteld als ondersteuning voor de keuze van de toepassing van snelle methoden voor fecale verontreinigen, en welke methode het beste bij een specifieke locatie of situatie past.

Het stappenplan bestaat uit een serie vragen en afwegingen die men moet maken om te kunnen starten met de toepassing van snelle methoden. De belangrijkste voorbereiding hiervoor is om de locatie zo goed mogelijk te kennen.

1. Wat is het probleem of situatie die je wilt meten, onderzoeken of monitoren?
2. Wat voor watertype gaat het om (zout, zoet, redelijk afgesloten systeem, grote rivier, waterplas, etc)
3. Om wat voor fecale belasting gaat het? Gemengd of gescheiden riool, overstorten, effluent, afspoeling of andere lozings?
4. Online (BACTcontrol) vs offline (mobiele qPCR) → is er personeel beschikbaar voor uitvoering mobiele qPCR of om BACTcontrol in de gaten te houden?
5. Wat is een goed meetpunt? Zijn er voorbereidende metingen nodig om dat te bepalen?
6. Korte vergelijking met MPN methode op het te testen watertype. B.v. door verdunningsreeksen locatie RWZI effluent (of andere fecale bron) met te testen oppervlaktewater.
7. Protocollen opstellen om als organisatie snel te kunnen reageren als er een piek/overschrijding gevonden wordt met de nieuwe, snelle methode.

De toepassing van de nieuwe snelle methoden leiden tot een succesvol early warning systeem waarmee waterkwaliteit snel kan worden gecontroleerd om wateractiviteiten of swim events weloverwogen wel of niet door te laten gaan. De keuze voor welke type methode het meest geschikt is voor bepaalde toepassingen hangt af van de eigenschappen van de methoden. Op basis van deze eigenschappen kan een keus worden gemaakt voor de toepassing van een methode voor specifiek doel.

De BACTcontrol kan in een relatief korte tijd veel metingen doen zonder dat er ter plekke mensen nodig zijn om de analyses uit te voeren. Wel is er een goede voorbereiding en een aantal investeringen in infrastructuur nodig om de BACTcontrol te plaatsen. De meetunit zal nabij het water moeten worden geplaatst en in zekere mate moeten worden afgeschermd voor vandalisme. Dit kan bijvoorbeeld door het apparaat op een eigen terrein te plaatsen of door te omheinen. Als de BACTcontrol eenmaal is geïnstalleerd kan het elke twee uur een meting uitvoeren en een goed beeld geven van variatie in de waterkwaliteit. Het is niet gemakkelijk om de BACTcontrol in korte tijd op meerdere locaties in te zetten.

Mobiele qPCR kan gemakkelijk worden meegenomen naar meerdere locaties en daar ter plekke een analyse uitvoeren. Ook kunnen eerst monsters van meerdere locaties worden verzameld en die vervolgens simultaan worden geanalyseerd direct nadat het laatste monster is genomen. Wel is er voor het uitvoeren van de analyse en monstervoorbereiding een persoon nodig die de handelingen uitvoert, het systeem werkt niet autonoom.

Omdat de BACTcontrol (enzymactiviteit) en mobiele qPCR (gen kopieën) geen levende cellen detecteren is de eenheid van de data anders dan kve/100 ml. Voor officiële aangewezen zwembadlocaties is monitoring van kweekbare cellen en rapportage in kweekbare eenheden een verplichting voor de Europese Zwembadrichtlijn. Vervanging van de MPN metingen op deze locaties met één van de nieuwe snelle methodes is daarom niet aan de

orde. Wel kunnen de methoden op de aangewezen zwemlocaties aanvullende informatie geven over het functioneren van het systeem en het voorkomen van fluctuaties in de tijd.

Voor het opsporen van bronnen en onbekende oorzaken van regelmatig te hoge aantallen fecale verontreinigingen op een specifiek punt is de BACTcontrol heel geschikt. De continue metingen laten een piek zien als er een verontreiniging ‘langs komt’. Door het moment van een kortdurende piek te koppelen aan een vermoedelijke oorzaak, zoals aanwezigheid van watervogels, actieve riooloverstort of hevige regenval, kan de bron of oorzaak van de overschrijdingen worden achterhaald. Het onderzoek dat in Breda wordt uitgevoerd is hier een goed voorbeeld van.

Voor de organisatie van zwemevenementen in niet aangewezen zwemlocaties, zoals Cityswims, Mudruns of wedstrijden open water zwemmen kan mobiele qPCR een goede manier zijn om de waterkwaliteit te beoordelen. Vaak zijn er van deze locaties geen recente monitoringsdata voor fecale verontreinigingen beschikbaar en wordt er op het parcours gebruik gemaakt van meerdere watergangen (grachten, sloten, plassen, kanalen) die niet allemaal dezelfde kwaliteit hebben. Het installeren van meerdere BACTcontrol systemen zou een ingrijpende en kostbare aangelegenheid zijn. Voor dergelijke evenementen is het gebruik van mobiele qPCR juist wel goed mogelijk. Het vaststellen of de waterkwaliteit op het parcours erg verschillend is, en of de fecale belasting onder de alarmwaarde ligt kort voor aanvang van een evenement, kan de recreanten behouden voor blootstelling aan te hoge concentraties fecaliën.

De wettelijke acceptatie voor toepassing van nieuwe methoden gaat langzamer dan de mogelijkheden voor betrouwbare toepassing er van. Dat zal voor BACTcontrol en mobiele qPCR niet anders verlopen. Met het huidige onderzoek en het in de nabije toekomst vaker in te zetten als aanvulling op MPN-metingen wordt het inzicht in variatie in de waterkwaliteit groter en kunnen burgers proactief worden geïnformeerd.

9 Overkoepelende conclusie en aanbevelingen

9.1 Conclusies

9.1.1 Overall conclusies voor snelle detectie methoden

- De nieuwe snelle methoden voor fecale verontreinigingen kunnen het inzicht in dynamiek van waterkwaliteit vergroten en de beslis-criteria op basis van de grenswaarden van BACTcontrol en mobiele qPCR komen vrij goed overeen met die van de MPN-kweek methode
- Hiermee is er voor waterbeheerders een set aan meetmethoden beschikbaar om voor niet-officiële zwemlocaties de aanwezigheid van fecale verontreinigingen snel en frequent te kunnen monitoren.
- De BACTcontrol is met name geschikt om tijdens een langere meetperiode verse pieken in *E. coli* concentratie waar te nemen.
- Mobiele qPCR kan snel en flexibel worden ingezet en is daarmee geschikt om na een piek-concentratie van fecale verontreinigingen de waterkwaliteit in de gaten te houden en het verloop van de piekconcentratie te volgen.
- Op basis van validatiemetingen zijn alarmwaarden vastgesteld voor de verschillende snelle methodes. In het huidige praktijk onderzoek bleek de achtergrondwaarde voor BACTcontrol bij Breda en Spiegelwaal hoger dan deze afgeleide alarmwaarde. Daarom is voor deze locaties een alarmwaarde in praktijk afgeleid die ligt op 75 pmol/min. Toepassing in praktijk zal duidelijk moeten maken in hoeverre deze waarde ook voor andere locaties passend is.
- Mobiele qPCR en BACTcontrol kunnen afzonderlijk van elkaar worden ingezet, maar een gecombineerde toepassing van beide methoden kan elkaar versterken en het inzicht in de verspreiding en verloop in de tijd van een fecale verontreiniging vergroten.

9.1.2 Mobiele qPCR

- De *ad hoc* meting met behulp van de mobiele qPCR is geschikt om, in het geval van evenementen of in het geval van een geconstateerde serieuze riooloverstorting, snel te bepalen of de hygiënische waterkwaliteit weer voldoet.
- De kwaliteit van de DNA-isolatie met UDetect blijkt na enige ervaring van de uitvoerder vergelijkbaar met de DNA-isolatie in het lab, al blijkt de absolute opbrengst veelal minder dan in het lab te zijn. Om de mobiele qPCR goed in te kunnen zetten is het noodzakelijk om de meetopbrengst te corrigeren voor inhibitie aan de hand van de interne controle. Hierin is met het Udetect systeem voorzien.

- Meerdere microbiologische parameters kunnen met mobiele qPCR in één analyse gemeten worden; in het huidige onderzoek zijn *Leptospira*, blauwalg toxine genen, en *E. coli* in één analyse per monster simultaan gemonitord.
- *Bacteroides* zijn in hogere aantallen aanwezig dan *E. coli*. Eerste testen laten zien dat er potentie is om deze als indicator te gebruiken voor snelle detectie van humane fecalen met qPCR. Daarvoor is vervolgonderzoek nodig.

9.1.3 BACTcontrol

- BACTcontrol lijkt ideaal om recente/verse pieklozingen met een negatief effect op hygiënische kwaliteit op een specifieke locatie betrouwbaar en snel te detecteren, maar het is niet geschikt om aan te geven wanneer het water weer hygiënische betrouwbaar is.
- De geschiktheid van de BACTcontrol voor semi-continue monitoring en alarmering verschilde per locatie:
 - i) In Breda is de semi-continue meting van de enzymatische activiteit, specifiek voor *E. coli*, met behulp van de BACTcontrol zeer geschikt voor alarmering: de BACTcontrol geeft direct aan wanneer de waterkwaliteit door overstortingen onvoldoende wordt.
 - ii) Voor de testlocatie Spiegelwaal is de BACTcontrol geschikt als alarmering voor grote verse pieken die stroomopwaarts bij Bimmen worden gemeten, maar niet voor de kleine pieken. Daarnaast worden er soms pieken gemist als MPN wel een verhoging liet zien.
 - iii) Voor het Marineterrein in Amsterdam kan hier geen uitspraak over worden gedaan omdat de *E. coli*-aantallen (te) laag waren, en problemen met storingsen aan de BACTcontrol zijn geweest op het moment dat er wel veel *E. coli* met MPN werd aangetroffen.

9.2 Aanbevelingen

Er is een set van snelle methoden beschikbaar die waterbeheerders kunnen inzetten om de aanwezigheid van fecale verontreinigingen in oppervlaktewater te onderzoeken. De ervaringen van het huidige onderzoek geven voldoende vertrouwen en aanknopingspunten om deze ook op andere locaties in te zetten en zo bij niet officiële zwemlocaties toch een beeld te krijgen of, wanneer en in welke mate fecale verontreinigingen aanwezig zijn.

Er wordt aanbevolen om voor metingen op nieuwe locaties de metingen met BACTcontrol en/of mobiele qPCR voor *E. coli* analyse parallel te laten lopen met MPN-analyses op *E. coli* zodat kan worden getoetst of de gestelde alarmwaarden in de huidige studie ook gelden voor de praktijk van de nieuwe locatie.

Voor het meten van piekconcentraties op specifieke locaties wordt aanbevolen om de BACTcontrol toe te passen, om vervolgens mobiele qPCR te gebruiken voor verfijning van de informatie (locaties, trend in de tijd) en om vast te stellen wanneer de piek van fecale verontreiniging weer voorbij is. Hierbij is het ook belangrijk om in de eerste periode dat deze nieuwe methoden worden ingezet ook frequent de *E. coli* MPN methode wordt ingezet om te kunnen vaststellen of de afgeleide alarmwaarden in dit onderzoek ook goed passend zijn bij de nieuwe locatie.

Het is belangrijk voor succesvolle toepassing van snelle methoden in de praktijk, dat de organisatie rondom waterkwaliteitsmonitoring dusdanig wordt ingericht dat direct kan worden gereageerd op een overschrijding.

Onderdeel daarvan is ook dat mobiele qPCR wordt uitgevoerd door een getrainde monsternemer, om de variabiliteit in resultaten beperkt mogelijk te houden.

Tevens zou het handig zijn als de resultaten van mobiele qPCR en van BACTcontrol makkelijk en gebruiksvriendelijk online te benaderen zijn, waarbij meteen duidelijk is of een meting betrouwbaar was of niet. Dit kan het proces tot implementatie van de methoden als early warning versnellen.

10 Referenties

1. Unie, E., *Richtlijn 2006/7/EG van het Europees Parlement en de Raad in 2006/7/EG*, E. Unie, Editor. 2006.
2. Leenen, I., *Handreiking voor evenementen in, op, met, boven en rondom water*, S.S. RIONED, Editor. 2019.
3. Water, S., *Beslisnotitie werkwijze individuele metingen en meetfrequentie microbiologische parameters zwemwaterrichtlijn (vastgesteld op 14 maart 2013)*. 2013
4. Heijnen, L. and G. Medema, *Method for rapid detection of viable Escherichia coli in water using real-time NASBA*. *Water Res*, 2009. **43**(12): p. 3124-32.
5. ISO, N., *NEN-EN-ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method*. 2016, ISO: Switzerland.
6. Water, U.S.E.P.A.O.o., *Method 1611: Enterococci in Water by TaqMan® Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Assay*. EPA standard procedure, October 2012.
7. Haugland, R., et al., *Large-scale comparison of E. coli levels determined by culture and a qPCR method (EPA Draft Method C) in Michigan towards the implementation of rapid, multi-site beach testing*. *J Microbiol Methods*, 2021. **184**: p. 106186.
8. Ochman, H. and R.K. Selander, *Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations*. *J Bacteriol*, 1984. **157**(2): p. 690-3.
9. NEN, *NEN-EN-ISO 9308-3:1999/C1:2000 en: Water - Detectie en telling van Escherichia coli en bacteriën van de coligroep in oppervlaktewater en afvalwater - Deel 3: Geminiaturiseerde methode (meest waarschijnlijke aantal) door enting in een vloeibaar medium*. 2000.
10. Stubner, S. and K. Meuser, *Detection of Desulfotomaculum in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analyses*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000. **34**(1): p. 73-80.
11. Pasdar, B., *Recreational water quality in the Breda canals*. 2022, TU Delft.
12. Anne-Sophie, M.-H., et al., *Temporal analysis of E. coli, TSS and wastewater micropollutant loads from combined sewer overflows: implications for management*. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2015. **17**(5): p. 965-974.
13. Burnet, J.-B., et al., *Tracking the contribution of multiple raw and treated wastewater discharges at an urban drinking water supply using near real-time monitoring of β -d-glucuronidase activity*. *Water Research*, 2019. **164**: p. 114869.
14. Cazals, M., et al., *Near real-time notification of water quality impairments in recreational freshwaters using rapid online detection of β -D-glucuronidase activity as a surrogate for Escherichia coli monitoring*. *Science of The Total Environment*, 2020. **720**: p. 137303.
15. Hootsmans, M.J.M., *DNA bronopsporing in stadsingels van Breda*. 2019, KWR: Nieuwegein.
16. Ender, A., et al., *Evaluation of β -d-glucuronidase and particle-size distribution for microbiological water quality monitoring in Northern Vietnam*. *Science of The Total Environment*, 2017. **580**: p. 996-1006.
17. Stadler, P., et al., *Event-transport of beta-d-glucuronidase in an agricultural headwater stream: Assessment of seasonal patterns by on-line enzymatic activity measurements and environmental isotopes*. *Science of The Total Environment*, 2019. **662**: p. 236-245.
18. Mendoza, L.M., et al., *Fluorescence-based monitoring of anthropogenic pollutant inputs to an urban stream in Southern California, USA*. *Science of The Total Environment*, 2020. **718**: p. 137206.
19. Favere, J., et al., *Online microbial monitoring of drinking water: How do different techniques respond to contaminations in practice?* *Water Research*, 2021. **202**: p. 117387.

I Zwemwater: Experience user protocol van UDetect

Onderstaand protocol is gebruikt voor filtratie, DNA-isolatie, en qPCR in het veld.

 UDetect 



UDetect

Datum 16-07-2020

Auteur D. Schoof

Versie 1.0

Benodigheden

Veldfiltratie	DNA-isolatie	qPCR analyse
Handschoenen	Handschoenen	Handschoenen
Permanent marker	Stopwatch	UDetect rek
Weegschaal	UDetect rek + UDetect magneet	USB 1/2/3
Pomp met slangen	Permanent marker	Buisje D
Stopwatch	Notitie boek met pen	UDetect machine (William)
Notitieboek en pen	Buisje 3 / 4 / 5 / E / D	Auto batterij (accu) en William stroomkabel
1L hydrobag met filter en rode dop	UDetect doos, veldfiltratie -Filter met vloeistof (gefilterde watermonster) -Spuut (gebruikt voor zelfde filter)	Transparante zak met alleen exact volume pipetten
Spuut met blauwe dop (bruine verpakking)	Plastic pipetten zak -4x plastic pipetten (groot) -1x exact volume pipet (klein) -Katoenen plug	UDetect kwantificeer verpakking 4 qPCR buisjes 1 witte clip 1 silica verpakking

Indien er meerdere monsters tegelijk worden behandeld:

- Let op schone handschoenen
- Label duidelijk

Stap 1: veldfiltratie

Protocol

1. Schrijf de monstercode op het filter en noteer dit
2. Vul de hydrobag met het watermonster
3. Weeg de hydrobag en noteer het startgewicht
4. Maak de slang van de pomp vast aan het filter
5. Open de witte clip van de hydrobag en laat het filter vol lopen met vloeistof
6. Start 5 minuten op een stopwatch en start met pompen
7. Sluit de witte clip en wacht tot het filter leeg is gelopen
8. Haal de druk van de pomp en verwijder de slang van het filter
9. Plaats de **rode dop** terug
10. Weeg de hydrobag en noteer het eindgewicht
11. Verwijder het filter van de hydrobag (de hydrobag kan weg worden gegooid)
12. Breng de vloeistof van de spuit over in het filter

13. Sluit het filter aan deze zijde met de **blauwe dop**
14. Beweeg de vloeistof door het filter heen zodat het over het gehele oppervlakte is geweest

Voor vragen kunt u contact opnemen via biolab@orvion.nl of +31 182 606360



- Optie 1:** Ga verder met UDetect stap 2: DNA-isolatie watermonsters"
Optie 2: Bewaar het filter en de spuit bij kamertemperatuur in de bruine verpakking voor analyse op een later moment. Monsters blijven 5 dagen stabiel.
- LET OP:** Vermijd blootstelling van het filter met vloeistof aan licht

Stap 2: DNA-isolatie

Protocol

1. Noteer de monstercode op buisje D
2. Schud het filter met vloeistof op en neer voor 1 minuut
3. Open het filter door de **blauwe dop** te verwijderen
4. Breng de vloeistof over naar buisje 3
5. Schud buisje 3 op en neer voor 1 minuut
6. Meng de vloeistof van buisje 4 (rustige zijwaartse bewegingen)
7. Breng de vloeistof van buisje 3 over naar buisje 4
8. Meng de vloeistoffen in buisje 4 rustig
9. Wacht 5 minuten voor doorgaan met de volgende stappen

De volgende stappen worden uitgevoerd op de UDetect magneet

10. Plaats buisje 4 op de magneet en wacht 2 minuten
11. Verwijder de vloeistof uit buisje 4 m.b.v. de katoenen plug
12. Breng de vloeistof van buisje 5 over naar buisje 4 (niet mengen)
13. Verwijder de vloeistof in buisje 4 m.b.v. de katoenen plug en breng de vloeistof van buisje E over naar buisje 4

De volgende stappen worden uitgevoerd in het UDetect rek

14. Meng de vloeistof met bruine sediment rustig
15. Start 2 minuten op een stopwatch en wacht

De volgende stappen worden uitgevoerd zijn op de UDetect magneet

16. Plaats buisje 4 op de magneet en wacht 1 minuut
17. Breng de vloeistof van buisje 4 over terug naar buisje E
LET OP: Als het bruine sediment op de magneet wordt aangeraakt of in de pipet terechtkomt, dan weer terug pipetteren en 1 minuut wachten voor de vloeistoffen om van elkaar te scheiden.

De volgende stappen worden uitgevoerd in het UDetect rek

18. Breng m.b.v. de exact volume pipet een volume van buisje E over naar buisje D
19. Meng buisje D door rustig een zijwaartse bewegingen te maken

Buisje D bevat nu het gezuiverde DNA, dit DNA is nu klaar om te worden geanalyseerd.

Optie 1: Indien meerdere monsters tegelijk worden geanalyseerd, ga dan door met het volgende monster.

Optie 2: Indien het monster direct wordt geanalyseerd, ga dan verder met UDetect stap 3 – uitvoer van qPCR analyse

Voor vragen kunt u contact opnemen via biolab@orvion.nl of +31 182 606360



Stap 3: qPCR analyse

Protocol

1. Neem schone handschoenen.
2. Neem buisje D
3. Plaats de qPCR buisjes op volgorde in de clip en deze in het rek: **BLAUW**, **ROOD**, **ZWART** en **GROEN**
LET OP: Het rek moet juist staan, plek voor clip rechts.
4. Gebruik de exact volume pipet om een volume van buisje D naar het qPCR buisje over te brengen.
Herhaal stap 3 en 4 voor de overige qPCR buisjes
5. Maak een snelle neerwaartse beweging met een qPCR buisje in de hand.
6. Sluit William aan en verwijder de deksel (machine zegt: "LID OFF").
7. Plaats de clip met qPCR buisjes op de eerste vier beschikbare plaatsen (1 t/m4)

LET OP: Er kunnen vier clips tegelijk (16 qPCR buisjes), herhaal voor andere monsters indien gewenst. Voor elk monster dienen er schone handschoenen gebruikt te worden.
8. Noteer waar het monster geplaatst is en welke USB # gebruikt is.
9. Plaats buisje D in extracten doos, bewaar deze zoveel mogelijk gekoeld.
10. Plaats de deksel terug (machine zegt: "LID ON").
11. Sluit de USB# aan op William, de machine zegt: "ANALYSIS STARTING". De analyseduurt ~50 minuten.
12. Als de analyse klaar is zegt de machine: "ANALYSIS COMPLETED".
13. Verwijder de clips met qPCR buisjes van de machine en plaats deze in een lege kwantificeer verpakking, sluit voorzichtig en gooi direct weg.

Voor vragen kunt u contact opnemen via biolab@orvion.nl of +31 182 606360

II Zwemwater: Ondersteunende tabellen bij hoofdstuk 4.3

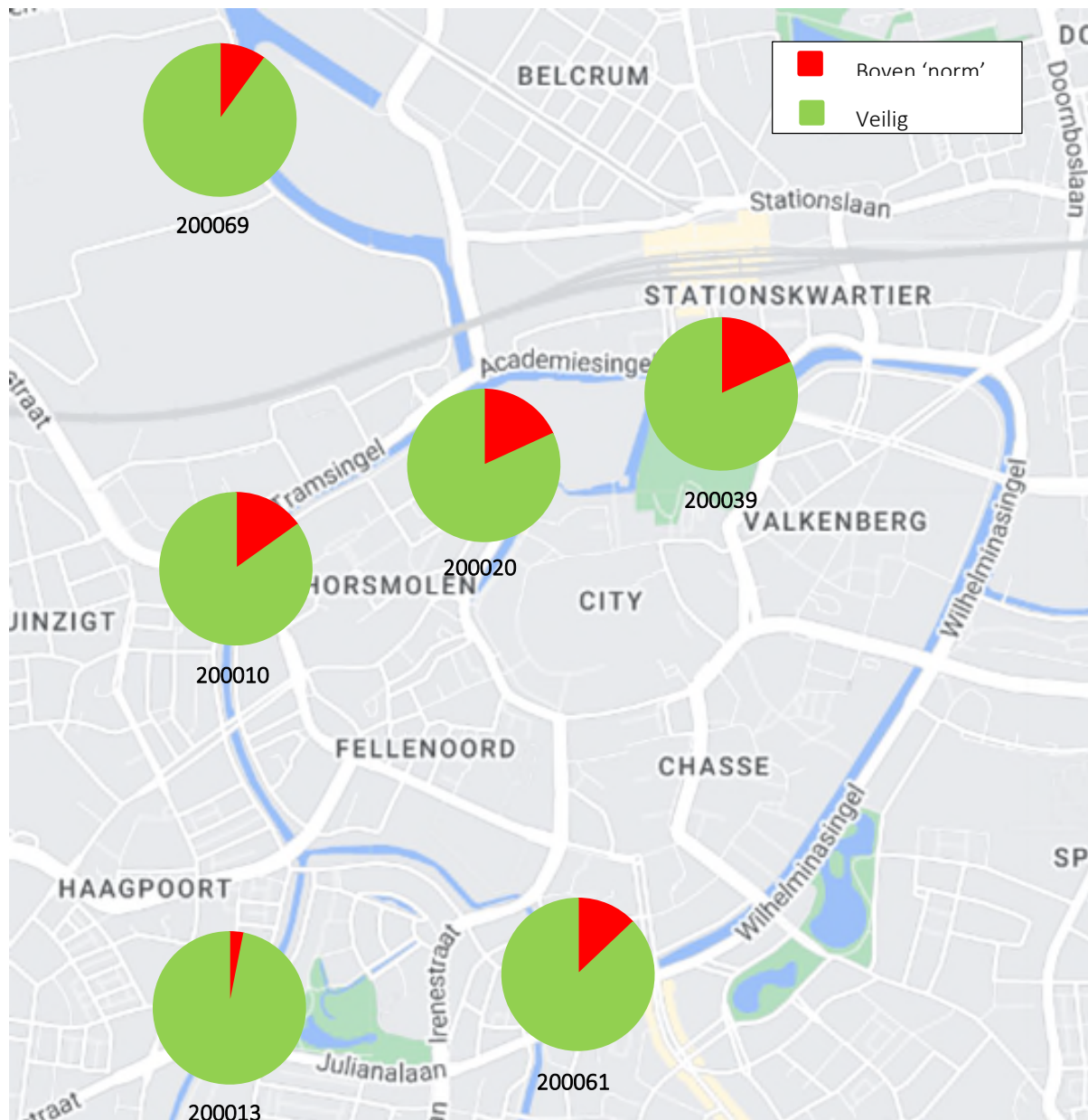
Tabel 26. Totaal aantal bacteriële 16S rRNA genen gedetecteerd in het DNA geïsoleerd in het veld en in het lab in de 5 monsterrondes op de 14 locaties. Lege cellen zijn monsters waarbij DNA is afgekeurd op basis van interne controle.

Locatie	Ronde 1		Ronde 2		Ronde 3		Ronde 4		Ronde 5	
	Veld	Lab	Veld	Lab	Veld	Lab	Veld	Lab	Veld	Lab
1		1,40x10 ⁷		3,09x10 ⁷	2,64x10 ⁶	6,22x10 ⁶	4,34x10 ⁶	4,53x10 ⁶	1,17x10 ⁶	1,53x10 ⁶
2		1,70x10 ⁷		2,94x10 ⁷	1,62x10 ⁶	1,43x10 ⁷	1,36x10 ⁶	3,88x10 ⁶	5,76x10 ⁵	4,15x10 ⁶
3		1,15x10 ⁷		4,92x10 ⁶	2,14x10 ⁶	7,12x10 ⁶	3,01x10 ⁶	1,30x10 ⁶	1,20x10 ⁶	7,32x10 ⁵
4		3,22x10 ⁷		8,50x10 ⁶	1,12x10 ⁶	3,23x10 ⁶		1,06x10 ⁶	5,85x10 ⁵	1,89x10 ⁶
5		1,87x10 ⁸	3,71x10 ⁶	1,49x10 ⁸	9,82x10 ⁶	5,13x10 ⁷	1,60x10 ⁷	1,89x10 ⁷	7,71x10 ⁶	2,58x10 ⁷
6	9,79x10 ⁶	1,51x10 ⁸	5,46x10 ⁶	6,56x10 ⁷	3,26x10 ⁷	3,29x10 ⁷	3,97x10 ⁷	2,69x10 ⁷	2,26x10 ⁷	9,69x10 ⁶
7	6,18x10 ⁵	4,38x10 ⁷		8,17x10 ⁷	2,72x10 ⁷	1,90x10 ⁷		6,49x10 ⁶		1,22x10 ⁷
8		3,87x10 ⁷	3,81x10 ⁶	6,80x10 ⁷	1,21x10 ⁷	1,63x10 ⁷	1,76x10 ⁷	6,98x10 ⁶	2,95x10 ⁶	2,05x10 ⁶
9		2,10x10 ⁷	7,01x10 ⁵	4,67x10 ⁶	3,75x10 ⁶	1,76x10 ⁷	1,97x10 ⁶	3,12x10 ⁶		4,77x10 ⁶
10		1,19x10 ⁷		4,37x10 ⁶	3,26x10 ⁶	2,71x10 ⁶	1,84x10 ⁶	2,08x10 ⁶	1,79x10 ⁶	2,89x10 ⁶
11	1,21x10 ⁶	2,38x10 ⁷		8,35x10 ⁶	1,65x10 ⁶	2,76x10 ⁶	2,65x10 ⁶	6,14x10 ⁶	2,43x10 ⁶	6,08x10 ⁶
12	1,81x10 ⁶	4,82x10 ⁶	2,88x10 ⁶	5,14x10 ⁶	1,73x10 ⁶	7,49x10 ⁶	1,54x10 ⁶	2,11x10 ⁶	1,05x10 ⁶	1,71x10 ⁶
13	2,38x10 ⁶	5,30x10 ⁶	4,32x10 ⁶	3,55x10 ⁶	1,91x10 ⁶	6,57x10 ⁶	1,57x10 ⁶	2,32x10 ⁶	2,24x10 ⁶	1,32x10 ⁶
14	2,02x10 ⁶	4,26x10 ⁶	3,19x10 ⁶	3,36x10 ⁶	1,29x10 ⁶	5,76x10 ⁶	2,35x10 ⁶	3,41x10 ⁶	1,19x10 ⁶	1,04x10 ⁶

Tabel 27. Aantal gedetecteerde blauwalgtoxine-genkopiën per ml water verkregen door qPCR. Resultaten zijn weergegeven per ronde (zie tabel 1 voor locatie beschrijving) waarin VV: de DNA-isolatie en qPCR in het veld, VL: de DNA-isolatie in het veld en qPCR in het lab, en LL: de DNA-isolatie en qPCR in het lab aanduidt. <<: de concentratie is onder de detectielimiet van 1 tot 4 genkopiën/mL voor UDetect (afhankelijk van gefiltreerd volume water) en 3,5 genkopie/mL voor lab qPCR. Lege cellen werden afgekeurd op basis van interne controle voor verder analyse.

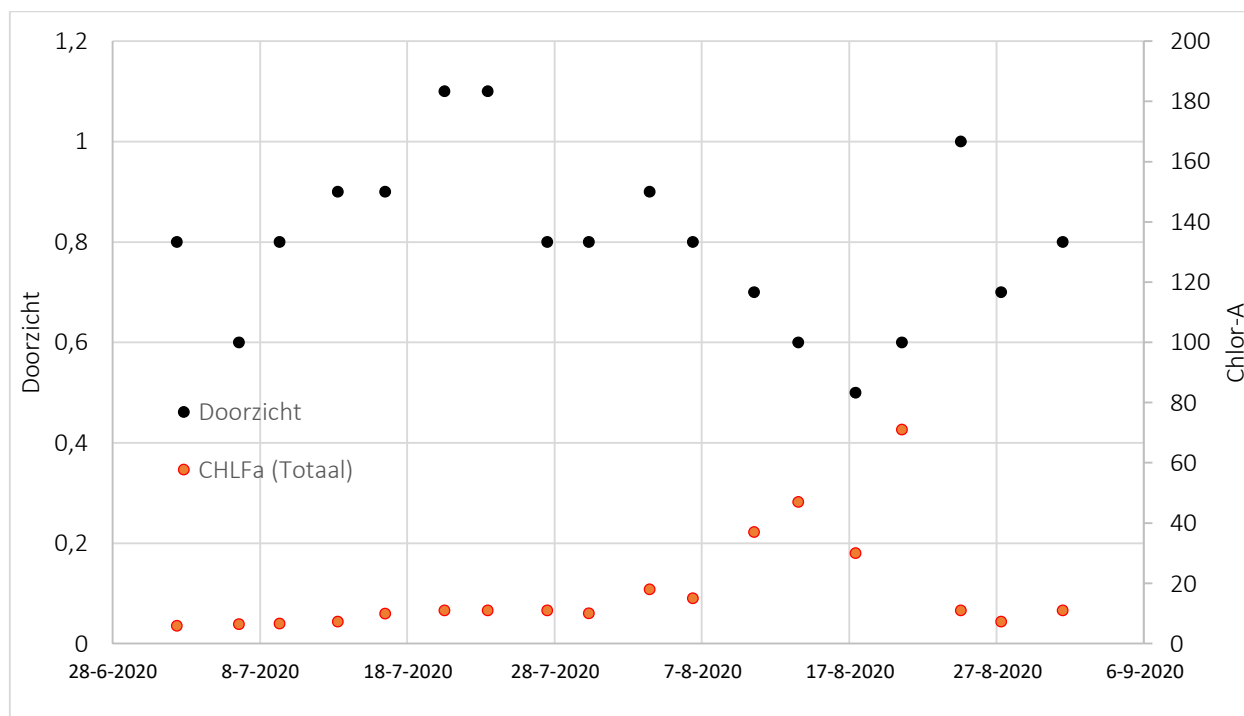
Locatie		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ronde 1	VV				<<		2,80E+02	<<				
	VL						2,70E+03	<<				3,50E+02
	LL	6,50E+03	1,70E+04	<<	0<<	1,60E+03	6,50E+04	8,00E+03	1,20E+05	9,80E+04	4,70E+04	7,50E+04
Ronde 2	VV				<<	<<	3,30E+03		3,30E+03	4,30E+01	6,40E+01	2,40E+01
	VL					<<	4,70E+03		4,60E+04	2,10E+03		
	LL	1,50E+02	1,40E+04	<<	<<	2,30E+03	4,00E+04	4,40E+03	2,50E+05	9,70E+04	4,50E+04	1,30E+05
Ronde 3	VV	<<	<<	9,70E+00	<<	8,50E+00	6,00E+02	1,20E+01	9,30E+01	9,20E+03	1,60E+01	<<
	VL	<<	<<	<<	<<	<<	1,90E+04	7,40E+02	3,30E+03	4,80E+04	1,20E+03	1,40E+02
	LL	2,60E+03	2,40E+03	1,70E+03	<<	1,50E+04	3,80E+04	1,70E+04	5,70E+04	2,80E+06	5,40E+04	3,40E+04
Ronde 4	VV	<<	1,30E+01	<<	<<	1,40E+01	4,10E+02	3,90E+01	3,40E+01	7,70E+03	<<	1,70E+01
	VL	<<	1,30E+02	<<		<<	9,80E+03		1,10E+03	1,40E+04	3,80E+03	5,80E+02
	LL	2,30E+03	5,30E+03	<<	<<	1,50E+04	3,50E+04	1,10E+04	2,60E+04	2,30E+05	1,80E+04	3,40E+04
Ronde 5	VV	<<	<<	<<	<<	6,20E+00	2,00E+02	<<	2,30E+02	3,00E+02	1,00E+02	5,40E+00
	VL	3,10E+02	2,70E+02	<<	<<	3,00E+05	4,30E+03		3,90E+03		9,70E+02	5,10E+02
	LL	2,30E+02	1,20E+03	<<	<<	1,80E+02	6,30E+03	1,10E+03	6,30E+03	2,10E+05	5,20E+04	1,90E+04

III Breda: Labmetingen overall

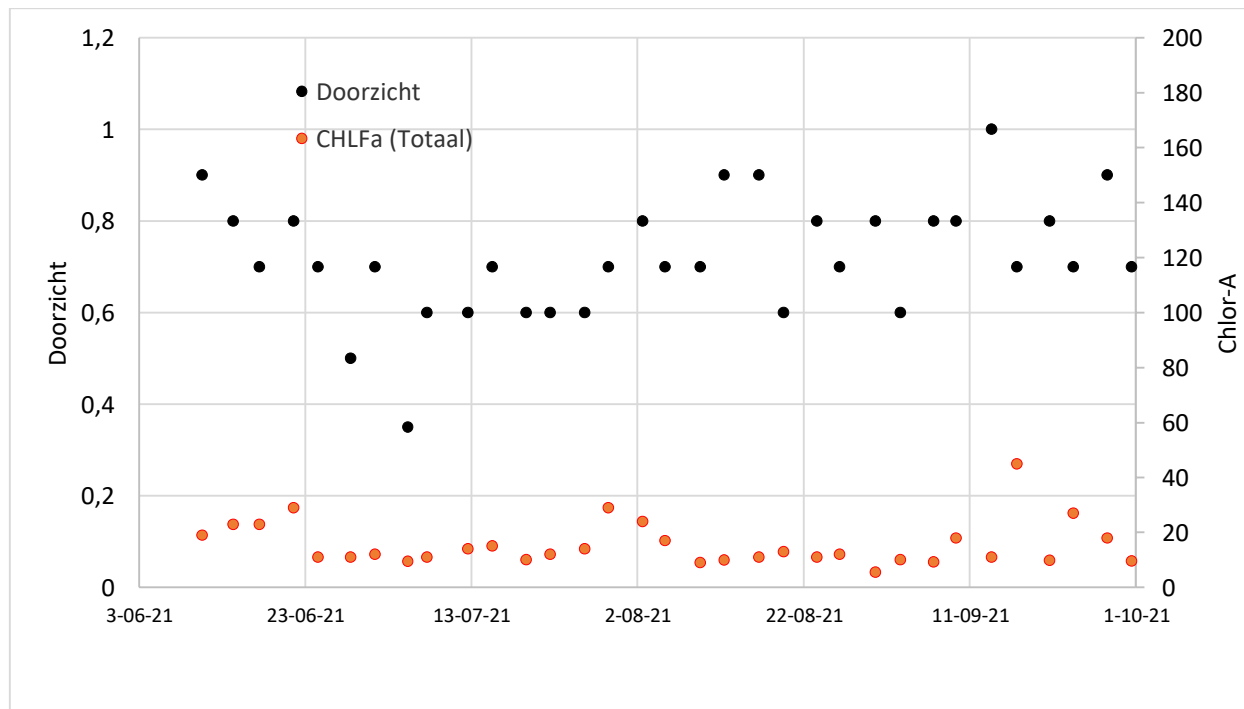


Figuur 68. Algemene labresultaten voor E. coli in 6 meetlocaties in het Singelsysteem bij Breda in jaar 2020.

Breda: Aanvullende waterkwaliteitsmetingen

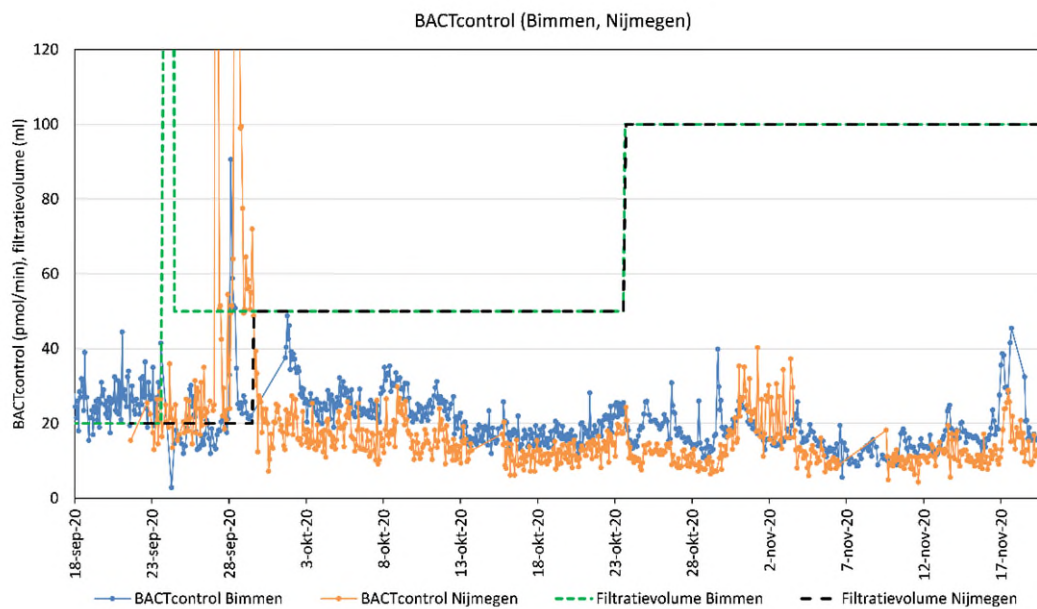


Figuur 69. Doorzicht- en chlorofylmetingen bij Passantenhaven in jaar 2020.



Figuur 70. Doorzicht- en chlorofylmetingen bij Passantenhaven in jaar 2021.

IV Spiegelwaal: BACTcontrol-resultaten met filtratievolume



Figuur 71

V Validatie: Colilert metingen

Tabel 28

Colilert				MPN/100 ml			
Datum	Oppervlaktewater	RWZI	% Rioolwater	Meting 1	Meting 2	Gem	SD
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein	1	64880,0	61310,0	63095,0	2524,4
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein	0,1	7701,0	8664,0	8182,5	680,9
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein	0,01	980,0	750,0	865,0	162,6
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein	0,001	67,7	52,9	60,3	10,5
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein	0,0001	6,3	10,8	8,6	3,2
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein	0	1,0	2,0	1,5	0,7
3-5-2021	Spiegelwaal	Houten	1	54750,0	81640,0	68195,0	19014,1
3-5-2021	Spiegelwaal	Houten	0,1	6488,0	6867,0	6677,5	268,0
3-5-2021	Spiegelwaal	Houten	0,01	697,0	613,0	655,0	59,4
3-5-2021	Spiegelwaal	Houten	0,001	67,0	72,3	69,7	3,7
3-5-2021	Spiegelwaal	Houten	0,0001	22,8	30,9	26,9	5,7
3-5-2021	Spiegelwaal	Houten	0	14,6	12,0	13,3	1,8
30-8-2022	Mosterdpot	Houten	0,1	36400,0	26900,0	31650,0	6717,5
30-8-2022	Mosterdpot	Houten	0,01	1690,0	2460,0	2075,0	544,5
30-8-2022	Mosterdpot	Houten	0,001	228,0	323,0	275,5	67,2
30-8-2022	Mosterdpot	Houten	0,0001	52,0	23,0	36,0	22,6
30-8-2022	Mosterdpot	Houten	0	16,9	19,9	18,4	2,1
31-8-2022	Strandje Rijswijk	Zeist	0,1	35900,0	35000,0	35450,0	636,4
31-8-2022	Strandje Rijswijk	Zeist	0,01	3590,0	3590,0	3590,0	0,0
31-8-2022	Strandje Rijswijk	Zeist	0,001	379,0	369,0	374,0	7,1
31-8-2022	Strandje Rijswijk	Zeist	0,0001	41,0	41,0	41,0	0,0
31-8-2022	Strandje Rijswijk	Zeist	0	10,8	15,8	13,3	3,5
7-9-2022	Rietplas	Bunnik	0,1	6570,0	7120,0	6845,0	388,9
7-9-2022	Rietplas	Bunnik	0,01	520,0	410,0	465,0	77,8
7-9-2022	Rietplas	Bunnik	0,001	98,0	160,0	129,0	43,8
7-9-2022	Rietplas	Bunnik	0,0001	25,9	35,5	30,7	6,8
7-9-2022	Rietplas	Bunnik	0	48,1	41,4	44,8	4,7
5-9-2022	Lingebos	Geldermalsen	0,1	14390,0	8860,0	11625,0	3910,3
5-9-2022	Lingebos	Geldermalsen	0,01	1220,0	1610,0	1415,0	275,8
5-9-2022	Lingebos	Geldermalsen	0,001	110,0	161,0	135,5	36,1
5-9-2022	Lingebos	Geldermalsen	0,0001	55,6	55,7	55,7	0,1
5-9-2022	Lingebos	Geldermalsen	0	43,5	58,3	50,9	10,5
1-9-2022	Drimmelen	Driebergen	0,1	18700,0	22600,0	20650,0	2757,7
1-9-2022	Drimmelen	Driebergen	0,01	3500,0	1730,0	2615,0	1251,6
1-9-2022	Drimmelen	Driebergen	0,001	246,0	243,0	244,5	2,1
1-9-2022	Drimmelen	Driebergen	0,0001	52,0	31,0	41,5	14,8
1-9-2022	Drimmelen	Driebergen	0	12,2	13,2	12,7	0,7

VI Validatie: qPCR metingen lab-KWR

Tabel 29

KWR qPCR (Lab)				Recovery IC (%)	E.coli (HsP)		Humane Bacteroides	
Datum	Oppervlaktewater	Rioolwater	% Rioolwater		Kopieën/100ml*	SD	Kopieën/100ml*	SD
22-3-2021	Tull en 't Waal (1%)	Nieuwegein	1	52	3,9E+06	1,4E+05	1,2E+07	5,0E+05
22-3-2021	Tull en 't Waal (0,1%)	Nieuwegein	0,1	57,1	3,3E+05	7,1E+03	1,3E+06	7,6E+04
22-3-2021	Tull en 't Waal (0,01%)	Nieuwegein	0,01	57,6	3,3E+04	2,8E+03	1,3E+05	9,4E+03
22-3-2021	Tull en 't Waal (0,001%)	Nieuwegein	0,001	54,3	2,8E+03	9,9E+02	1,5E+04	4,0E+03
22-3-2021	Tull en 't Waal (0,0001%)	Nieuwegein	0,0001	53,2	7,3E+02	1,9E+02	7,7E+03	7,3E+02
22-3-2021	Tull en 't Waal (0%)	Nieuwegein	0	47,2	4,7E+02	2,3E+02	5,5E+03	1,2E+03
3-5-2021	Spiegelwaal (1%)	Houten	1	59,6	4,3E+06	9,1E+04	7,8E+06	0,0E+00
3-5-2021	Spiegelwaal (0,1%)	Houten	0,1	50,9	3,3E+05	1,7E+03	7,9E+05	4,7E+04
3-5-2021	Spiegelwaal (0,01%)	Houten	0,01	46,9	3,3E+04	1,3E+03	8,7E+04	6,3E+03
3-5-2021	Spiegelwaal (0,001%)	Houten	0,001	54,7	2,8E+03	2,5E+02	7,4E+03	1,6E+02
3-5-2021	Spiegelwaal (0,0001%)	Houten	0,0001	51,8	7,3E+02	1,7E+02	1,2E+03	1,9E+02
3-5-2021	Spiegelwaal (0%)	Houten	0	54,4	4,7E+02	3,8E+01	5,8E+02	2,2E+02
30-8-2022	Mosterdpot (0,1%)	Houten	0,1	78,5	4,8E+05	2,5E+03	5,3E+05	3,1E+04
30-8-2022	Mosterdpot (0,01%)	Houten	0,01	73,7	4,8E+04	9,3E+02	4,9E+04	9,6E+03
30-8-2022	Mosterdpot (0,001%)	Houten	0,001	77,4	6,5E+03	1,0E+02	8,6E+03	3,6E+02
30-8-2022	Mosterdpot (0,0001%)	Houten	0,0001	80,5	1,6E+03	1,5E+02	2,2E+03	1,8E+01
30-8-2022	Mosterdpot (0%)	Houten	0	82,3	1,4E+03	6,4E+02	1,5E+03	1,8E+02
31-8-2022	Rijswijk (0,1%)	Zeist	0,1	65,2	6,4E+05	3,5E+04	7,3E+05	4,7E+04
31-8-2022	Rijswijk (0,01%)	Zeist	0,01	68,1	7,1E+04	5,0E+03	8,3E+04	3,8E+03
31-8-2022	Rijswijk (0,001%)	Zeist	0,001	69,2	7,0E+03	1,6E+03	7,5E+03	2,1E+03
31-8-2022	Rijswijk (0,0001%)	Zeist	0,0001	71,8	1,4E+03	2,4E+02	7,6E+02	1,4E+02
31-8-2022	Rijswijk (0%)	Zeist	0	67,1	7,5E+02	1,2E+01	4,5E+01	4,9E+01
7-9-2022	Rietplas (0,1%)	Bunnik	0,1	71,1	1,0E+05	2,8E+04	1,3E+05	5,1E+03
7-9-2022	Rietplas (0,01%)	Bunnik	0,01	54,4	2,0E+04	8,9E+03	2,0E+04	6,3E+03
7-9-2022	Rietplas (0,001%)	Bunnik	0,001	68,1	2,9E+03	5,9E+01	1,8E+03	2,1E+02
7-9-2022	Rietplas (0,0001%)	Bunnik	0,0001	76,3	1,5E+03	4,6E+01	2,2E+02	5,8E+01
7-9-2022	Rietplas (0%)	Bunnik	0	68,4	1,5E+03	5,6E+02	8,4E+01	3,8E+01
5-9-2022	Lingebos (0,1%)	Geldermalsen	0,1	51,8	3,9E+05	3,8E+04	5,2E+05	2,7E+04
5-9-2022	Lingebos (0,01%)	Geldermalsen	0,01	59,6	3,2E+04	2,2E+03	4,5E+04	2,7E+03
5-9-2022	Lingebos (0,001%)	Geldermalsen	0,001	61,9	5,3E+03	7,6E+02	5,4E+04	1,8E+03
5-9-2022	Lingebos (0,0001%)	Geldermalsen	0,0001	70,2	2,8E+03	7,1E+01	4,0E+03	4,9E+03
5-9-2022	Lingebos (0%)	Geldermalsen	0	55,1	4,1E+03	3,4E+01	3,1E+02	1,1E+01
1-9-2022	Drimmelen (0,1%)	Driebergen	0,1	33,9	8,5E+05	1,8E+05	1,1E+06	2,0E+05
1-9-2022	Drimmelen (0,01%)	Driebergen	0,01	62,4	5,9E+04	1,5E+03	8,5E+04	3,3E+03
1-9-2022	Drimmelen (0,001%)	Driebergen	0,001	66,2	5,6E+03	8,6E+02	9,4E+03	2,3E+02
1-9-2022	Drimmelen (0,0001%)	Driebergen	0,0001	70,1	1,0E+03	1,7E+01	1,3E+03	1,9E+02
1-9-2022	Drimmelen (0%)	Driebergen	0	63,9	3,5E+02	1,1E+02	4,8E+02	7,1E+00

VII Validatie: qPCR metingen lab-Deltares

Tabel 30

Deltares uidA qPCR (Lab)				E.coli	
	Oppervlaktewater	Rioolwater	% Rioolwater	Kopieën/100ml	SD
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein (Klaphek)	1	6,69E+05	2,00E+03
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein (Klaphek)	0,1	5,34E+04	1,20E+04
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein (Klaphek)	0,01	9,71E+03	2,67E+02
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein (Klaphek)	0,001	4,44E+03	1,61E+03
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein (Klaphek)	0,0001	3,27E+03	8,51E+02
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein (Klaphek)	0	4,53E+03	NA
3-5-2021	Bimmen	RWZI Houten	1	1,20E+06	8,65E+05
3-5-2021	Bimmen	RWZI Houten	0,1	6,55E+04	1,26E+04
3-5-2021	Bimmen	RWZI Houten	0,01	9,40E+03	3,39E+03
3-5-2021	Bimmen	RWZI Houten	0,001	1,51E+03	7,61E+01
3-5-2021	Bimmen	RWZI Houten	0,0001	NA	NA
3-5-2021	Bimmen	RWZI Houten	0	5,44E+02	7,70E+02
30-8-2022	Mosterdpod, Merwedestrandje	RWZI Houten	0,1	2,34E+05	3,25E+04
30-8-2022	Mosterdpod, Merwedestrandje	RWZI Houten	0,01	2,13E+04	1,51E+03
30-8-2022	Mosterdpod, Merwedestrandje	RWZI Houten	0,001	4,51E+03	2,12E+03
30-8-2022	Mosterdpod, Merwedestrandje	RWZI Houten	0,0001	2,36E+03	2,22E+02
30-8-2022	Mosterdpod, Merwedestrandje	RWZI Houten	0		
31-8-2022	Strandje Afgedamde Maas	RWZI Zeist	0,1	2,84E+05	5,81E+03
31-8-2022	Strandje Afgedamde Maas	RWZI Zeist	0,01	3,27E+04	6,43E+02
31-8-2022	Strandje Afgedamde Maas	RWZI Zeist	0,001	6,91E+03	3,68E+03
31-8-2022	Strandje Afgedamde Maas	RWZI Zeist	0,0001	4,50E+03	NA
31-8-2022	Strandje Afgedamde Maas	RWZI Zeist	0	NA	NA
7-9-2022	Rietplas	RWZI Bunnik	0,1	5,68E+04	2,80E+03
7-9-2022	Rietplas	RWZI Bunnik	0,01	5,30E+03	2,13E+03
7-9-2022	Rietplas	RWZI Bunnik	0,001	2,73E+03	#DIV/0!
7-9-2022	Rietplas	RWZI Bunnik	0,0001	1,46E+03	#DIV/0!
7-9-2022	Rietplas	RWZI Bunnik	0		
5-9-2022	Lingebos	RWZI Geldermalsen	0,1	1,64E+05	5,38E+04
5-9-2022	Lingebos	RWZI Geldermalsen	0,01	1,42E+04	2,21E+03
5-9-2022	Lingebos	RWZI Geldermalsen	0,001	3,96E+03	1,45E+03
5-9-2022	Lingebos	RWZI Geldermalsen	0,0001	2,76E+03	#DIV/0!
5-9-2022	Lingebos	RWZI Geldermalsen	0		
1-9-2022	Drimmelen, Biesboschweg	RWZI Driebergen	0,1	2,47E+05	4,11E+02
1-9-2022	Drimmelen, Biesboschweg	RWZI Driebergen	0,01	2,60E+04	7,35E+03
1-9-2022	Drimmelen, Biesboschweg	RWZI Driebergen	0,001	NA	NA
1-9-2022	Drimmelen, Biesboschweg	RWZI Driebergen	0,0001	NA	NA
1-9-2022	Drimmelen, Biesboschweg	RWZI Driebergen	0	NA	NA

VIII Validatie: BACTcontrol

Tabel 31

BACTcontrol				Bactcontrol
Datum	Oppervlaktewater	RWZI	% Rioolwater	pMol/min/100ml
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein	1	116,9
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein	0,1	15,2
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein	0,01	1,5
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein	0,001	
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein	0,0001	
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein	0	
3-5-2021	Spiegelwaal	Houten	1	198,9
3-5-2021	Spiegelwaal	Houten	0,1	16,7
3-5-2021	Spiegelwaal	Houten	0,01	2,3
3-5-2021	Spiegelwaal	Houten	0,001	1,3
3-5-2021	Spiegelwaal	Houten	0,0001	1,3
3-5-2021	Spiegelwaal	Houten	0	1,3
30-8-2022	Mosterdpot	Houten	0,1	129,5
30-8-2022	Mosterdpot	Houten	0,01	105,6
30-8-2022	Mosterdpot	Houten	0,001	102,8
30-8-2022	Mosterdpot	Houten	0,0001	60,6
30-8-2022	Mosterdpot	Houten	0	27,9
31-8-2022	Strandje Rijswijk	Zeist	0,1	813,2
31-8-2022	Strandje Rijswijk	Zeist	0,01	576,4
31-8-2022	Strandje Rijswijk	Zeist	0,001	356,8
31-8-2022	Strandje Rijswijk	Zeist	0,0001	164,6
31-8-2022	Strandje Rijswijk	Zeist	0	175,8
7-9-2022	Rietplas	Bunnik	0,1	86,4
7-9-2022	Rietplas	Bunnik	0,01	15,2
7-9-2022	Rietplas	Bunnik	0,001	21,2
7-9-2022	Rietplas	Bunnik	0,0001	38
7-9-2022	Rietplas	Bunnik	0	15,2
5-9-2022	Lingebos	Geldermalsen	0,1	55,2
5-9-2022	Lingebos	Geldermalsen	0,01	143,6
5-9-2022	Lingebos	Geldermalsen	0,001	40,4
5-9-2022	Lingebos	Geldermalsen	0,0001	74
5-9-2022	Lingebos	Geldermalsen	0	30
1-9-2022	Drimmelen	Driebergen	0,1	304,8
1-9-2022	Drimmelen	Driebergen	0,01	222
1-9-2022	Drimmelen	Driebergen	0,001	200
1-9-2022	Drimmelen	Driebergen	0,0001	242,4
1-9-2022	Drimmelen	Driebergen	0	143,6

IX Validatie: Udetect

Tabel 32

	Oppervlaktewater	Rioolwater	% Rioolwater	Colilert		Udetect (Deltares)			
				Gem	SD	E. coli Kopieën/100ml		Humane Bacteroides Kopieën/100ml	
						SD		SD	
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein (Klaphek)	1	63095,0	2524,4	8,46E+03	2,45E+03	2,02E+07	2,45E+03
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein (Klaphek)	0,1	8182,5	680,9	4,97E+02	2,04E+02	2,05E+06	2,04E+02
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein (Klaphek)	0,01	865,0	162,6	1,72E+02	0,00E+00	2,59E+05	0,00E+00
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein (Klaphek)	0,001	60,3	10,5	8,33E+01	1,18E+02	3,26E+04	1,18E+02
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein (Klaphek)	0,0001	8,6	3,2			1,33E+04	
22-3-2021	Tull en 't Waal	Nieuwegein (Klaphek)	0	1,5	0,7			2,16E+04	
3-5-2021	Bimmen	RWZI Houten	1	68195,0	19014,1	9,44E+03		1,17E+05	
3-5-2021	Bimmen	RWZI Houten	0,1	6677,5	268,0	1,39E+03		1,55E+04	
3-5-2021	Bimmen	RWZI Houten	0,01	655,0	59,4	2,29E+02		1,83E+03	
3-5-2021	Bimmen	RWZI Houten	0,001	69,7	3,7	7,35E+01		3,48E+02	
3-5-2021	Bimmen	RWZI Houten	0,0001	26,9	5,7				
3-5-2021	Bimmen	RWZI Houten	0	13,3	1,8				
30-8-2022	Mosterdpod, Merwedestrاندje	RWZI Houten	0,1	31650,0	6717,5	3,75E+04	7,78E+03	2,00E+05	0,00E+00
30-8-2022	Mosterdpod, Merwedestrاندje	RWZI Houten	0,01	2075,0	544,5	3,60E+03	5,66E+02	1,45E+05	1,49E+05
30-8-2022	Mosterdpod, Merwedestrاندje	RWZI Houten	0,001	275,5	67,2	1,00E+02	1,41E+02	1,10E+04	1,13E+04
30-8-2022	Mosterdpod, Merwedestrاندje	RWZI Houten	0,0001	36,0	22,6	5,00E+02	1,41E+02	2,70E+03	2,55E+03
30-8-2022	Mosterdpod, Merwedestrاندje	RWZI Houten	0	18,4	2,1	1,00E+02	1,41E+02	4,55E+03	2,19E+03
31-8-2022	Strandje Afgedamde Maas	RWZI Zeist	0,1	35450,0	636,4	3,40E+04	2,83E+03	2,05E+05	2,12E+04
31-8-2022	Strandje Afgedamde Maas	RWZI Zeist	0,01	3590,0	0,0	3,90E+03	1,41E+03	3,60E+04	1,56E+04
31-8-2022	Strandje Afgedamde Maas	RWZI Zeist	0,001	374,0	7,1	5,50E+02	7,07E+01	3,70E+03	9,90E+02
31-8-2022	Strandje Afgedamde Maas	RWZI Zeist	0,0001	41,0	0,0	2,50E+02	7,07E+01	1,05E+03	1,48E+03
31-8-2022	Strandje Afgedamde Maas	RWZI Zeist	0	13,3	3,5	1,50E+02	7,07E+01		0,00E+00
7-9-2022	Rietplas	RWZI Bunnik	0,1	6845,0	388,9	4,03E+04	1,27E+03		
7-9-2022	Rietplas	RWZI Bunnik	0,01	465,0	77,8	4,30E+03	5,66E+02	2,37E+05	1,20E+05
7-9-2022	Rietplas	RWZI Bunnik	0,001	129,0	43,8	3,50E+02	3,54E+02	3,81E+04	4,85E+03
7-9-2022	Rietplas	RWZI Bunnik	0,0001	30,7	6,8			7,78E+03	4,01E+03
7-9-2022	Rietplas	RWZI Bunnik	0	44,8	4,7			1,11E+04	9,46E+03
5-9-2022	Lingebos	RWZI Geldermalsen	0,1	11625,0	3910,3	1,09E+04	7,07E+02	9,25E+04	7,16E+03
5-9-2022	Lingebos	RWZI Geldermalsen	0,01	1415,0	275,8	1,75E+03	7,07E+01	1,14E+04	1,96E+03
5-9-2022	Lingebos	RWZI Geldermalsen	0,001	135,5	36,1	2,00E+02		7,62E+02	#DIV/0!
5-9-2022	Lingebos	RWZI Geldermalsen	0,0001	55,7	0,1			7,65E+02	1,68E+01
5-9-2022	Lingebos	RWZI Geldermalsen	0	50,9	10,5			9,68E+02	1,23E+03
1-9-2022	Drimmelen, Biesboschweg	RWZI Driebergen	0,1	20650,0	2757,7	2,20E+03	1,41E+02	3,10E+04	4,24E+03
1-9-2022	Drimmelen, Biesboschweg	RWZI Driebergen	0,01	2615,0	1251,6	8,00E+02	#DIV/0!	4,85E+03	2,12E+02
1-9-2022	Drimmelen, Biesboschweg	RWZI Driebergen	0,001	244,5	2,1			5,50E+02	7,07E+01
1-9-2022	Drimmelen, Biesboschweg	RWZI Driebergen	0,0001	41,5	14,8	6,00E+02		1,50E+02	2,12E+02
1-9-2022	Drimmelen, Biesboschweg	RWZI Driebergen	0	12,7	0,7	2,00E+02			