A network diagram consisting of various sized light blue circles connected by thin white lines, set against a solid blue background. The circles vary in size, with some being significantly larger than others, and they are interconnected in a complex, non-linear fashion.

Bedrijfstakonderzoek  
BTO 2022.016 | Maart 2022

**Opsporing van fecale  
besmettingsbronnen in  
grondwaterwinningen  
met multi-tracing  
technieken:**

**casus Roodborn**

Bedrijfstakonderzoek

**KWR**

Bridging Science to Practice



# Rapport

## Opsporing van fecale besmettingsbronnen in grondwaterwinningen met multi-tracing technieken: casus Roodborn

BTO 2022.016 | Maart 2022

Dit onderzoek is onderdeel van het collectieve Bedrijfstakonderzoek van KWR, de waterbedrijven en Vewin.

### Opdrachtnummer

402045-014

### Projectmanager

ir. M.L. (Martin) van der Schans

### Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Bronnen en omgeving

### Auteurs

Dr. P. (Peer) Peer Timmers, ir. M.L. (Martin) van der Schans

### Kwaliteitsborgers

Dr. N. (Niels) Hartog, Dr. ir. D.G. (Gijsbert) Cirkel

### Projectbegeleiding

Dipl. Geol. R. (Renard) Prevoo (WML)

### Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

### Keywords

Multitracing, Source tracking, qPCR, NGS, Roodborn

### Jaar van publicatie

2022

### Meer informatie

ir. M.L. (Martin) van der Schans

T +31 30 606 9537

E martin.van.der.schans@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



Maart 2022 ©

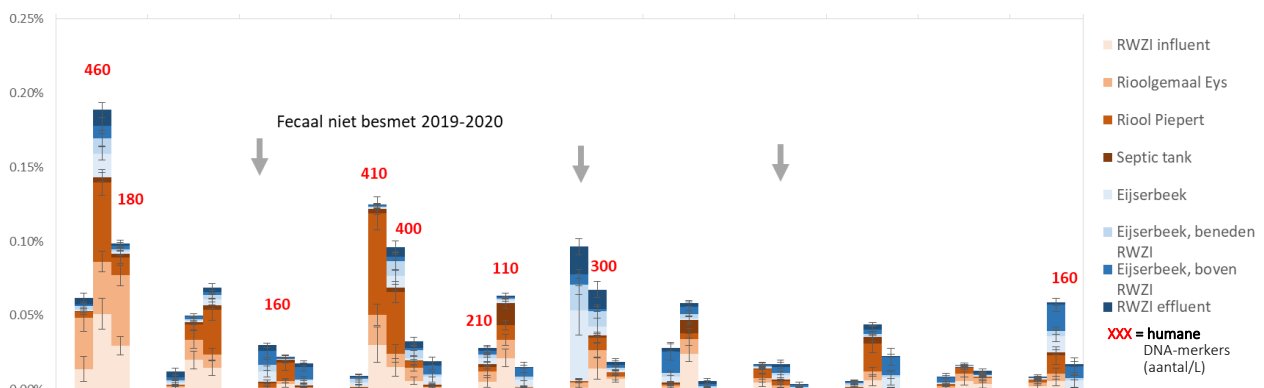
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen,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

# Managementsamenvatting

## Opsporing van fecale besmettingsbronnen in grondwaterwinningen met multi-tracing technieken: casus Roodborn

**Auteurs** Dr. P. (Peer) Peer Timmers, ir. M.L. (Martin) van der Schans.

De afgelopen jaren zijn verschillende moleculair biologische technieken ontwikkeld om fecale verontreinigingsbronnen te identificeren en karakteriseren. Het doel van dit onderzoek was om in beeld te brengen of twee van deze technieken, MST-qPCR en MST-NGS, toepasbaar zijn in combinatie met chemische tracers bij grondwaterwinningen. De meerwaarde van deze “multi-tracing” aanpak is onderzocht door middel van een casus op een winning (Roodborn) welke regelmatig kampt met fecale besmettingen. Uit het onderzoek bleek dat de methoden elkaar verrijkten: de chemische tracers geven vooral inzicht in herkomst en mengverhoudingen, terwijl de moleculair biologische technieken inzicht gaven in de herkomst van besmettingen.



*Procentuele bijdrage van rioolwaterbronnen (bruin) en oppervlaktewater (blauw) aan het DNA profiel van de winputten volgens analyses met de MST-NGS.*

### Belang: detectie van fecale bronnen

De monitoring van de microbiologische veiligheid van grondwaterwinningen is momenteel gebaseerd op een beperkte groep kweekbare indicator-organismen zoals *E. coli*. Om fecale besmettingsbronnen op te sporen zijn afgelopen decennium alternatieve moleculaire methoden ontwikkeld die gebruik maken van andere fecale indicator-organismen die in hogere concentraties in besmettingsbronnen voorkomen. Dit vergroot de pakkans. Deze methoden geven bovendien extra informatie over de besmettingsbron en worden daarom aangeduid als “microbial source tracking” (MST). In dit onderzoek is gefocussed op qPCR en next generation sequencing (NGS). Beide MST methoden zijn tot nu toe vooral getest op oppervlaktewater en duinwaterwinningen.

### Aanpak: qPCR en NGS-monsters

Voor dit onderzoek zijn waterkwaliteitsmonsters genomen in besmette winputten, niet besmette winputten (samen aangeduid als “Sinks”) en verschillende bronnen rondom de winning waaronder oppervlaktewater, riolering, RWZI en waarnemingsputten in natuur- en landbouwgebied (aangeduid als “Sources”). De monsters zijn geanalyseerd op chemische parameters (nutriënten, macro-ionen, sporenmetalen, organische microverontreinigingen), traditionele fecale indicator organismen (zoals *E. coli*) en moleculair biologische parameters (qPCR op mens, hond, herkauwer, vogel en varken DNA-merkers en met next generation sequencing). Vervolgens is de bijdrage van de Sources aan de Sinks bepaald door analyse van de mengverhoudingen.

### Resultaten: besmetting uit beek

Natuurlijke tracers (bromide/chloride verhouding) en een eerdere kunstmatige tracerproef toonden aan dat de minimale reistijd vanaf de beekoever naar één van de winputten slechts enkele dagen bedroeg, door het optreden van preferente stroombanen in de kalksteen. De MST-qPCR en MST-NGS toonden aan dat een aantal winputten humaan besmet water bevatten dat afkomstig is van de Eijserbeek. De beek wordt op haar beurt gevoed door een combinatie van RWZI effluent, riooloverstorten en runoff van dierlijke feces vanaf het maaiveld rondom de beek. De MST-NGS resultaten geven aan dat er meer putten in Roodborn rioolwater bacteriën bevatten dan blijkt op basis van de traditionele indicatororganismen die WML (en andere waterbedrijven) regulier meten. De metingen sluiten overigens niet uit dat er ook besmetting plaatsvindt vanuit andere bronnen.

### Toepassing: moleculair biologische en chemische tracers verrijken elkaar

De MST methoden leverden een verrijking ten opzichte van de informatie verkregen uit de kunstmatige en natuurlijke chemische tracers. Ze zijn daarom samen goed bruikbaar voor het opsporen

van fecale besmettingsbronnen rondom grondwaterwinningen. De natuurlijke chemische tracers gaven namelijk vooral inzicht in de herkomst van de totale hoeveelheid onttrokken grondwater. De moleculair MST methoden leverden vooral inzicht in welke bronnen waarschijnlijk een grote bijdrage leveren aan de populatie micro-organismen.

Wij adviseren de drinkwatersector om de MST methoden verder te ontwikkelen, zodat ze een grotere zeggingskracht krijgen en goedkoper worden om grootschalig toe te passen. Dit kan door:

- Herhaling van de qPCR analyse op Roodborn voor humane virussen in plaats van Bacteriën.
- Validatie van de toepasbaarheid van de fecale indicator qPCR en MST-NGS bij waarden rond de detectielimiet in grondwater (na bodempassage).
- Ontwikkelen van een MST-qPCR methode specifiek voor rioolwater en RWZI effluent.

### Het rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Opsporing van fecale besmettingsbronnen in grondwaterwinningen met multi-tracing technieken: casus Roodborn* (BTO-2022.016).

#### Meer informatie

ir. M.L. (Martin) van der Schans  
T +31 30 606 9537  
E martin.van.der.schans@kwrwater.nl

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands



# Inhoud

<b>Rapport</b>	<b>2</b>
<b><i>Managementsamenvatting</i></b>	<b>3</b>
<b>Inhoud</b>	<b>5</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>6</b>
1.1 Aanleiding	6
1.2 Doel en scope	8
1.3 Leeswijzer	8
<b>2 Materialen en methoden</b>	<b>9</b>
2.1 Gebiedsbeschrijving Winning Roodborn	9
2.2 Microbiologische besmettingen op Roodborn	10
2.3 Meetlocaties	12
2.4 Monsternamen	13
2.5 Filtratie en labanalyse	13
2.6 Database waterkwaliteit	13
2.7 Interpretatie	14
<b>3 Resultaten</b>	<b>16</b>
3.1 Microbiologische waterkwaliteitsparameters	16
3.2 Anorganische waterkwaliteitsparameters	17
3.3 Organische microverontreinigingen (OMV's)	20
3.4 MST-qPCR	21
3.5 NGS-analyse	23
3.6 MST-NGS	25
3.7 Analyse unieke NGS features in septic tank	28
3.8 Relatie MST-NGS en MST-qPCR	29
<b>4 Discussie</b>	<b>30</b>
4.1 Verwijderingsrendement RWZI-Simpelveld	30
4.2 Herkomst besmettingen Eijserbeek	30
4.3 Herkomst besmettingen ondiepe grondwater	31
4.4 Herkomst besmetting winputten	31
4.5 Oplossingsrichtingen	33
4.6 Meerwaarde van multitracing	34
<b>5 Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>35</b>
5.1 Conclusies	35
5.2 Aanbevelingen voor WML	36
5.3 Aanbevelingen voor nader onderzoek	38
<b>6 Referenties</b>	<b>39</b>
<b>I MST-qPCR resultaten</b>	<b>40</b>

# 1 Inleiding

## 1.1 Aanleiding

### 1.1.1 Waarom microbial source tracking (MST)

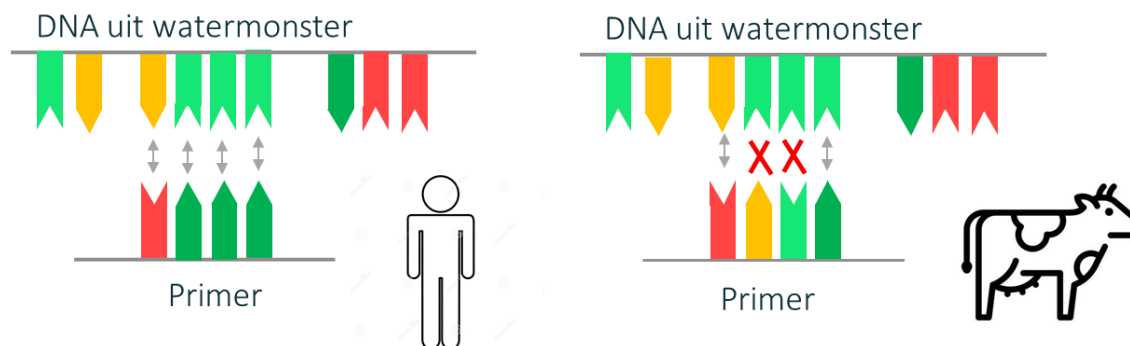
Drinkwaterbedrijven baseren de monitoring van de microbiologische veiligheid van grondwaterwinningen op een beperkte groep kweekbare indicatororganismen zoals *E. coli*. Deze indicatororganismen zijn vaak in hogere concentraties aanwezig in de darmen en makkelijker te meten dan pathogenen zelf. Hun aanwezigheid in drinkwater vormt een indicatie dat er een kans is op aanwezigheid van pathogenen. De indicatororganismen vormen echter maar een klein aandeel van de van nature in de darmen aanwezige populatie micro-organismen en komen daardoor meestal slechts in lage concentraties en sporadisch voor in grondwater. Dit maakt het lastig om een besmetting te detecteren. Afgelopen decennium zijn daarom meerdere “microbial source tracking” (MST) methoden ontwikkeld om fecale besmettingsbronnen te karakteriseren. Deze methoden maken gebruik van bacteriën en bacterie-groepen die specifiek zijn voor een bepaalde besmettingsbronnen en welke bovendien in hogere aantallen voorkomen in fecale besmettingsbronnen dan de traditionele indicatororganismen. MST-methoden beogen het dus eenvoudiger te maken om de bron van besmettingen op te sporen en kunnen ook helpen om de pakkans van een besmetting te vergroten.

### 1.1.2 MST-qPCR

“Microbial source tracking qPCR” (MST-qPCR) is een source tracking methode gebaseerd op “quantitative Polymerase Chain Reaction” (qPCR). Een qPCR is gericht op het kwantificeren van de hoeveelheid DNA-materiaal dat een specifieke volgorde van baseparen (=doelsequentie) bevat. Dit gebeurt door alleen DNA-materiaal met de doelsequentie te amplificeren (=kopiëren). De “primer”, die aan het monster wordt toegevoegd, bepaalt welke sequenties worden geamplificeerd en vervolgens gedetecteerd. De MST-qPCR is gericht op het detecteren en kwantificeren van DNA-sequenties (“DNA-merkers”) die specifiek zijn voor fecale indicatororganismen en die in grote aantallen in feces van mensen en dieren voorkomen, zoals *Bacteroides* en *Helicobacter* bacteriën. Overigens wordt in sommige gevallen (bijvoorbeeld voor honden) niet alleen gebruik gemaakt van bacteriën die in feces voorkomen, maar worden ook DNA-sequenties van het dier zelf meegenomen.

Afgelopen jaren zijn MST-qPCR ontwikkeld die specifiek gericht zijn op het detecteren van fecale indicatorsoorten afkomstig van herkauwers, vogels, honden, mensen, varkens of runderen (Layton et al., 2006; Heijnen & Learbuch, 2013; Lee et al., 2014; Heijnen, 2015b; Heijnen, 2015a; Jardé et al., 2018). Een MST-qPCR geeft dus informatie over het aantal DNA-merkers dat in een monster aanwezig is en toebehoren aan een bepaalde diersoort of mens. Delen van dit aantal DNA-merkers door het in bewerking genomen monstervolume geeft een indicatie van de concentratie. Een MST-qPCR levert dus niet alleen indicatie of water besmet is, maar ook van welke type dier (of mens) de besmetting afkomstig is.

De MST-qPCR zijn afgelopen jaren regelmatig getest en toegepast. Ze worden in delen van Nederland bijvoorbeeld al sinds 2014 routinematig ingezet bij de monitoring van zwemwater (Heijnen et al., 2014). Ook bij bronopsporing van herbesmetting van duinwater vanaf het maaiveld is de meerwaarde van deze methode aangetoond (Heijnen et al. 2015a).



*Figuur 1-1. Illustratie van het meetprincipe van MST-qPCR. In dit voorbeeld passen de baseparen van het DNA uit het watermonster wel op de primer "humaan" (links) maar niet op de primer rund (rechts). In de vervolgstappen van de lab-analyse zullen daardoor alleen de humane baseparen door amplificaties vermeerderd worden en uiteindelijk gedetecteerd.*

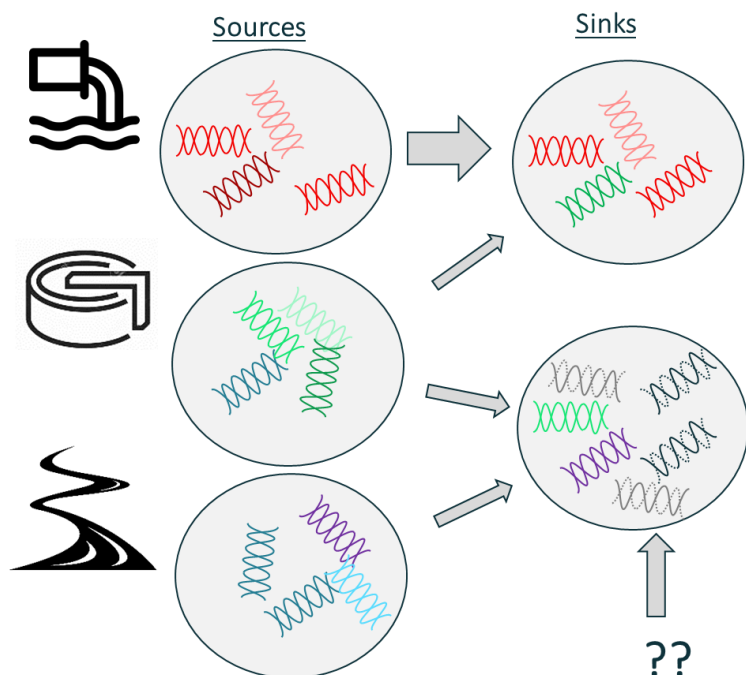
### 1.1.3 MST-NGS

Wanneer eenmaal met een MST-qPCR is aangetoond dat mensen of een bepaald type dieren verantwoordelijk is voor besmetting, dan rijst vaak de vraag wat de exacte bron van de besmetting is. Feces van mensen en herkauwers kunnen bijvoorbeeld afkomstig zijn van meerdere locaties zoals ontlasting aan maaiveld, lekke riolering, riooloverstorten of RWZI-effluent. Microbial Source Tracking met Next Generation Sequencing (MST-NGS) is een techniek die kan bijdragen om de bron van de besmetting te achterhalen.

Bij MST-NGS wordt eerst de sequentie bepaald van DNA-nucleïnezuren van de gehele microbiële gemeenschap van zowel de verschillende mogelijke bronnen ("sources", bijvoorbeeld oppervlaktewater, riolering, ondiep grondwater, etc.) als locaties waar de bronnen op uitkomen ("sinks", bijvoorbeeld winputten). Vervolgens wordt vastgesteld wat de bijdrage is van het DNA van de verschillen bronnen aan het DNA-signaal in de sinks (Knights et al., 2011). NGS-MST maakt gebruik van Bayesiaanse statistiek om een schatting te maken welk aandeel van de microbiologische populatie in een microbiële gemeenschap (sink) afkomstig van de bekende bronnen (source). De invoergegevens zijn dus het NGS-profiel (=DNA van microbiologische populatie) van zowel het verontreinigde grondwatermonster (de sink) als de verschillende potentiële bronnen (sources) en de uitvoer is welk aandeel (percentage) de verschillende sources bijdragen aan een sink.

De MST-NGS methode is eerder binnen KWR getest op drinkwatermonsters door in verschillende mate oppervlaktewater toe te voegen (Heijnen et al, in prep.). Drinkwater bevat beduidend minder bacteriën dan oppervlaktewater, waardoor menging een groot effect heeft op de microbiële gemeenschap. Bijmenging van 10% oppervlaktewater met drinkwater resulteerde daarom in een zodanig sterke verandering van het microbiële profiel, dat MST-NGS voorspelde dat de bron (source) van het drinkwatermonster (sink) voor 77% uit bacteriën van oppervlaktewater bestond. Toepassing van NST-NGS op drinkwater met 0.1% oppervlaktewater resulteerde in een 5% voorspelde bijdrage van oppervlaktewater aan het microbiële profiel. In Nederland is deze techniek ook op praktisch schaal toegepast om te achterhalen of humane fecale besmettingen in oppervlaktewater vooral afkomstig waren van rioolwater of RWZI's (Timmers et al., 2020; Timmers, 2021). De techniek is voor zover bekend nog niet eerder toegepast op grondwaterwinningen.





*Figuur 1-2. Illustratie van het meetprincipe van MST-NGS. Eerst worden de DNA sequenties van alle watermonsters (zowel Sources als Sinks) bepaald. Vervolgens wordt voor elk van de Sinks berekend welke mengverhouding van de Sources het meest waarschijnlijk is, gegeven de onderlinge verhoudingen van verschillende DNA sequenties. In dit voorbeeld bestaat de bovenste Sink hoofdzakelijk uit rioolwater bacteriën (rood) en RWZI effluent bacteriën (groen). De onderste Sink bestaat uit RWZI effluent bacteriën (groen), beekwater bacteriën (blauw) en een onbekende bron van bacteriën (grijs).*

## 1.2 Doel en scope

De drinkwaterbedrijven willen weten of de MST-qPCR en MST-NGS ook toepasbaar zijn voor grondwaterwinningen. Het is bijvoorbeeld de vraag of de DNA-merkers en het DNA-profiel wel voldoende stabiel zijn tijdens bodempassage of dat ze teveel beïnvloed worden door inactivatie en hechting in de bodem. Daarnaast is het de vraag of de methoden gevoelig en betrouwbaar genoeg zijn. Daarom is binnen het collectieve bedrijfstakonderzoek een pilot uitgevoerd om bovengenoemde technieken te testen op de winning Roodborn van WML. Deze kalksteenwinning kampt regelmatig met fecale besmettingen, maar de oorzaak is niet goed bekend.

Het doel van dit onderzoek was het testen van de toepasbaarheid van MST-qPCR en MST-NGS op fecaal besmette grondwaterwinningen. We doen dit aan de hand van een onderzoek naar de bronnen van fecale besmettingen in de periode 2019-2020 op winning Roodborn. De uitkomsten vergelijken we met resultaten van onderzoeken met andere natuurlijke hydrologische tracers.

## 1.3 Leeswijzer

In deze rapportage geven we eerst een overzicht van de geohydrologische setting van de winning en de werkwijze (hoofdstuk 2). Vervolgens presenteren we de resultaten (hoofdstuk 3) en bediscussiëren we de toepasbaarheid van het onderzoek (hoofdstuk 4). Op basis hiervan trekken we tot slot conclusies over de besmettingsbronnen op Roodborn. In het rapport staan genummerde verwijzingen naar aanbevelingen. De aanbevelingen 1 tot en met 9 zijn specifiek voor de winning Roodborn van WML en staan bij de conclusies in hoofdstuk 5. De overige aanbeveling zijn generiek voor toegepast wetenschappelijk onderzoek en zijn ook vermeld in de managementsamenvatting.

## 2 Materialen en methoden

### 2.1 Gebiedsbeschrijving Winning Roodborn

Pompstation Roodborn ligt bij het gehucht Piepert op een hoogte van NAP +101.5 m (range NAP +97.1 tot +110.7 m) en wordt doorsneden door de Eijserbeek. De winning omvat 14 winputten die in de periode 2016-2020 jaarlijks samen 4.12 Mm<sup>3</sup> water onttrekken uit de kalksteenformatie van Gulpen in het dieptetraject van (gemiddeld) NAP +65.5 en + 86.9 m (Figuur 2-1, boven). De putten zijn uitgevoerd zonder omstorting en filterbuis. Om kortsluitstroming vanaf maaiveld te voorkomen, is het bovenste deel van de boorgaten afgeblind met een casing, is de annulaire ruimte afgedicht met een kleiprop en staan de putten in een putkelder. De blinde buizen reiken gemiddeld tot 15.0 m beneden maaiveld (range 10.0 tot 19.2 m-mv).

Rondom de Eijserbeek bestaat de eerste 2.5 m beneden maaiveld uit Holocene en Pleistocene lemige afzettingen (löss en beekleem). De beek is vermoedelijk deels ingesneden in een daaronder liggende dunne grindlaag welke bovenop de kalksteenformatie is gelegen. De fijne sedimentdeeltjes die zich in de loop van de tijd op de beekbodem hebben afgezet vormen dan de enige weerstandbiedende laag tussen de Eijserbeek en de grindafzettingen. Het gros van de tijd ligt de freatische grondwaterstand in of net boven deze grindlaag. Vanuit de grindlaag, met een dikte van ongeveer 1 meter, zijn er waarschijnlijk directe hydraulische verbindingen met de onderliggende kalksteen. Deze kalksteen is bovenin sterk verkarst (gespleten) (Cirkel & Prevoo, 2015; Cirkel et al., 2018).

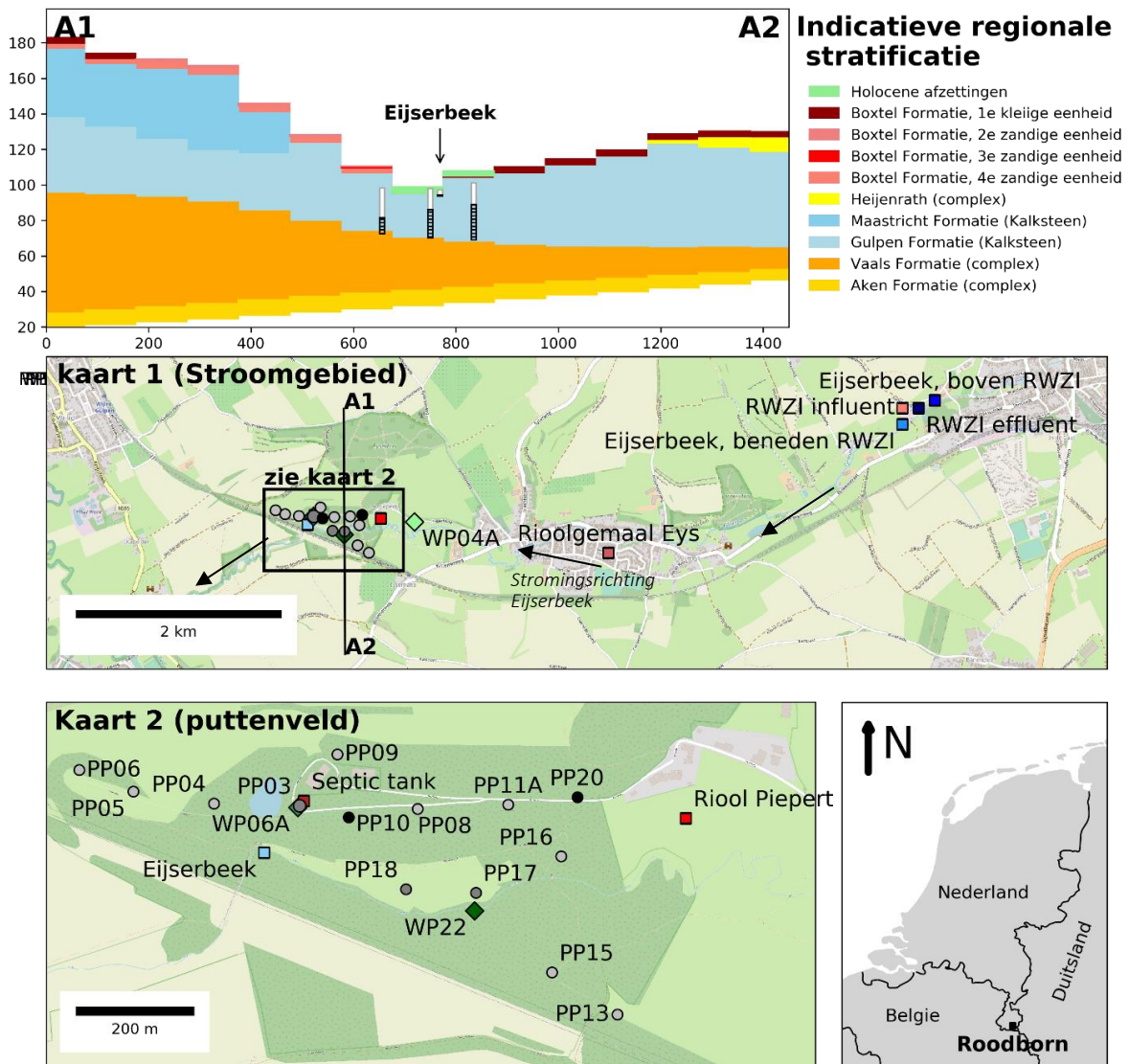
Uit debietmetingen van Ullmann (2012) bleek dat de Eijserbeek ter plaatse van winning Roodborn op sommige locaties infiltreert en tegelijk op andere locaties draineert. Het patroon waar infiltratie/ drainage plaatsvond hing vermoedelijk samen met welke putten waren aangeschakeld. Bij een hoog waterniveau in de beek (door hoge afvoer) vindt meer infiltratie plaats. Afhankelijk van de tijd van het jaar en de bedrijfssituatie van de nabijgelegen putten werkt de Eijserbeek drainerend of infiltrerend op het watervoerende pakket. Het gebied direct naast de beek dat bij piekafvoer inundeert kent een verticale doorlatendheden aan maaiveld van 0.12 tot 23.6 m/d, volgens 29 ring-infiltratiemetingen uitgevoerd door Meshnik (2012).

De reistijd tussen de beek en winputten is vermoedelijk beperkt door de korte onderlinge afstand, hoge doorlatendheid en verhang van enkele meters tussen beek en putten die in bedrijf zijn. In 2014 is een tracerproef uitgevoerd waarbij een bromideoplossing is gedoseerd in een waarnemingsput naast de Eijserbeek (WP22). De eerste tracerdoorbraak in de naastgelegen winput PP17 bleek plaats te vinden na circa 2 dagen. Binnen 60 dagen na doseren was 28% van het gedoseerde bromide in de put aangekomen. De snelle doorbraak leek te bestaan uit twee componenten met een gemiddelde transporttijd van respectievelijk 10 en 25.6 dagen. Het optreden van verschillende stroomsystemen kon verklaard worden doordat er stroming optreedt via zowel het (snelle) karststelsel als via de tragere kalkmatrix (Cirkel & Prevoo, 2015; Cirkel et al., 2018).

De Eijserbeek (gemiddelde afvoer 6912 m<sup>3</sup>/dag) wordt met name in droge perioden voor een belangrijk deel gevoed met effluent uit de rioolwaterzuivering (RWZI) bij Simpelveld. Daarnaast zijn er diverse riooloverstorten die bij intensieve buien rioolwater lozen op de beek (mondelijke mededeling WBL). Door WML (2015) is geconstateerd dat microbiologische besmetting van de putten met name optrad na hoge afvoer van de beek. Om de hoeveelheid infiltrerend besmet beekwater te beperken worden daarom sinds 2018 bij hoge beekafvoeren de putten die direct naast de beek liggen (PP16, PP17 en PP18) tijdelijk uitgeschakeld (Van Driel, 2018).

Het landgebruik in het stroomgebied van de Eijserbeek bestaat uit bebouwd gebied, akkerbouw, grasland, en bos/natuur (Figuur 2-1, midden). Het intrekgebied van de winning omvat, naast de Eijserbeek, landbouwgrasland, bos,

kalkgrasland, de bebouwing van het gehucht Piepert, een zuiveringsgebouw (met cascadebeluchting) en het kantoorgebouw van het pompstation inclusief een septictank gelegen nabij PP03 (Figuur 2-1, onder).

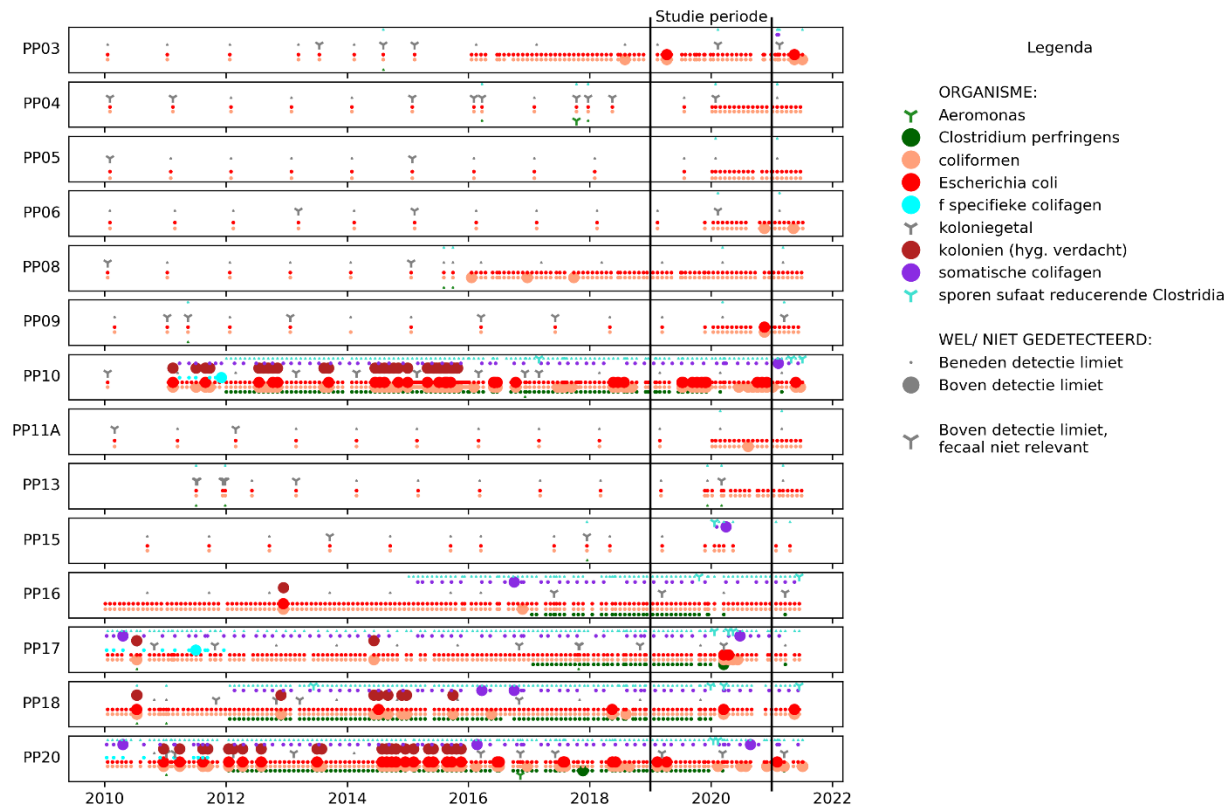


Figuur 2-1. Geologisch dwarsprofiel (boven) en ligging van de meetpunten bij pompstation Roodborn (midden en onder) Bron kaart: Topografische dienst, bron dwarsdoorsnede: REGIS II v2.2 (TNO, 2020). Legenda landgebruik: akkerbouw = beige; grasland = lichtgroen, bos= donkergroen, bebouwd gebied = grijs.

## 2.2 Microbiologische besmettingen op Roodborn

Uit de reguliere microbiologische monitoring van WML blijkt dat in de periode rond de veldmetingen (2019 – 2020) in de winputten PP10 en PP20 meerdere malen fecale indicatororganismen (FIO's) coliformen en *E. coli* boven de detectielimiet zijn aangetroffen (Figuur 2-2). Dit is in lijn met afgelopen decennium toen in beide putten ook verhoudingsgewijs frequent, bij respectievelijk 23% en 29% van de bemonsteringen, FIO's zijn aangetroffen (Tabel 2-1). In de PP03, PP06, PP09, PP11A, PP15, PP16, PP17 en PP18 zijn minder frequent FIO's gedetecteerd. De daling van de gemiddelde concentraties in PP16, PP17 en PP18 afgelopen jaren is mogelijk een gevolg van aanpassingen in het schakelschema, waardoor deze putten bij hoogwater automatisch uitschakelen. De FIO's in PP04, PP05, PP08, PP13 en PP16 waren tussen 2019 en 2020 beneden de detectielimiet. Dit betekent echter niet dat deze winputten microbiologisch veilig zijn. De detectielimiet van de indicatororganismen is namelijk meerdere ordes hoger dan de

maximaal toelaatbare concentratie pathogenen van  $5.7 \cdot 10^{-7} \text{ L}^{-1}$ . Dit laatste uitgaande van een maximaal toelaatbaar infectierisico van  $10^{-4} \text{ jaar}^{-1}$  en een drinkwaterconsumptie van  $175 \text{ L} \cdot \text{jaar}^{-1}$  (ILT, 2019). Om het infectierisico te beperken wordt het water voor levering als drinkwater gezuiverd met UV-desinfectie. Deze zuiveringsstap vindt plaats op een locatie buiten Roodborn.



Figuur 2-2. Overzicht van welke microbiologische indicatororganismen boven- en onder de detectielimiet zijn aangetroffen. Metingen boven de detectielimiet zijn aangegeven met een grote cirkel voor fecale indicatorsoorten of driepunt voor overige indicatoren. De kleur geeft aan welk organisme is gemeten.



## 2.4 Monstername

Alle meetlocaties zijn tenminste drie maal bemonsterd door Aqualab Zuid op 27, 28 of 29 november 2019 (=meetronde 1), 2 of 3 december (=meetronde 2), en 4 of 5 december (=meetronde 3). WP22 is één keer extra bemonsterd in meetronde 1 en PP09 is dubbel bemonsterd in meetronde 2 en 3.

De beekafvoer was gemiddeld tijdens monstername. De winputten waren voorafgaand aan monstername tenminste 16 uur aangeschakeld. Dit om te zorgen dat het onttrokken water daadwerkelijk afkomstig was van de omliggende formatie en om meetartefacten door microbiologische activiteit in de winput zelf zoveel mogelijk uit te sluiten.

Voor de NGS-, qPCR- en ATP-analyses zijn de monsters genomen in steriele glazen verpakkingen van 2 liter. Deze waren alleen tijdens de eerste meetronden per abuis voorzien van Natriumthiosulfaat als conserveermiddel. De samples zijn gekoeld (5 °C) en donker bewaard. Voor sulfide zijn monsters genomen en direct gevuld in buisjes met 5% (v/v) zinkacetaat oplossing om alle sulfide aan het zink te binden. De sulfide analyses zijn later gedaan bij het Laboratorium voor Microbiologie van Wageningen Universiteit. De overige parameters (chloride, bromide, *E. coli* en koloniegetal) zijn bemonsterd volgens de eigen protocollen van Aqualab Zuid.

## 2.5 Filtratie en labanalyse

De MST-qPCR- en NGS-monsters zijn binnen 24 uur na monstername gefiltreerd over 0.22 µm filters door KWR. Alle deeltjes die kleiner zijn dan microbiële cellen (die in de meeste gevallen zelf niet kleiner zijn dan 0.2 µm) blijven dus niet achter op het filter, waaronder vrij DNA. De MST-qPCR en NGS-analyse wordt dus voornamelijk gedaan op DNA dat uit intacte cellen in de monsters afkomstig is. De gebruikte volumes varieerden van 5 ml voor de rioolmonsters tot 2000 ml voor de winputten. De gefiltreerde monsters zijn vervolgens gesplitst voor MST-qPCR-analyse of NGS-analyse. De MST-qPCR-methode is uitgevoerd voor humane indicatorsoorten, herkauwers, vogels, rund en varkens volgens de methode beschreven door Heijnen (2015a). De NGS-methode is uitgevoerd volgens Timmers et al. (2019). Negatieve controles (steriel water) en positieve controles (Mock communities = monsters waarvan de microbiële compositie bekend is) zijn meegenomen bij DNA-extractie en NGS-analyse.

De sulfide analyses zijn uitgevoerd bij de Laboratorium voor Microbiologie van Wageningen Universiteit. De buisjes met zinksulfide zijn geanalyseerd met spectrofotometrie d.m.v. een colorimetrische reactie gebaseerd op methyleen-blauw. De detectielimiet van de methode is 0.1 mg/L sulfide.

De overige parameters zijn geanalyseerd volgens de protocollen van Aqualab Zuid.

## 2.6 Database waterkwaliteit

De NGS-, qPCR- en sulfideanalyses zijn tot één database gecombineerd met de reguliere gegevens van reguliere monitoring uitgevoerd door Aqualab Zuid in de periode 2010 t/m 2021. De reguliere monitoring van de winputten omvatte de microbiologische parameters, ionen, anionen, sporenelementen, geneesmiddelen en overige organische microverontreinigingen. Bromide is enkele keren gemeten. De meetfrequentie voor de verschillende parameters verschilt per winput. De Eijserbeek is ook regelmatig bemeten, maar minder intensief dan de winputten. In de overige potentiële bronnen zijn alleen monitoringgegevens beschikbaar tijdens één meetronde in november 2019 van het koloniegetal, *E. coli*, chloride en bromide. Voor de verdere analyse is gebruik gemaakt van metingen uit de periode 2019-2020, tenzij expliciet aangegeven.

Metingen beneden de detectielimiet zijn voor de verdere analyse gelijkgesteld aan een concentratie van nul. Voor een aantal microbiologische parameters waren alleen volumes en aantallen aangeleverd en zijn de concentraties

berekend. Gegevens zijn verder geanalyseerd zoals aangeleverd, zonder verdere kwaliteitscontrole op bijvoorbeeld de ionenbalans.

## 2.7 Interpretatie

De interpretatie van de gegevens was gericht op het vaststellen in welke mengverhouding de verschillende bronnen (sources) bijdragen aan de waterkwaliteitsparameters in de pompputten. Hiertoe zijn voor alle categorieën van waterkwaliteitsparameters principal component analyses (PCA) uitgevoerd om te identificeren of de besmette putten onderling een vergelijkbare waterkwaliteit hadden en of ze qua samenstelling leken op één van de beschouwde sources. Voor meer informatie over een PCA-analyse, zie box 1.

Daarnaast zijn verhoudingsgetallen beschouwd om de herkomst van grondwater te bepalen, zoals bijvoorbeeld chloride/ bromide (Stuyfzand, 2017). Voor de microbiologische parameter is gekeken naar de mengverhoudingen tussen E. coli en het koloniegetal in de sources en sinks. Daarnaast is een PCA uitgevoerd op alle microbiologische parameters voor de winputten. De overige meetlocaties zijn daarbij buiten beschouwing gelaten omdat er geen metingen beschikbaar waren.

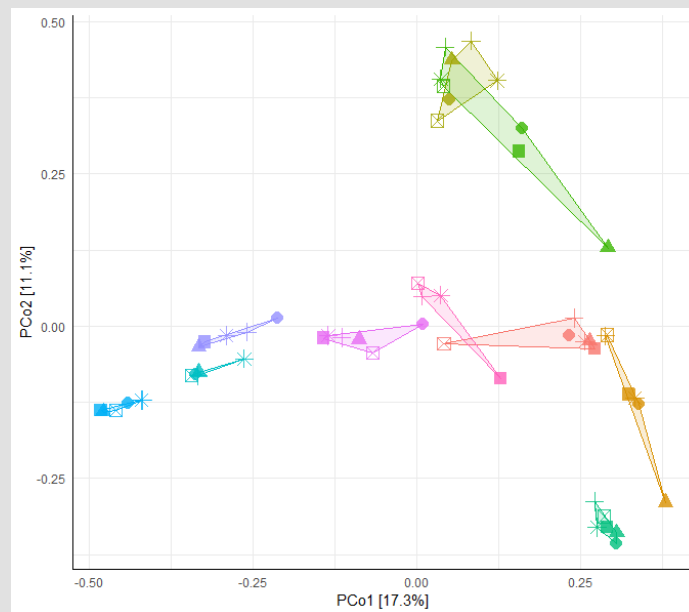
De NGS-metingen geanalyseerd volgens de NGS-MST-methode van Knights et al. (2011). Hierbij zijn de winputten beschouwd als verontreinigd monster (sinks) en de waarnemingsbuizen en meetpunten in oppervlaktewater, rioolwater en effluent als potentiële bron (source).

Tot slot is nog geverifieerd dat de positieve en negatieve controles die meegenomen zijn tijdens de NGS-analyse voldoende afweken van de veldmonsters. Dit als positieve controle van de labwerkzaamheden.

**Box 1: Principal component analysis (PCA)**

Principal component analysis (PCA) is een methode die gebruikt wordt om het verschil tussen monsters te visualiseren. Het is een multivariate analysemethode waarmee de data van monsters worden gerangschikt op grond van waarnemingen (waarden) aan meerdere afhankelijke variabelen. Deze methode is gebaseerd op een dissimilariteitsmatrix van alle variabelen en maakt hier een componenten-matrix van, dat teruggebracht wordt tot een tweedimensionale figuur (Ramette, 2007). In onderstaand figuur worden de twee componenten die het grootste deel van de variatie in de data verklaren gebruikt als x en y-as, de zogenaamde principal components (PC's). In een PCA plot staan op elkaar gelijkende monsters dicht bij elkaar en sterk verschillende monsters ver van elkaar af.

In het geval van NGS-data stelt dus elk punt in een PCA-plot de microbiële gemeenschap van een monster voor. De waarnemingen die bij elk punt horen zijn de abundanties (uitgedrukt in reads) van de bacteriegroepen (a.k.a. Operational Taxonomic Units; OTU's) die de grootste variatie in de data verklaren. Omdat deze OTU's de grootste variatie in de data verklaren, gaat het meestal om de meest abundante bacteriegroepen. Hieronder is een voorbeeld gegeven waarin de x- en y-as samen 28.4% van de variatie in de data verklaren. Er is duidelijk te zien hoe de verschillende microbiële gemeenschappen met elkaar in verhouding staan; de punten met dezelfde kleur zijn microbiële gemeenschappen die uit hetzelfde soort water afkomstig zijn.





## 3 Resultaten

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de metingen gepresenteerd. De samenhang tussen metingen en oorzaken van besmetting komen aan bod als synthese in hoofdstuk 4.

### 3.1 Microbiologische waterkwaliteitsparameters

#### 3.1.1 Verhoudingsgetallen microbiologische parameters

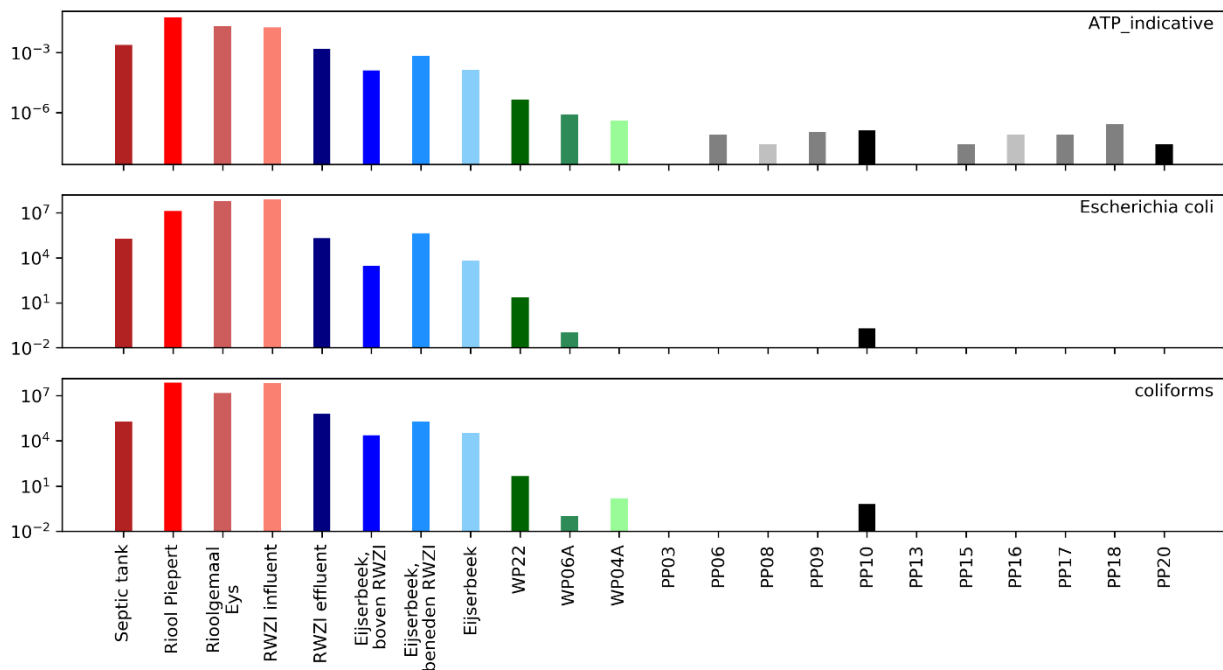
De fecale indicatororganismen (FIO)'s *E. coli* en coliformen waren in nov/dec 2019 conform verwachting het hoogste in het rioolwater en effluent van de RWZI (zie Tabel 3-1). Door lozing van de RWZI nam de concentratie *E. coli* in de beek toe met factor 140 (2.15 decaden) van 3000 cfu/L bovenstrooms naar 42000 cfu/L benedenstrooms van de RWZI. De coliformen nemen toe met 0.9 decaden. Blijkbaar was de beek dus al fecaal besmet voordat deze de RWZI bereikt. Beide FIO's daalden in het beektraject tussen de RWZI en Roodborn weer aanzienlijk tot waarden net iets hoger dan bovenstrooms van de RWZI. Er waren geen metingen beschikbaar op andere momenten om te bepalen of de daling van concentraties altijd optreedt of slechts een momentopname (zie aanbeveling 7, 9).

Het waarnemingsfilter WP22 in de oever van de Eijserbeek had duidelijk hogere concentraties FIO's dan WP6A en WP4A. Dit is logisch gezien de nabijheid van de besmette beek.

Tijdens de meetcampagne zijn alleen in PP10 fecale indicatorsoorten gedetecteerd. Dit sluit overigens niet uit dat ze ook aanwezig waren in de andere winputten bij concentraties beneden de detectielimiet van 10 eenheden/L.

#### 3.1.2 PCA microbiologische parameters

Er waren onvoldoende verschillende microbiologische parameters beschikbaar in alle waarnemingspunten om een zinvolle PCA uit te voeren. Bovendien waren de parameters gecorreleerd, zie staafdiagram in figuur 3-1.



Figuur 3-1. Microbiologische parameters gemeten in november 2019.

## 3.2 Anorganische waterkwaliteitsparameters

### 3.2.1 Verhoudingsgetallen macro-ionen

De winputten konden op basis van hun macrochemische samenstelling worden onderverdeeld in 4 groepen:

- De putten PP13, PP15, PP17, PP18, gelegen in het zuiden van het winveld, onderscheiden zich door een hogere nitraatconcentratie (45-48 mg/L, Tabel 3-1) vergeleken met de overige putten (24-40 mg/L). De nitraatbelasting is vermoedelijk afkomstig van landbouw aangezien in WP4A ook hoge concentraties nitraat zijn aangetroffen. De concentratie nitraat (en andere stikstofspecies) was namelijk veel lager in de beek en is dus een minder voor de hand liggende bron.
- De putten PP08, PP09, PP10, PP11A en PP20 onderscheiden zich door een iets hoge chloride (26-28 mg/L) en iets lagere nitraat concentratie (28-37 mg/L) vergeleken met de andere putten (chloride: 22-25 mg/L, nitraat: 36-45 mg/L). De hoge chloride kan duiden op meer invloed van beekwater of stedelijk gebied (riool, wegzout) en de lage nitraat kan duiden op minder landbouwinvloed.
- PP16 was een combinatie van bovenstaande twee groepen.
- De putten PP04, PP05 en PP06 hadden verhoudingswijs lage nitraat- en chlorideconcentraties. Dit zou kunnen duiden op een wat groter aandeel water uit de ten noorden gelegen kalkgraslanden, maar er zijn helaas geen ondiepe meetpunten in deze kalkgraslanden om dit te bevestigen.

Wanneer we uitgaan van een chlorideconcentratie van 47 mg/L in de Eijserbeek en 23 mg/L achtergrondconcentratie (op basis van metingen in PP13, PP15, PP17 en PP18), dan is naar schatting (zeer indicatieve waarde) 17% beekwater nodig om een chlorideconcentratie van gemiddeld 27 mg/L te verklaren in PP08, PP09, PP10, PP11A en PP20. Kanttekening bij deze chloride-massabalans analyse is dat ze is gebaseerd op een onvolledig monitoring van alle mogelijke bronnen. Mogelijk zijn er andere bronnen in het intrekgebied van deze winputten die de hoge chlorideconcentratie ook kunnen verklaren. Dit gebrek aan gegevens maakt het lastig om een goede inschatting te maken van de herkomst en mengverhoudingen van het onttrokken grondwater. Een dergelijk inzicht is belangrijk als early warning voor verontreinigingen en om onderbouwde bronmaatregelen te kunnen nemen. Hiervoor zijn enkele extra meetlocaties wenselijk en ook harmonisatie van analysepakketten zodat in de toekomst op alle locaties vergelijkbare gegevens beschikbaar komen (zie aanbeveling 7, 8).

Bovenstaande groepering bevat geen duidelijke relatie met de microbiologische besmettingen. Het beperkte aandeel beekwater sluit de beek ook niet uit als bron voor de fecale besmetting. Gezien de hoge concentraties micro-organismen in de Eijserbeek kan een kleine waterstroom met korte reistijd al volstaan om de putten te besmetten.

Tabel 3-1. Overzicht van microbiologische metingen over de periode 2019-2020 (NB: In riolering, oppervlaktewater en waarnemingsputten is alleen een meting uitgevoerd in nov 2019; n=1). De kleurschaal geven steeds de minimale (rood) en maximale (groen) waarde aan per parameter, ongeacht de spreiding tussen deze waarden.

Locatie	Gas (mg/L)				Anionen (mg/L)					Kationen (mg/L)								Sporenelementen (ug/L)												Microbiologie (1/L)		
	O2	CO2	H2S	CH4	Cl	HCO3	NO3	ortho PO4	SO4	Ca	Fe	K	Mg	Mn	NH4	Na	Al	As	B	Ba	Br	Cr	Cu	Ni	Se	Zn	coli-formen	E.Coli	kolonie-getal			
Septic tank	0.0		23		200	1700	0.0		70	99	0.1	110	19	43	0.0	160	0.1	1.1			58		8.1	5.6		0.0	1.90E+05	1.90E+05				
Riool Piepert	0.0		0.5		69	510	0.0		83	31	0.3	24	9.0	25	71	120	0.2	0.0			130		22	4.0		110	7.00E+07	1.30E+07				
Rioolgemeal Eys	0.0		0.7		68	490	0.0		85	74	1.0	22	9.7	72	59	100	1.8	0.0			240		44	5.9		250	1.50E+07	6.00E+07				
RWZI influent			0.5		66																200						6.70E+07	7.90E+07				
RWZI effluent	11		0.0		62	160	19		60	50	0.6	19	5.4	85	0.2	52	0.2	0.0			16		0.0	2.9		64	6.00E+05	2.00E+05				
Eijserbeek, boven RWZI			0.0		54																22						2.40E+04	3.00E+03				
Eijserbeek, beneden RWZI			0.0		58																17						1.90E+05	4.20E+05				
Eijserbeek	10		0.0		47	260	22		63	100	0.3	8.4	7.3	42	0.1	27	0.2	0.0		16		0.0	1.4		0.0		3.40E+04	2.54E+05				
WP22	3.7		0.0	0.0	37	300	26		60	120	0.0	1.8	5.1	0.0	0.0	14	0.0	0.0			49		0.0	0.7		0.0	4.50E+01	2.20E+01				
WP06A	7.7		0.0	0.0	25	320	39		66	130	0.0	1.3	6.3	0.7	0.0	6.5	0.0	0.0			23		0.0	1.0		0.0	1.00E-01	1.00E-01				
WP04A	4.6	37	0.0	0.0	28	320	39		70	130	0.0	1.3	7.1	0.5	0.0	7.4	0.0	0.0			44		0.0	0.9		0.0	1.50E+00	0.00E+00				
PP03	6.2	32	0.0	0.0	25	320	38	0.0	66	130	0.0	1.3	6.3	0.0	0.0	5.9	0.0	0.0	11	46	39	0.1	0.0	1.1	0.5	7.4	4.00E-03	4.00E-03	7.00E+05			
PP04	6.1	34		0.0	23	320	38	0.0	64	130	0.0	1.1	5.6	0.0	0.0	5.7	0.0	0.0	8.6	29	45	0.0	0.0	0.8	1.0	0.0	0.00E+00	0.00E+00	3.50E+03			
PP05	6.2	33		0.0	23	320	36	0.0	64	125	0.0	1.2	5.8	0.8	0.0	5.5	0.0	0.0	8.9	33	45	0.0	0.0	0.7	0.8	8.1	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00			
PP06	6.3	32	0.0	0.0	22	320	34	0.0	64	130	0.0	1.1	6.2	0.0	0.0	5.5	0.0	0.0	9.9	35	38	0.1	0.0	0.9	0.8	6.9	7.69E-03	0.00E+00	8.00E+04			
PP08	5.1	32	0.0	0.0	26	317	28	0.0	72	130	0.0	1.6	6.6	0.0	0.0	6.7	0.0	0.0	11	63	38	0.2	0.0	0.7	0.7	0.0	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00			
PP09	6.5	31	0.0	0.0	28	310	36	0.0	66	130	0.0	1.5	6.4	0.0	0.0	6.5	0.0	0.0	11	68	40	0.1	0.0	0.4	0.6	0.0	2.14E-02	2.14E-02	0.00E+00			
PP10	6.7	29	0.0	0.0	27	320	37	0.0	65	130	0.0	1.4	6.1	0.0	0.0	6.3	0.0	0.0	11	54	33	0.2	0.0	0.6	0.3	0.0	2.97E-01	1.14E-01	0.00E+00			
PP11A	4.2	31		0.0	28	320	25	0.1	71	135	0.0	1.8	6.6	0.0	0.0	7.2	0.0	0.0	13	56	49	0.1	0.0	0.7	0.8	0.0	1.14E+00	0.00E+00	0.00E+00			
PP13	6.4	33	0.0	0.0	24	320	48	0.1	67	135	0.0	1.1	5.9	0.0	0.0	6.9	0.0	0.0	25	15	0.0	0.9	0.6	0.0	14	0.00E+00	0.00E+00	2.00E+03				
PP15	6.1	36	0.0	0.0	23	315	46	0.1	64	130	0.0	1.1	5.9	0.0	0.0	6.5	0.0	0.0	24	31	1.1	0.0	0.7	0.0	0.0	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00				
PP16	4.8	34	0.0	0.0	26	320	40	0.1	67	133	0.0	1.3	6.8	0.0	0.0	7.5	0.0	0.0	11	29	38	0.2	0.0	0.7	0.3	0.0	0.00E+00	0.00E+00	3.00E+03			
PP17	6.0	33	0.0	0.0	24	320	45	0.1	63	137	0.0	1.1	5.8	0.0	0.0	6.5	0.0	0.0	7.8	25	37	0.2	0.0	0.7	0.6	0.0	2.49E+00	8.60E-01	4.50E+03			
PP18	5.9	33	0.0	0.0	22	315	45	0.1	62	135	0.0	1.1	5.5	0.0	0.0	5.9	0.0	0.0	25	26	0.0	0.0	0.8	0.8	0.0	0.0	7.69E-03	7.69E-03	0.00E+00			
PP20	3.3	38	0.0	0.0	26	334	24	0.1	73	130	0.0	2.5	7.0	0.0	0.0	8.7	0.0	0.0	16	52	38	0.1	0.0	0.7	1.1	0.0	2.86E-01	1.43E-02	7.50E+03			
Gemiddelde PP	5.7	33	0.0	0.0	25	319	37	0.1	66	131	0.0	1.4	6.2	0.1	0.0	6.5	0.0	0.0	11	40	36	0.2	0.1	0.7	0.6	2.6	3.04E-01	7.30E-02	5.72E+04			

3.2.2 Verhouding chloride/bromide

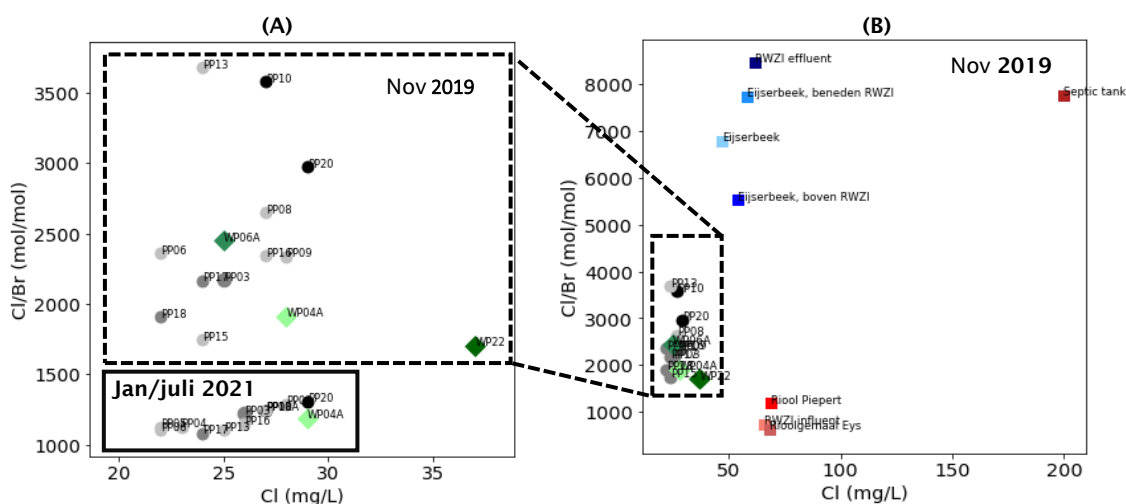
De chlorideconcentratie in combinatie met de chloride/ bromide-verhouding zijn parameters die regelmatig worden gebruikt om de herkomst van grondwater te bepalen (Stuyfzand, 2017). De meetpunten in Roodborn zijn als volgt geclusterd voor deze parameters (Figuur 3-2):

- In de communale rioolmeetpunten waren de Cl/Br-verhoudingen in november 2019 rond de 1000 mol/mol, wat in lijn is met de door Stuyfzand (2017) gerapporteerde typische waarden voor stedelijk afvalwater (zie Figuur 3-2).
- De Cl/Br verhouding in de Eijserbeek bovenstrooms van de RWZI was met 5500 mol/mol veel hoger dan de gebruikelijke waarden voor oppervlaktewater gerapporteerd door Stuyfzand (2017). De oorzaak is niet nader onderzocht.
- De concentratie chloride in de Eijserbeek benedenstrooms van de RWZI (58 mg/l) was op 25 nov 2019 ongeveer het gemiddelde van de bovenstroomse concentratie (54 mg/L) en de concentratie in het RWZI-effluent (62 mg/L). Dit is een indicatie dat de RWZI de beekafvoer ter plaatse verdubbelde (50% aandeel). Op basis van de bromideconcentraties lijkt het aandeel van de RWZI in de benedenstroomse afvoer nog groter, namelijk 86% (Effluent= 16 µg Br/L, Bovenstrooms= 22 µg Br/L, Benedenstrooms= 17 µg/L).
- De Cl/Br in de Eijserbeek daalde van 7700 benedenstrooms van de RWZI naar 6800 bij de winning Roodborn, mogelijk door verdunning (drainage van grondwater) met water met een lagere Cl/Br verhouding. De Cl/Br in de winputten toonde grote overeenkomst met WP06A (natuur) en WP04A (landbouw). De winputten PP10, PP20 hadden in november een hogere Cl/Br-verhouding en hogere Cl-concentratie, wat duidt op een groter aandeel beekwater. Beiden putten zijn ook verhoudingsgewijs vaak besmet. In PP13 is ook een hoge Cl/Br-verhouding gevonden, maar vanwege de lagere Cl-concentratie ligt menging met beekwater wat minder voor de hand als oorzaak. In PP13 zijn tot op heden nooit besmettingen geconstateerd.
- WP22 bevat een combinatie van beekwater en andere bronnen (vermoedelijk infiltratie uit natuurgebied, op basis van de locatie midden in het wingebied). Op basis van de chloride-massabalans is 55% beekwater (47 mg/L) en 45% water dat in natuurgebied infiltreert (WP06A = 25 mg/L) nodig om de waargenomen concentratie

in WP22 (37 mg/l) te verklaren. De Bromide-concentraties in de Eijserbeek zijn variabel in de tijd, en daarom minder geschikt om mengverhoudingen af te leiden.

De concentratie Br is erg variabel in de loop van de tijd. Zo nam in een periode van circa 2 weken in juli/ augustus 2017 de concentratie bromide af van 20 naar 10 µg/L in de Eijserbeek, van 27 naar 13 µg/L in PP10 en 38 naar 28 µg/L in PP20. Het is opvallend dat de beek en putten in deze periode een vergelijkbaar dalende trend vertoonden. Dit zou kunnen duiden op een sterke invloed van het beekwater op de putten. Maar er kunnen ook andere oorzaken zijn zoals uitloging of verdunning na neerslaggebeurtenissen. Neerslag kan namelijk ook zowel de concentraties in het ondiepe grondwater als de beek beïnvloeden aangezien de beek deels gevoed wordt met ondiep grondwater. Mogelijk is er dus sprake van een combinatie van bronnen en processen.

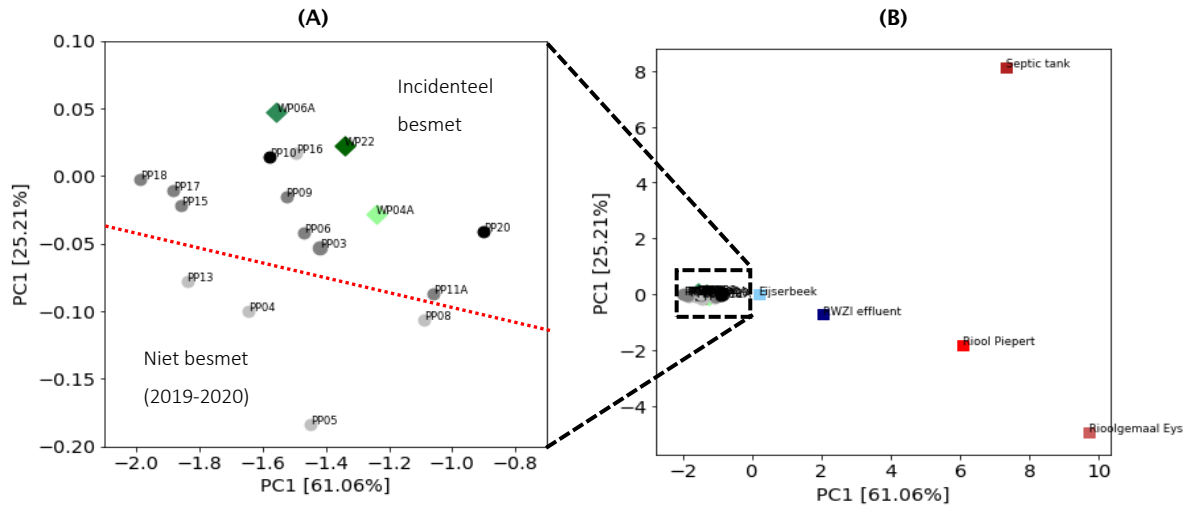
Helaas is het aantal meetmomenten en meetlocaties in ondiep (freatische) grondwater te gering om hier verdere conclusies aan te verbinden. Daarom wordt geadviseerd om middels een intensievere meetcampagne en/of beregeningsproef na te gaan wat de invloed is van neerslag op de ondiepe grondwaterkwaliteit en oppervlaktewater. Als uit een dergelijke proef blijkt dat deze invloed vrij direct is, dan is dat een aanwijzing dat er ook makkelijk fecale indicatororganismen en pathogenen kunnen uitspoelen (zie aanbeveling 6, 7, 9).



Figuur 3-2. Chloride-bromide verhouding op het puttenveld (A) voor de winputten in 2019 en 2021 (B) en voor alle samplepunten

### 3.2.3 PCA op anorganische parameters

De PCA van kat- en anionen en sporenelementen (Figuur 3-3B) vond een duidelijk onderscheid tussen rioolwater, het RWZI-effluent en het grondwater op het puttenveld. Het water in de Eijserbeek leek veel op het puttenveldwater, doordat ze een menging is van riooloverstorten, RWZI-effluent en aanvoer van grondwater dat waarschijnlijk qua samenstelling vergelijkbaar is met het puttenveld. Inzoomen op het puttenveld leverde een beperkte mate van clustering op tussen de besmette en niet-besmetten putten (Figuur 3-3A, rode lijn).



Figuur 3-3. PCA van ionen, anionen en sporenelementen voor alle meetlocaties (B) en inzoomen op alleen de winputten (A)

### 3.3 Organische microverontreinigingen (OMV's)

#### 3.3.1 Verhoudingsgetallen

De hoogste concentraties geneesmiddelen zijn gemeten in de beek (Tabel 3-2, boven), gevolgd door WP22 die onder sterke invloed staat van beekwater. Een aantal van de in de beek aangetroffen werkzame stoffen (Furosemide, Carbamazepine, Atorvastatine) zijn in veel lagere concentraties aangetroffen in de winputten PP10 (regelmatig besmet) en PP16 (geen fecale indicatororganismen). De winputten zonder geneesmiddelen waren deels incidenteel besmet (PP03, PP18, PP20) en deels niet besmet in 2019-2020 (PP06, PP15). Er was dus geen eenduidig verband tussen aanwezigheid van geneesmiddelen en waargenomen besmetting van winputten.

Voor pesticiden zijn de hoogste concentraties gemeten in PP13 t/m PP18 (Tabel 3-2, onder). Deze putten trokken, volgens interpretatie van de anorganische waterkwaliteitsparameters (zie §3.2.1), een groter aandeel water aan uit landbouwgebied. Een belangrijk deel van de aangetroffen pesticiden bestond uit Desphenyl chloridazon. Dit is een metaboliet van de herbicide Chloridazon die is toegepast in akkerbouw. Landbouw in het intrekgebied is dus vermoedelijk een belangrijke bron van deze verontreiniging.

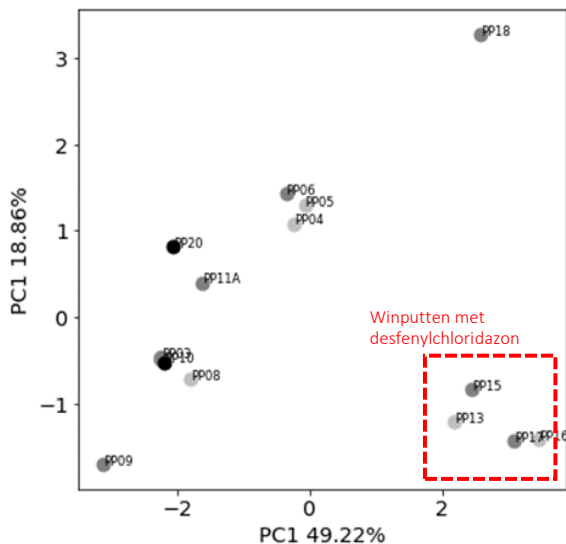
Helaas zijn de geneesmiddelen en pesticiden niet in alle potentiële bronnen gemeten en verschilt het analysepakket per locatie. Hierdoor kan niet worden vastgesteld of er naast de Eijserbeek (gevoed met riool- en RWZI-effluent) nog andere bronnen zijn van geneesmiddelen en of de beek ook pesticiden bevat die naar de winning stromen (zie aanbeveling 8).

Tabel 3-2. Overzicht van geneesmiddelen (boven) en pesticiden (onder) in de Eijserbeek, WP22 en winputten.

Parameter	Location	Eijserbeek	WP22	PP03	PP04	PP05	PP06	PP08	PP09	PP10	PP11A	PP13	PP15	PP16	PP17	PP18	PP20	PP_mean
	id	µg/L		µg/L														µg/L
Iopromide		1.800	0.000	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Metoprolol		0.920	0.011	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Sotalol		0.570	0.033	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Metformine		0.560	0.000	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Furosemide		0.510	0.000	0.000			0.000			0.002			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Diclofenac		0.370	0.000	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Losartan		0.270	0.000	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Carbamazepine		0.190	0.054	0.000			0.000			0.000			0.000	0.006		0.000	0.000	0.001
Tramadol		0.180	0.000	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Primidon		0.064	0.023	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Atenolol		0.056	0.000	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Bisoprolol		0.043	0.000	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Propranolol		0.041	0.000	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Lidocaïne		0.036	0.009	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Naproxen		0.031	0.000	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Atorvastatine		0.025	0.000	0.000			0.000			0.002			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Sulfamethoxazool		0.025	0.009	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Trimethoprim		0.023	0.000	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Bezafibraat		0.007	0.000	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
Hydrochlorothiazide		0.000	0.160	0.000			0.000			0.000			0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
subtotal		5.721	0.299	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.00
Desfenylchloridazon				0.88	0.94	0.89	0.83	0.95	0.92	0.89	0.90	1.90	1.70	2.35	1.57	1.25	1.10	1.22
Som Trihalomethanen				0.00	0.15	0.18	0.15	0.00	0.00	0.02	0.03	0.19	0.19	0.23	0.21	0.23	0.00	0.11
Methyl-desphenylchloridazon				0.10	0.08	0.08	0.05	0.11	0.10	0.10	0.07	0.13	0.13	0.16	0.14	0.09	0.08	0.10
Trichloormethaan				0.00	0.07	0.11	0.09	0.00	0.00	0.01	0.02	0.14	0.12	0.18	0.16	0.15	0.00	0.08
Trichloormethaan (chloroform)				0.00	0.10	0.09	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.10	0.09	0.09	0.17	0.00	0.06
N,N-dimethylsulfamide (DMS)				0.10	0.04	0.03	0.03	0.07	0.13	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04
Diglyme				0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.01
Desethylatrazine				0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00
2,6-Dichloorbenzamide				0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Naftaleen				0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
subtotal				1.08	1.38	1.37	1.22	1.13	1.16	1.13	1.02	2.45	2.25	3.01	2.19	2.00	1.18	1.61

3.3.2 PCA op pesticiden

De PCA op pesticiden leverde een duidelijke clustering van de winputten PP13 t/m 17 met hoge concentraties desfenylchloridazon (Figuur 3-4). Dit is een metaboliet en kan in theorie zowel afkomstig zijn van landbouwgebied en infiltreren uit de beek. Uit de PCA bleek geen verband met de fecale besmettingen.



Figuur 3-4. PCA op pesticiden. (Dit zijn de organische microverontreinigingen in Tabel 3-2 die in alle winputten zijn gemeten.

3.4 MST-qPCR

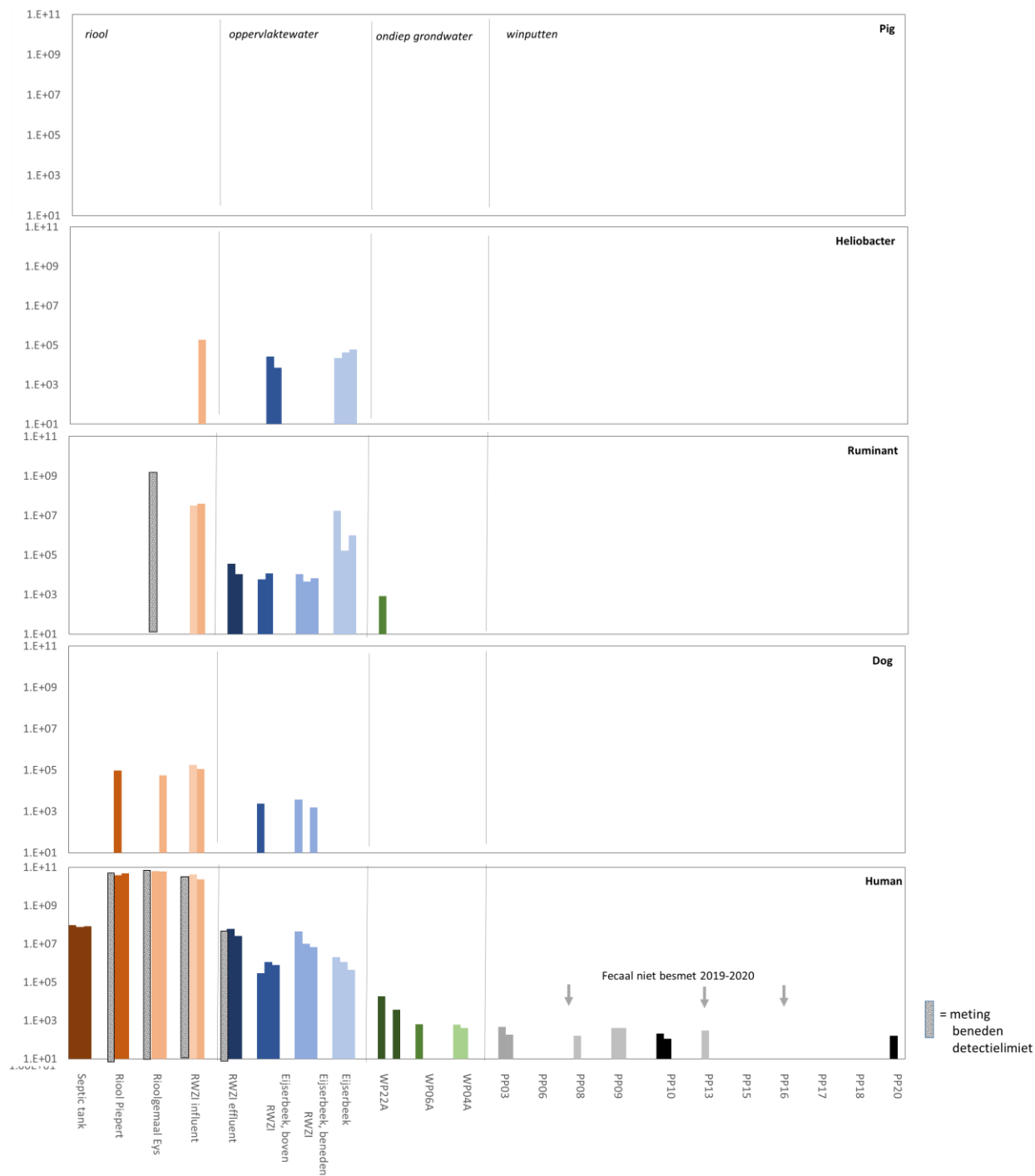
Om de fecale contaminatiebron te achterhalen zijn MST-qPCR-analyses uitgevoerd die specifiek zijn voor mens (humaan), hond, herkauwer, vogel en varken DNA-merkers. Alle rioolmeetpunten bevatten hoofdzakelijk DNA-

merkers voor humane feces (zie Figuur 3-5 en bijlage I). Daarnaast zijn in het riool van de Piepert ook één maal DNA-merkers aangetroffen die specifiek zijn voor honden, zijn in rioolgemaal Eijs DNA-merkers gevonden voor zowel honden en ruminants (herkauwers) en zijn in het RWZI-influent DNA-merkers van vogel, hond en herkauwer aangetroffen. De concentraties van niet-humane DNA-merkers waren in alle rioolmeetpunten veel lager dan de humane DNA-merkers, wat logisch is aangezien het riool primair bedoeld is voor afvoer van humane feces. In het RWZI-effluent waren de concentraties humane en ruminant-merkers 2 tot 3 decaden lager dan het influent, wat in lijn is met de concentratieafname van *E.coli* en coliformen (zie Figuur 3-1).

De Eijserbeek bevatte bovenstrooms van het RWZI ook DNA-merkers voor humane feces en voor herkauwers, en sporadisch voor vogels en honden; de Eijserbeek was dus al fecaal besmet voor de RWZI-effluentlozing (Tabel 3-1). Door lozing van RWZI-effluent nam de concentratie humane DNA-merkers met 1 tot 2 decaden toe tussen de meetpunten boven- en benedenstrooms van de RWZI. De concentraties namen vervolgens weer af ter plaatse van het puttenveld. De concentraties voor vogels en herkauwers nemen juist toe benedenstrooms van de RWZI, wat erop duidt dat er, naast de RWZI, nog andere bronnen zijn van fecale besmetting waren.

De humane en herkauwer specifieke DNA-merkers in WP22 en de humane merkers in WP6A zijn vermoedelijk het gevolg van menging met oppervlaktewater. De aanwezigheid van humane merkers in WP4A is opvallend en niet in lijn met het lokale landgebruik (landbouwgrond). We komen hierop terug in de discussie in §4.2.

Er zijn in nov/dec 2019 in veel meer winputten humane DNA-merkers aangetroffen (PP03, PP08, PP09, PP10, PP13, PP20) dan coliformen en *E. coli* (alleen in PP10). Opmerkelijk genoeg zijn ook humane DNA-merkers aangetroffen in de winputten PP08 en PP13 waar in de periode 2019-2020 nooit fecale indicatorsoorten zijn aangetroffen. Dit is in lijn met Heijnen (2015a), waar blijkt dat de MST-qPCR een gevoeliger methode is vergeleken met de traditionele, op kweek gebaseerde parameters coliformen en *E.coli*.



Figuur 3-5. Waargenomen concentratie fecale indicator met MST-qPCR (DNA kopieën/l, y-as) in nov/ dec 2019. Metingen beneden detectielimiet zijn indicatief weergegeven met een zwart omlinnde grijze balk.

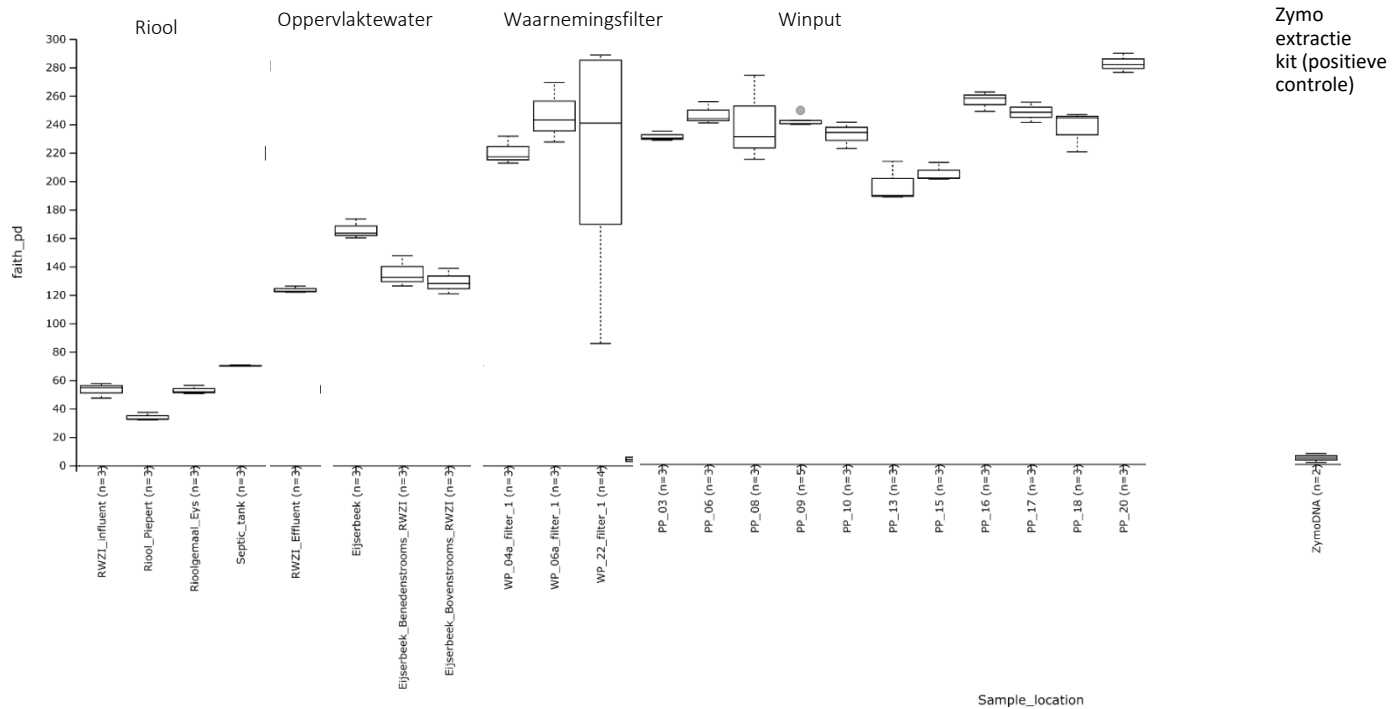
### 3.5 NGS-analyse

#### 3.5.1 Diversiteitindex

Met NGS zijn de microbiële gemeenschappen van alle monsters in kaart gebracht. Hieruit bleek dat de winputten en peilbuizen een veel hogere diversiteitsindex hebben dan riool- en oppervlaktewatermonsters (zie Figuur 3-6). De diversiteit van de microbiële populatie was dus hoger in grondwater. Dit is logisch, aangezien grondwater oligotroof is en daardoor meer verschillende microbiële soorten bevat waarbij er minder dominante groei van enkele soorten



optreedt als in de rioolwateren, RWZI-effluent en oppervlaktewateren. Vooral rioolwater bevatte enkele, zeer dominante soorten. Waarnemingsput WP22a toont een zeer grote spreiding in diversiteit, mogelijk doordat de bron van het water in deze put anders was per monsternamen. Door deze grote spreiding waren er geen significante verschillen tussen de diversiteitsindex van de winputten en waarnemingsput WP22a. Er zijn ook geen duidelijke relaties tussen fecale besmettingen en de diversiteitsindex.



**Figuur 3-6.** Diversiteitsindex (*y-as*) voor de verschillende monsterlocaties. Boxplots tonen de spreiding per locatie voor de genomen monsters in de tijd tezamen ( $n=3$ ). NB: De diversiteitsindex is berekend op basis van de phylogenetische diversiteit volgens Faith (1992). Normalisatie is gedaan met een rarefaction diepte van 24759 reads. Significante verschillen zijn getest met gepaarde Kruskal Wallis H-test ( $p<0.05$ ).

### 3.5.2 PCA op NGS-profiel

In Figuur 3-7 zijn de verschillen in de microbiële gemeenschappen weergegeven d.m.v. Principal Component Analysis (PCA) plots. Met PCA kunnen de verschillen in de samenstelling van een microbiële gemeenschap in kaart worden gebracht. Elk punt in een PCA stelt een microbiële gemeenschap van één monster voor. Hoe dichter twee punten bij elkaar liggen, hoe meer deze microbiële gemeenschappen op elkaar lijken (Zie uitleg, Box 1).

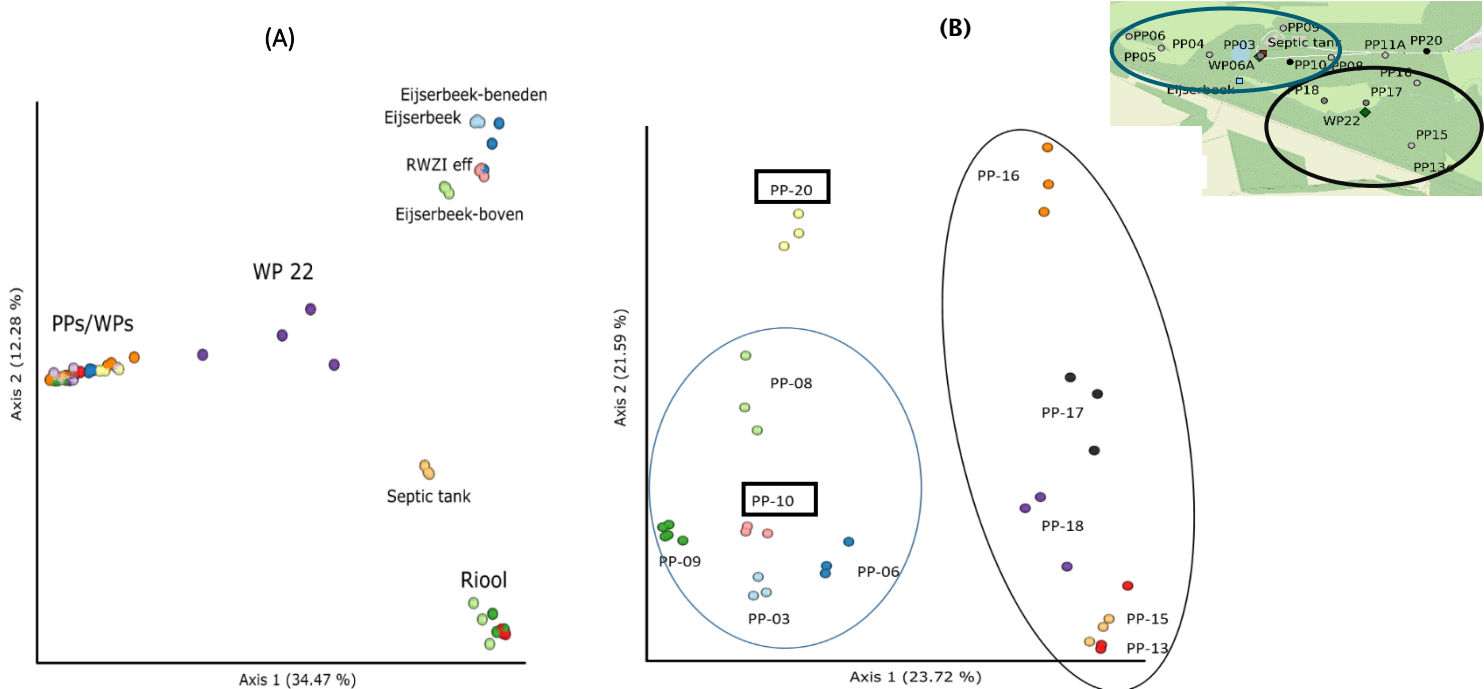
Uit de PCA van alle meetpunten (Figuur 3-7A) blijkt dat de microbiële gemeenschappen uit een aantal clusters bestaan:

- Rioolwater (RWZI influent, rioolgemaal en riool Piepert)
- Septic tank (De septic tank heeft een wat afwijkend profiel van de andere rioolwateren)
- Oppervlaktewater (Eijserbeek) en RWZI effluent
- Waarnemingsfilters WP04a en WP06a (WPs) en Winputten (PPs).
- Waarnemingsput WP22

De WP22 lijkt een unieke microbiële populatie te hebben die afwijkt van de andere WPs, maar ook een sterke variatie in de tijd heeft. Dit komt overeen met de variatie in diversiteit (Figuur 3-6). Dit meetpunt met oevergrondwater wordt sterk beïnvloed door oppervlaktewater. En aangezien het oppervlaktewater ook

rioolwaterlozingen kan bevatten is het logisch dat dit meetpunt tussen het grondwater, oppervlaktewater en rioolwater in ligt.

De PCA van alleen de winputten (Figuur 3-7B) laat zien dat de microbiële populaties niet clusteren aan de hand van besmetting, maar aan de hand van de locatie in het puttenveld en waterkwaliteit. De winputten PP13, PP15, PP17 en PP18 (en mindere mate PP16) hebben namelijk allemaal hogere nitraatconcentraties. Blijkbaar is de PCA, waarbij gekeken wordt naar de gehele microbiële populatie, onvoldoende gevoelig voor contaminatie van winputten.



*Figuur 3-7. PCA op de microbiologische populatie voor alle meetpunten (A) en alleen de winputten (B). De plot is gebaseerd op Bray Curtis distance van alle monsters van winputten (PPs) waarop microbiële analyse gedaan is met NGS. Blanco monsters (negatieve controles: geen monster toegevoegd bij opwerking voor NGS) en Mock communities (positieve controles: bekende microbiële gemeenschappen) zijn niet weergegeven. De assen verklaren een aandeel van de variatie in de data. Elk punt staat voor een microbiële gemeenschap van een monster. De verschillende kleuren geven de meetlocaties weer. In figuur A zijn geen enkele locaties significant verschillend ( $p < 0.05$ ). Dit komt waarschijnlijk door de grote temporele variatie binnen de monsterlocaties en de similariteit in milieucondities van de verschillende locaties (het grondwater heeft in alle winputten bijvoorbeeld een grotendeels vergelijkbare chemische samenstelling en temperatuur). In figuur B is alleen PP-09 significant verschillend van alle andere putten (PERMANOVA,  $p < 0.05$ ).*

## 3.6 MST-NGS

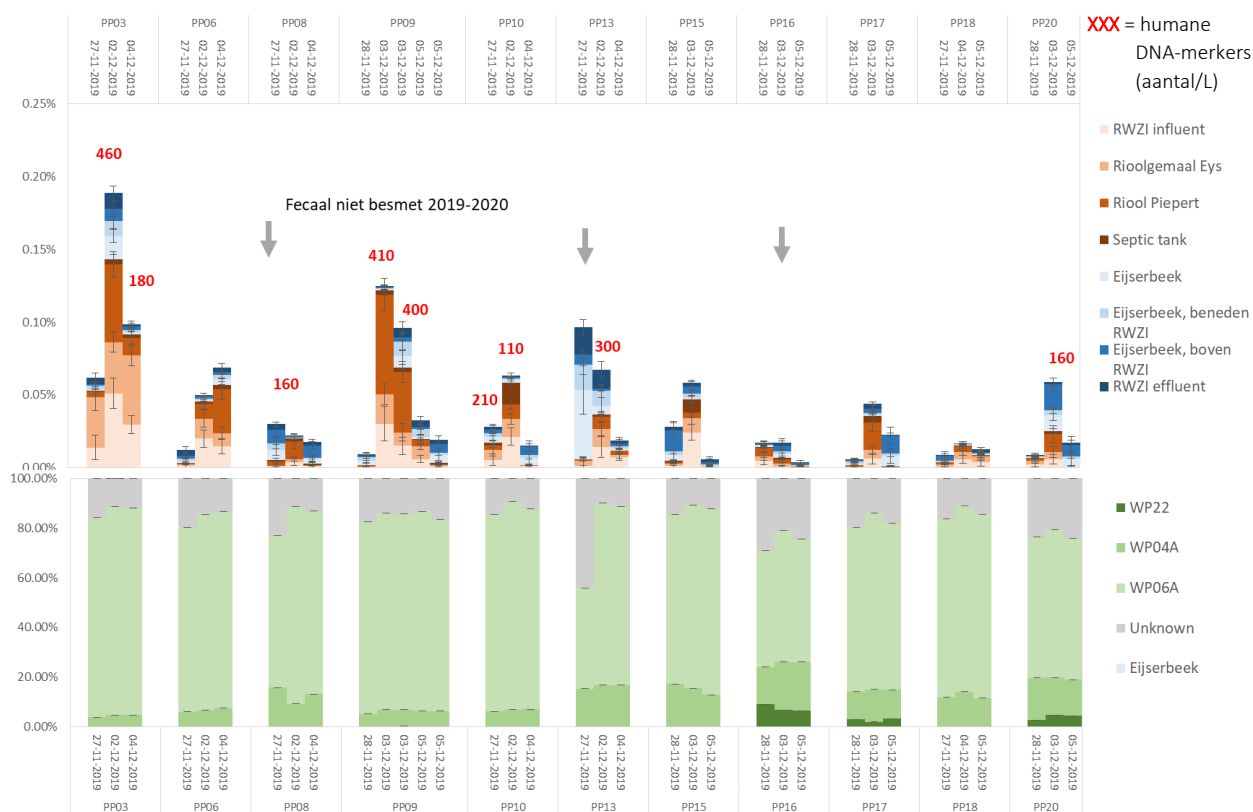
### 3.6.1 MST-NGS op winputten

Bij de MST-NGS is de gehele microbiële gemeenschap in de “sinks” (in dit geval de winputten) vergeleken met de verschillende bronnen (rioolwater, RWZI-effluent, oppervlaktewater, waarnemingsputten). Uit Figuur 3-8 blijkt dat een groot aandeel van de microbiologische populatie in de winputten in nov/ dec 2019 afkomstig was uit de landbouw (WP4A) en natuur (WP6A). Dit is logisch verklaarbaar omdat deze landgebruiken dominant zijn in het intrekgebied van de winputten.

Riool- en oppervlaktewater leverden tijdens de metingen een verhoudingsgewijs kleine bijdrage aan de totale microbiologische populatie in de winputten (Figuur 3-8). Dit verklaart waarom er geen verschillen te zien zijn als met PCA naar de gehele microbiële populatie gekeken wordt (Figuur 3-7).

Ook is te zien dat de bacteriepopulaties van de verschillende rioolbronnen volgens de PCA vrij veel op elkaar lijken (Figuur 3-7). Dit maakte het lastig voor de MST-NGS om onderscheid te maken tussen de verschillende rioolbronnen. We verwachten dat de som van de rioolbronnen wel redelijk goed wordt voorspeld. Om deze reden moet de afzonderlijke bijdrage van elke bron niet kwantitatief worden gezien. Wanneer bijvoorbeeld het percentage “RWZI-influent” hoger is dan een andere rioolbron, wil dit niet zeggen dat de bacteriën ook meer uit deze bron afkomstig zijn, maar dat ze in ieder geval uit een van de rioolbronnen afkomstig zijn. Ook moet worden bedacht dat de percentages de relatieve hoeveelheid micro-organismen weergeven die afkomstig zijn uit een bron. Dit hoeft niet per se in verhouding te staan met het werkelijke aandeel water dat afkomstig is uit een bron. Rioolwater bevat bijvoorbeeld een hoge concentratie micro-organismen, waardoor bijmenging van een kleine hoeveelheid rioolwater al van grote invloed kan zijn op het gehele microbiële profiel.

Wat opvalt aan de NGS-MST, is dat het aandeel rioolwater-bacteriën binnen de meeste winputten het laagst was op 27 november 2019. Daarnaast zijn de monsterpunten binnen de winputten waarbij het aandeel rioolwater-bacteriën relatief het hoogst is, ook vaak positief bevonden met de MST-qPCR voor humane merkers. Dit is een sterke indicatie dat de humane fecale besmettingen afkomstig zijn uit lozingen van rioolwater en RWZI-effluent.



Figuur 3-8. Procentuele bijdrage van rioolwaterbronnen (bruin), oppervlaktewater (blauw) en waarnemingsfilters in landbouw en natuur (groen) aan het DNA-profiel van de winputten volgens analyses met de MST-NGS.

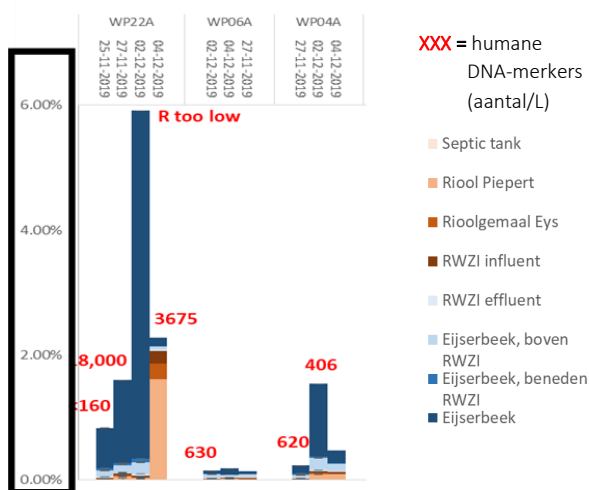
### 3.6.2 MST-NGS op waarnemingsputten

Om meer inzicht te krijgen in de herkomst van de fecale besmetting van de waarnemingsfilters, is de MST-NGS herhaald met alleen de riool- en oppervlaktewateren als bron en de waarnemingsfilters en winputten als sink. Dit maakte voor het aandeel riool- en oppervlaktewater in de winputten weinig verschil; het berekende aandeel riool- en oppervlaktebacteriën bleef circa 0.05% (resultaten niet weergegeven in figuur). Dit zegt niets over het aandeel water dat afkomstig is uit de verschillende bronnen, maar laat zien dat MST-NGS een gevoelige methode is om de

afkomst van bacteriën te bepalen, ondanks dat deze niet conservatief is. (NB: Voor het bepalen van het aandeel water kan beter gebruik gemaakt van conservatieve chemische tracers.)

In een eerdere schatting op basis van de mengverhoudingen van chlorideconcentraties (zie 3.2) was het aandeel oppervlaktewater circa 55%. Het aandeel oppervlaktewater-bacteriën in WP22 varieerde tussen de 1% en 6% (Figuur 3-9). Dit bevestigt weer dat het aandeel van de microbiële populatie van een bron niet vergelijkbaar is met het aandeel water uit de bron. Daarnaast is te zien dat de herkomst van het water van WP22 per datum veel verschilt, wat in lijn is met de in Figuur 3-6 beschreven grote fluctuatie van de microbiële diversiteit. De fluctuatie van het aandeel beekwater is verklaarbaar doordat de beek soms infiltreren en soms drainerend werkt, afhankelijk van de afvoer en bedrijfsvoering van de putten (zie §2.1).

Oppervlaktewater-bacteriën maakten in WP6A een iets hoger aandeel uit van de totale populatie bacteriën (0.15%) vergeleken met de winputten (0.05%). De WP04A in landbouwgronden bevat gemiddeld 1% oppervlaktewater-bacteriën en ook een klein aandeel rioolwater-bacteriën. Hiervoor is niet direct een verklaring voorhanden. WP06A en WP04A waren vooraf gekozen als aparte bron van de Eijserbeek. In §4.2 van de discussie komen we terug op de vraag waarom de NGS-MST metingen toch duiden op beekinvloed.

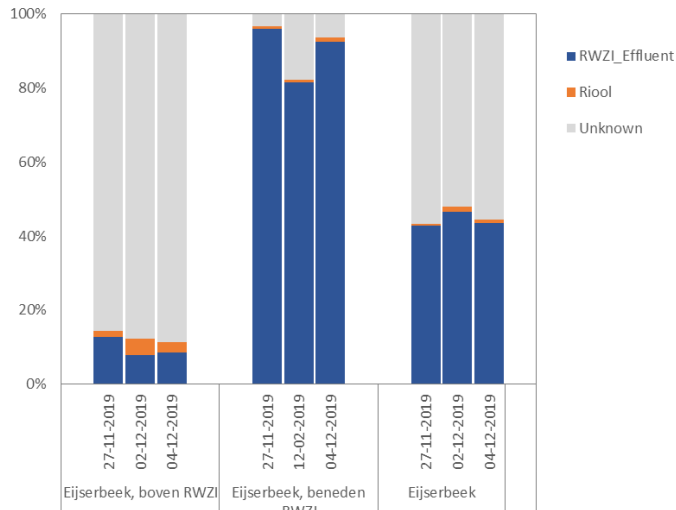


Figuur 3-9. Procentuele bijdrage van rioolwaterbronnen (bruin) en oppervlaktewater (blauw) aan het DNA in waarnemingsputten.

### 3.6.3 MST-NGS op oppervlaktewater

Tot slot is nog een aparte analyse uitgevoerd naar de microbiële herkomst van het oppervlaktewater. Hierbij is MST-NGS uitgevoerd met alleen het rioolwater (i.e. het gemiddelde DNA-profiel van de meetpunten septic tank, riool Piepert, rioolgemaal Eijs en RWZI-influent) en RWZI-effluent als bron. De aanwezigheid van riool- en RWZI-bacteriën in de Eijserbeek bovenstrooms van de RWZI-Simpelveld (circa 15% van de totale populatie) geeft aan dat de Eijserbeek al bovenstrooms van de RWZI besmet was met rioolwater (zie Figuur 3-10). De toename van het aandeel RWZI-effluent-bacteriën in het meetpunt benedenstrooms van de RWZI tot gemiddeld 91% duidt erop dat het effluent een grote invloed had op de microbiologische populatie van de beek. Ook ter plaatse van de winning Roodborn, werd de bacteriepopulatie in de Eijserbeek nog voor grofweg de helft bepaald door bacteriën uit het RWZI-effluent.

Ook bij deze analyse is overigens een groter aandeel riool- en oppervlaktewater-bacteriën gevonden in WP04A (0.12%) vergeleken met WP06A (0.03%).

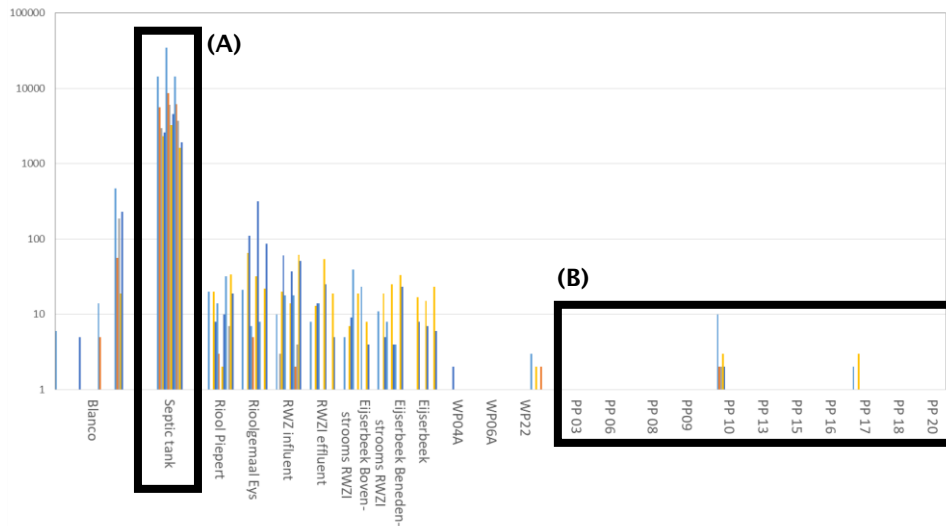


*Figuur 3-10. Procentuele bijdrage van rioolwaterbronnen (bruin) en RWZI-effluent (blauw) aan het oppervlaktewater. De DNA-profielen van de rioolwaterbronnen zijn gemiddeld voor deze analyse.*

### 3.7 Analyse unieke NGS features in septic tank

De septic tank was de enige rioolwaterbron waarvan het microbiële profiel zich onderscheidde van de andere rioolbronnen (figuur 3-7). Om na te gaan wat de mogelijke bijdrage is van de septic tank aan de onttrokken hoeveelheden in de winputten, is gezocht naar bacteriële DNA-sequenties (“NGS-features”) die uniek zijn voor de septic tank. Dat wil zeggen, dat gezocht is naar features die in hoge concentraties aanwezig zijn in de septic tank en bij voorkeur helemaal niet of beperkt aanwezig in de andere meetlocaties.

In Figuur 3-11 zijn deze verschillende bijna-unieke features geïdentificeerd waarbij de absolute aantallen per feature op de y-as zijn aangegeven (let op: logschaal). Deze features kwamen significant meer voor in de septic tank vergeleken met de andere rioolwater monsters (ANCOM test,  $W=879$ ). Maar ze bleken echter ook terug te komen in andere meetpunten, zoals WP22, PP10 en PP17. Echter, enkele van de features kwamen ook voor in de blanco's (=steriel laboratorium water). Te zien is dat deze features een abundantie hadden van minder dan 10 reads in zowel de veldmonsters en blanco's. In het algemeen worden deze aantallen bij NGS-analyses als zeer laag beschouwd en onderdeel van ‘de achtergrondruis’ en is het daardoor niet goed mogelijk om conclusies te trekken over de aan- of afwezigheid van deze DNA-sequenties in de winputten. De bijdrage van de septic tank aan de besmettingen kan hierdoor niet worden vastgesteld.

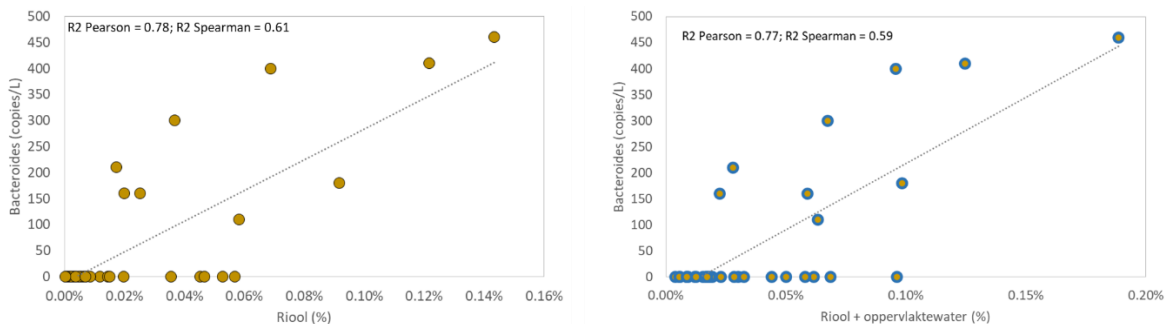


Figuur 3-11. Overzicht van unieke features (DNA-sequenties) in de septic tank vergeleken met de winputten. Op de y-as wordt de absolute hoeveelheid van de features per monster weergegeven.

### 3.8 Relatie MST-NGS en MST-qPCR

De concentraties fecale merkers die met de MST-qPCR zijn gevonden in de winputten lagen net boven de detectielimiet. Het aandeel riool- en oppervlaktewater lag ook veel lager dan in eerdere MST-NGS studies. Daarom zijn, ter controle van de methode, de resultaten van de MST-NGS en MST-qPCR methoden met elkaar vergeleken voor de winputten. Hieruit bleek dat de concentratie humane DNA-merkers en het aandeel rioolwater-bacteriën een sterk verband hadden (Pearson  $r^2 = 0.78$ , Spearman  $r^2 = 0.61$ ; zie Figuur 3-12). Dit verband was nagenoeg even groot met het aandeel bacteriën uit rioolwater en oppervlaktewater samen (inclusief RWZI) (Pearson  $r^2 = 0.77$ , Spearman  $r^2 = 0.59$ ). Er was geen verband tussen humane DNA-merkers en het aandeel bacteriën uit oevergrondwater (Pearson  $r^2 = -0.19$ , Spearman  $r^2 = -0.08$ ), natuur grondwater (Pearson  $r^2 = 0.36$ , Spearman  $r^2 = 0.41$ ), en landbouw grondwater (Pearson  $r^2 = -0.33$ , Spearman  $r^2 = -0.33$ ).

De hoge correlaties tussen humane DNA-merkers met riool- en oppervlaktewateren MST-NGS zijn een indicatie dat de MST-qPCR methode en de MST-NGS methode beide redelijk vergelijkbare en betrouwbare resultaten leveren in grondwater met een korte verblijftijd indien er voldoende meetpunten (herhalingsmonsters) worden genomen. Omdat dit de eerste keer is dat deze methoden zijn toegepast op grondwater waar zeer lage concentraties van de fecale DNA-merkers en rioolwater-bacteriën aanwezig zijn, wordt aanbevolen om de methoden extra te valideren (aanbeveling 5, 10).



Figuur 3-12. Correlatie in de winputten tussen het aandeel riool-bacteriën en humane DNA-merkers (links) en het aandeel riool-bacteriën + oppervlaktewater-bacteriën en humane DNA-merkers, waarbij op de x-as de NGS source tracker (%) en op de y-as de concentraties humane DNA-merkers volgens de qPCR (DNA copies/L).

## 4 Discussie

### 4.1 Verwijderingsrendement RWZI-Simpelveld

In Tabel 4-1 is de concentratieverandering tussen de verschillende meetpunten berekend als decimale verandering tussen een boven- en benedenstreams meetpunt (decaden verschil =  $10\log C_{\text{beneden}} - 10\log C_{\text{boven}}$ ). Een decimale verandering van -1 betekent een factor 10 afname van concentratie, een decimale verandering van +2 betekent een factor 100 toename.

Het verwijderingsrendement van de RWZI Simpelveld was tijdens de meetcampagne in november/ december 2019 gemiddeld -2.9 decaden voor humane DNA-merkers, -3.1 decaden voor ruminant DNA-merkers, -2.05 decaden voor coliformen en -2.6 decaden voor E.coli. Kanttekening hierbij is dat het aantal meetronden beperkt is (3x DNA-merkers; 1x micro-organismen) en dat het een momentopname betreft en geen beeld van het volledige seizoen. Om een completer beeld te krijgen van het verwijderingsrendement van de RWZI zijn metingen bij verschillende condities en temperaturen wenselijk (zie aanbeveling 6, 9).

Tabel 4-1. Samenvatting van NGS-MST (n=3) en microbiologische parameters (n=1) in nov-dec 2019-2020.

Getallen in **rood** betreffen de decimale verandering en worden berekend als  $10\log$  verschillen tussen de boven- en ondergelegen rij getallen.

"<DL": beneden detectielimiet

"<<" en ">>": decimale verandering niet berekend vanwege meting beneden detectielimiet

	Microbial paramters		average DNA-markers (copies/L)					NGS-MST Riool + Opp.water
	coliformen	E.Coli	Human	Dog	Ruminant	Helicobacter	Pig	
RWZI influent	6.7E+07	7.9E+07	3.3E+10	1.5E+05	3.6E+07	9.7E+04	<DL	
RWZI effluent	6.0E+05	2.0E+05	4.3E+07	<DL	<DL	<DL	<DL	100%
Eijserbeek, boven RWZI	2.4E+04	3.0E+03	7.2E+05	8.0E+02	6.0E+03	1.1E+04	<DL	13%
Eijserbeek, beneden RWZI	1.9E+05	4.2E+05	2.1E+07	1.8E+03	7.4E+03	<DL	<DL	91%
Eijserbeek	3.4E+04	6.1E+03	1.2E+06	<DL	6.1E+06	4.2E+04	<DL	45%
Gemiddelde winputten	5.91E-02	1.82E-02	6.83E+01	<DL	<DL	<DL	<DL	0.04%

### 4.2 Herkomst besmettingen Eijserbeek

De lozing van RWZI-Simpelveld leidt tot een duidelijke toename van de fecale besmetting op de Eijserbeek van coliformen (0.90 decaden), *E.coli* (2.15 decaden) en humane fecale DNA-merkers (1.45 decaden; zie Tabel 4-1). Ter plaatse van de winning Roodborn is de concentratie van deze indicatoren al weer fors afgenomen tot respectievelijk 0.15 decaden (42%), 0.30 decaden (103%) en 0.21 decaden (62%) verschil met het meetpunt bovenstreams van de RWZI. Het aandeel RWZI- en rioolwaterbacteriën neemt volgens de MST-NGS af van 91% benedenstreams van de RWZI naar 45% ter plaatse van winning roodborn. Wel is er een duidelijke toename van DNA-merkers van runderen en vogels, die dus afkomstig moeten zijn uit een andere bron dan RWZI of riool.

Vermoedelijke is er dus sprake van een combinatie van processen in de Eijserbeek tussen de RWZI en Roodborn:

1. Verlies van riool- en RWZI-bacteriën door infiltratie van beekwater naar het grondwater.
2. Verdunning van riool- en RWZI-bacteriën door drainage van grondwater en runoff van hemelwater.

3. Inactivatie van riool- en RWZI-bacteriën door afsterving, predatie, blootstelling aan zonlicht, etc.
4. Lozing van riool-bacteriën door overstorten.
5. Toename van fecale bacteriën door runoff (afstroming van hemelwater) en uitspoeling van fecaliën van runderen en vogels. Dit omdat in het stroomgebied van de Eijserbeek veel grasland is met koeien, bemest akkerland en natuur met vogelpopulaties.

Uit bovenstaande analyse blijkt dat er sprake is van een combinatie van fecale bronnen (RWZI-Simpelveld, riooloverstorten en lozingen, door riool lekkage verontreinigd grondwater, runoff van dierlijke fecaliën). De beek bevatte fecaliën van mensen, runderen en in mindere mate vogels. Deze kunnen allemaal volksgezondheidskundig relevante pathogenen bevatten.

### 4.3 Herkomst besmettingen ondiepe grondwater

Bij het opstellen van het meetplan is uit praktische overwegingen gebruik gemaakt van bestaande peilbuizen voor het bemonsteren van het infiltratiewater representatief voor landbouw (WP04A), natuur (WP06A) en oeverinfiltratie (WP22). Bij de interpretatie van de resultaten kwam echter naar voren dat deze waarnemingspunten achteraf gezien mogelijk onvoldoende representatief zijn.

- WP22 ligt op enkele meters afstand van de Eijserbeek maar heeft een chlorideconcentratie die ongeveer halverwege de beek en winputten ligt. Blijkbaar bevat het waarnemingsfilter niet uitsluitend beekwater, maar een mengsel van verschillende watertypen. Dit is in lijn met eerdere observaties dat het stromingspatroon in de beekoever sterk varieert afhankelijk van hoe de putten bedreven worden.
- WP06A ligt op vrij grote diepte, slechts enkele meters boven de top van de winfilters, midden in het winveld. Het trekt een vergelijkbare macro-chemische waterkwaliteit aan als de naastgelegen PP03. Volgens de NGS source tracker analyse bevat WP06A ook een klein percentage riool- en beekwater-bacteriën en volgens de qPCR analyse is het besmet met humane feces. Op basis van de chemie bestond al het vermoeden dat het grondwater bij dit waarnemingsfilter ook een deel beekwater bevatte. De wat geringere diepte van het waarnemingsfilter vergeleken met de winputten zou het grotere aandeel oppervlaktewater kunnen verklaren.
- In WP04A zijn ook humane fecale DNA-merkers aangetroffen welke je niet zou verwachten op basis van het landgebruik. Bovendien bevatte de monsters volgens de MST-NGS zowel riool- als oppervlaktewaterbacteriën. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat er besmetting plaatsvond vanuit het nabijgelegen persriool, dat voor zover bekend niet recent is getest op waterdichtheid. Ook is niet uitgesloten dat mensen in het open veld rondom de weg defecerden. Geadviseerd wordt om na te gaan of er daadwerkelijk sprake is van besmetting van het waarnemingsfilter met riool- of oppervlaktewater. Daarnaast adviseren wij om te checken of de humane MST-qPCR bij lage concentraties voldoende specifiek is voor water na bodempassage om uit te sluiten dat er valse positieve detectie optreedt (zie aanbeveling 10).

Het is dus lastig om op basis van de bestaande meetpunten conclusies te trekken over de fecale belasting vanaf het maaiveld in het intrekgebied door infiltratie tijdens piekbuien. Voor een eventueel vervolgonderzoek of uitbreiding van het reguliere monitoringmeetnet wordt daarom geadviseerd om gebruik te maken van andere, minder diepe waarnemingsfilters in natuurgebied rond het winveld, de kalkgraslanden en bemeste weilanden rondom de winning (zie aanbeveling 7).

### 4.4 Herkomst besmetting winputten

#### 4.4.1 Besmetting door Eijserbeek

In de winputten van Roodborn worden incidenteel humane fecale indicator organismen (FIO's) aangetroffen. In dit onderzoek zijn meerdere aanwijzingen gevonden dat deze besmetting in ieder geval ten dele afkomstig waren van de Eijserbeek:



- De bacteriepopulatie vertoonde volgens de MST-NGS in een aantal van de winputten een verband met de Eijserbeek, RWZI-effluent en rioolwater dat in de Eijserbeek geloosd wordt.
- De relatief beperkte reistijd van enkele dagen tot weken tussen de beekoever en de winning, zoals aangetoond met de kunstmatige tracerproef, maken het geohydrologisch gezien plausibel dat de beek een belangrijke bron vormt van fecale besmetting. Bij dergelijke reistijden is de te verwachten concentratieafname van micro-organismen in zandgronden slechts enkele logeenheden volgens ILenT (2019). In Roodborn is de te verwachten verwijdering mogelijk nog geringer doordat minder hechting plaatsvindt in de aanwezige grindlagen en scheuren in de kalksteen.
- De concentratie FIO's in de Eijserbeek waren duidelijk hoger dan in de winputten en bevatten dus in potentie voldoende organismen om de putten te besmetten.
- Daarbij is door WML (2015) in een statistisch verband aangetoond tussen besmettingen en hoge afvoer in de Eijserbeek.

Gezien de korte minimale reistijd van enkele dagen tot weken, mag worden aangenomen dat de verwijdering van indicatororganismen en pathogenen ook beperkt is in het onttrokken grondwater. Hoewel in de winputten alleen humane DNA-merkers zijn aangetroffen, net boven de detectielimiet, is de verwachting dat er ook andere besmettingen voorkomen, aangezien de Eijserbeek de waarschijnlijke besmettingsbron lijkt te zijn.

Een risicovol aspect aan de humane besmettingen is dat deze, vergeleken met dierlijke feces, vaker volksgezondheidskundig relevante virussen bevatten die in een watermilieu kunnen overleven. Bij dierlijke feces bestaat het volksgezondheidskundige risico vooral uit bacteriën zoals *Campylobacter*. Virussen worden over het algemeen minder goed verwijderd tijdens bodempassage dan grotere organismen zoals bacteriën.

De gemiddelde concentratie coliformen in de winputten was in november 2019 circa 5 decaden lager dan in de beek. Voor een goede onderbouwing van de AMVD, is het aan te raden om deze verhouding te bepalen voor alle historische metingen en met name op momenten met piekafvoer en -neerslag (zie aanbeveling 1).

#### 4.4.2 Besmetting uit riolering

Het middels MST-NGS en MST-qPCR berekende verband tussen de winputten en rioolbronnen is geen directe besmetting (van riolering via de ondergrond) maar is zeer waarschijnlijk een indirecte besmetting doordat de bacteriepopulatie van de Eijserbeek deels gevoed wordt door rioolwater. Het waarnemingsfilter met oevergrondwater (WP22) bevat volgens de MST-NGS en MST-qPCR namelijk ook zowel riool- en oppervlaktewater, terwijl directe besmetting met rioolwater van dit meetpunt is uitgesloten op basis van de ligging en infiltratie van beekwater. Besmettingen van de winningen door lekkage van rioolwater in het gehucht de Piepert is dus geen voor de hand liggende hoofdoorzaak. Aangezien het grondwater door infiltratie van de beek. Besmetting vanuit de septic tank is niet uitgesloten, maar speelt geen belangrijke rol gezien de afwezigheid van unieke septic-tank DNA-features (zie §3.7).

#### 4.4.3 Besmetting vanaf maaiveld

Op basis van de huidige metingen is niet uitgesloten dat er vanuit fecaliën die op maaiveld liggen ook besmetting plaatsvindt van micro-organismen die door infiltratie van hemelwater gedurende piekbuien naar de verzadigde zone verplaatsen. Het grondwater onder landbouwgebied (WP04a) en natuur (WP06a) bevat namelijk ook fecale indicatororganismen en humane DNA-merkers, al zijn deze laatste mogelijk afkomstig van een andere bron (zie §4.2). Bovendien is niet uitgesloten dat er een ook statistisch verband is tussen neerslagintensiteit en besmettingen, vergelijkbaar met het door WML (2015) aangetoonde verband met afvoer. Het wingebied is openbaar toegankelijk waardoor er niet alleen natuurlijk fauna kan defeceren (vogels) maar ook huisdieren (honden) en er zijn in het verleden zijn ook wel humane "wildpoepers" aangetroffen. Bovendien lijkt er basis van de topologie een hoge potentie voor infiltratie door accumulatie van runoff aan de voet van de heuvel. Daarnaast kan

op de omliggende landbouwgronden besmetting plaatsvinden door toepassing van dierlijke mest. Er is dus een potentie voor besmetting vanaf maaiveld. Het is dan ook aan te raden om de relaties tussen afvoer, neerslag, besmetting en verwijdering nader te analyseren op basis van actuele en volledige informatie (zie aanbeveling 1) en aanvullende veldexperimenten (zie aanbeveling 6).

## 4.5 Oplossingsrichtingen

De winning Roodborn kampt met een combinatie van fecale bronnen (mens, runderen, vogels) en oorzaken (runoff, RWZI, riooloverstorten en -lozingen). De besmetting is in ieder geval ten dele het gevolg van transport van deze bronnen naar de winning via de Eijserbeek, hoewel besmetting vanaf maaiveld in het intrekgebied van winning niet is uitgesloten.

Het ligt voor de hand om te veronderstellen dat er grote temporele variaties kunnen optreden in de concentratie fecale organismen in de beek. Bij lage afvoer kan de concentratie bijvoorbeeld toenemen doordat er minder verdunning optreedt van RWZI- en rioolozingen. Bij hoge beekafvoer is er een grotere kans dat fecaliën die op de oever liggen worden meegevoerd. Het is daarom (op basis van de huidige zeer beperkte set metingen) de vraag of bronmaatregelen, zoals het vergroten van het zuiveringsrendement van de RWZI een significant effect zullen hebben op de microbiologische veiligheid van de winning Roodborn.

Mogelijk is het kansrijk om in te zetten op het verminderen van de kwetsbaarheid van de winning. Het bekleden van de beekbodem en oever met een kleilaag zou bijvoorbeeld helpen om de reistijd te vergroten. Bovendien is de verwijdering van micro-organismen in klei vele malen groter dan in het slib, leem en grindige materiaal dat momenteel op de bodem en oever ligt. Een mogelijk nadeel van bekleding van de beekbodem is dat hierdoor de infiltratie vanuit de beek afneemt, de grondwaterstanden in het wingebed dalen en verdroging kan optreden van natuur. Verlaging van de stijghoogten betekent ook dat er kortsluitstroming kan optreden wanneer er gaten zitten in de bekleding van de beek. De reistijd wordt dan op deze plekken juist korter dan de huidige situatie (door vergroting van stijghoogteverschil in de beekbodem t.o.v. de huidige situatie) met navenant minder afname van micro-organismen. Het aanbrengen en in-stand houden van een volledige bekleding (denk aan beschadiging door wortels) is dus een belangrijk aandachtspunt van deze oplossingsrichting. Mogelijk dat bekleding met plastisch materiaal zoals klei daarom de voorkeur geniet.

Een andere oplossingsrichting zou kunnen zijn het aanpassen van de zuivering. Aandachtspunt hierbij zijn de bouwkosten, effectiviteit van de verwijdering en toegenomen energieverbruik. In dit onderzoek is verder niet gekeken naar nut- en noodzaak.

## 4.6 Meerwaarde van multitracing

In dit onderzoek zijn meerdere tracermethoden gebruikt; een werkwijze die ook wel wordt aangeduid als “multi-tracing”. De combinatie van methoden was nuttig om een completer beeld te genereren van de besmettingssituatie:

- De kunstmatige tracerproef met bromide gaf informatie over de minimale reistijd van de oever van de Eijserbeek naar de winning en daarmee inzicht in de potentie voor besmettingen van winputten vanuit de beek.
- De relatie tussen anorganische parameters en met name de chloride/ bromide-verhouding en de microbiologische parameters maakte duidelijk dat besmette winputten een groter aandeel beekwater onttrekken. Dit geeft aan dat de beek een belangrijke bron is voor de besmettingen en is in lijn met het eerder door WML (2015) in beeld gebrachte verband tussen de besmettingen, hoge afvoer en neerslag.
- De MST-qPCR had als meerwaarde dat ze inzicht gaf in dat de Eijserbeek besmet was met feces van humane afkomst en herkauwers en dat de winputten besmet waren met feces van humane afkomst.
- Met de NGS source tracking werd DNA van bacteriën aangetoond in de beek en de winputten dat afkomstig was uit rioolwater, dat, direct of indirect uit het riool of via RWZI effluent in de winputten terechtgekomen is.

## 5 Conclusies en aanbevelingen

### 5.1 Conclusies

Het doel van dit onderzoek was om met verschillende chemische en microbiële tracingstechniek de verontreinigingsbronnen op winning Roodborn in beeld te brengen en het testen van de toepasbaarheid van de moleculair biologische technieken (MST-qPCR) en MST-NGS) bij grondwaterwinningen.

Met een eerdere tracerproef was al aangetoond dat er een relatief snelle hydraulische verbinding van enkele dagen bestaat tussen de beek en de winning. De aanwezigheid van beekwater in de putten waar ook het vaakst besmettingen worden gedetecteerd is op basis van de verhouding in Cl-mengverhouding duidelijk geworden in dit onderzoek. Daarnaast vertoonde de bacteriepopulatie in de winputten op Roodborn volgens de MST-NGS een sterke associatie met de Eijserbeek, RWZI-effluent en rioolwater dat in de Eijserbeek geloosd wordt. We concluderen hieruit dat humaan besmet water uit de Eijserbeek waarschijnlijk een significante bron vormt voor de microbiologische veiligheid van de winning. De aanwezigheid van humane DNA-merkers verhoogt het risicoprofiel van de besmetting, aangezien humane fecaliën vaak virussen bevatten welke veel minder verwijderd worden tijdens bodempassage dan de waarnemingen op basis van bacteriën. De MST-NGS resultaten geven aan dat er meer putten in Roodborn rioolwater bacteriën bevatten dan blijkt op basis van de traditionele indicatororganismen die WML (en andere waterbedrijven) regulier meten.

De humane besmettingen in de Eijserbeek worden zowel gevoed door het RWZI-effluent en rioolwater dat onbedoeld in de beek terecht komt (bijvoorbeeld door directe lozingen, foute aansluitingen of overstorten). Besmettingen met fecale organismen vanuit dierlijke bronnen (runderen, vogels) komt vermoedelijk door runoff van fecaliën naar de beek.

Besmettingen door infiltratie bij hevige regenval van fecaliën die op maaiveld liggen zijn niet uit te sluiten als aanvullende oorzaak van de besmettingen. Ook de riolering op het pompstation (waaronder een septic tank) kan mogelijk een beperkte bijdrage leveren aan de fecale besmettingen.

Door de combinatie van oorzaken (RWZI, riooloverstorten en – lozingen, runoff) is het lastig om de besmettingen met alleen bronmaatregelen tegen te gaan. Indien nodig, is het effectiever om de kwetsbaarheid van de winning zelf aan te pakken met maatregelen die de reistijd tussen de beek en winputten en/ of de verwijdering in de oever vergroten. Bijvoorbeeld het bekleden van de beekbodem -en oever met een kleilaag.

De aanwezigheid van humane DNA-merkers en riool-/ oppervlaktewaterinvloed in een peilbuis in landbouwgebied biedt aanleiding tot enige twijfel over de nauwkeurigheid en validiteit van de MST-qPCR en MST-NGS methoden bij lage concentraties (rond de detectielimiet). De correlatie tussen beide methoden geeft indicaties dat de resultaten van de methoden betrouwbaar zijn (paragraaf 3.8), maar sluit niet uit dat de MST-qPCR methode specifiek genoeg is. Daarnaast kunnen rioolwater-bacteriën en humane fecale indicatorsoorten ook van nature in lage concentraties in winputten voorkomen, zonder dat dit een besmettingsgevaar oplevert (als 'achtergrondruis'). Om deze twijfels weg te nemen worden in paragraaf 5.3 een aantal aanbevelingen gedaan.

## 5.2 Aanbevelingen voor WML

Wij adviseren om direct enkele maatregelen te overwegen die het risico op besmettingen reduceren. Daarnaast adviseren wij op basis van de inzichten uit deze studie om nog enkele aanvullende analyses uit te voeren. Tot slot raden wij aan om de monitoring ook voor de lange termijn aan te passen die mogelijk nog tot nieuwe inzichten kunnen leiden over aanvullende maatregelen om de microbiologische veiligheid van de winning te vergroten en een betere early warning voor de chemische waterkwaliteit. De aanbevelingen zijn uitgewerkt in Tabel 5-1.

Tabel 5-1. Aanbevelingen voor WML

Nr	Aanbeveling	Motivatie
<i>Evaluatie besmettingsrisico van winning Roodborn (update)</i>		
1	Bereken de log-verwijdering van microbiologische parameters als functie van de tijd in de beek en tijdens bodempassage door middel van een tijdreeksanalyse op de relatie tussen beekafvoer, fecale indicatorsoorten, chloride en bromide.	Meer inzicht in de relatie tussen beekafvoer, neerslag en besmetting. Betere onderbouwing log-verwijdering van bodempassage voor AMVD op basis van actuele informatie (onderbouwing aanbeveling 2).
<i>Maatregelen fecale besmettingsrisico winning Roodborn: (indien uit aanbeveling 1 volgt dat winning microbiologische risico vormt):</i>		
2	Evalueer welke maatregelen effectief zijn om het besmettingsrisico te verkleinen. Bijvoorbeeld, bekleding van de bodem en oever van de beek, om het risico op besmettingen van de winputten te voorkomen, indien de hydrologische effecten dit toestaan (zie aanbeveling 3).	De beek is een belangrijke besmettingsbron. Bekleding met klei vergroot de reistijd en verwijdering (retentie) van micro-organismen en leidt daarmee tot een afname van het besmettingsrisico.
3	Bepaal de hydrologische effecten van bekleding van de beekbodem (zie aanbeveling 2).	Bekleding van de beek kan tot verdroging leiden in het wingebied. Er wordt daarom aangeraden om ook naar andere manieren te zoeken die pathogene micro-organismen kunnen weren.
4	Vervang de septic tank door een aansluiting op het rioolstelsel. Controleer deze leiding op waterdichtheid.	Een septic tank vormt een risico vanwege de locatie (dicht bij de winputten in kalksteen) en is niet goed controleerbaar op kleine lekkages.
<i>Uitgebreide evaluatie besmettingsrisico (indien uit aanbeveling 1 volgt dat er te grote onzekerheid is over het besmettingsrisico):</i>		
5	Voer een qPCR uit op humane virussen en analyseer de correlaties met reeds uitgevoerde analyses	Verificatie van de eerdere detectie van humane merkers middels MST-qPCR en rioolwater bacteriën met MST-NGS. Metingen aan virussen leveren aanvullend inzicht in de

		volksgezondheidskundige risico's aangezien tijdens bodempassage de concentratie virussen over het algemeen minder snel afneemt dan bacteriën.
6	Voer een berekeningsexperiment uit met modelorganismen (bijv: MS2) en een zouttracer, gericht op het bepalen van de verwijdering van micro-organismen in de onverzadigde zone.	Beter inzicht in de potentiële bijdrage van natuur- en landbouwgebied aan fecale besmettingen door infiltratie van piekbuien vanaf maaiveld.  Eventueel inzicht in Cl/Br na neerslag door eerst hemelwatersamenstelling te doseren (zonder zouttracer).
<i>Optimalisatie monitoring van winning roodborn</i>		
7	Breid het reguliere meetnet uit met extra meetlocaties: (1) Extra (nieuwe) freatisch waarnemingsputten voor landbouw en natuur (2) RWZI water (3) Rioolwater(4) Gezamenlijk ruwwater	Beter in beeld brengen van bronnen van fecale en overige verontreinigingsbronnen. Betere voorspelling waterkwaliteitsontwikkeling
8	Harmoniseer de monitoringparameters in de winputten en overige meetpunten zodat overal dezelfde parameters beschikbaar zijn (zelfde OMV's, fecale indicatorsoorten, etc.)	Eenduidiger en makkelijker analyse welke bronnen bijdragen tot bepaalde type verontreinigingen
9	Voer gedurende enkele jaren extra intensieve metingen uit bijvoorbeeld aantal maal in zomer na piekbui en in winter) in een deel van de huidige monitoringlocaties (en extra locaties, zie aanbeveling 8). (en de aanvullende locaties met analyses op fecale indicatorsoorten, qPCR, en Cl/Br	Inzicht in de bijdrage van RWZI, riooloverstorten, runoff naar de beek en lokale infiltratie aan besmetting van de winning. Dit t.b.v. verder onderbouwde maatregelen.

### 5.3 Aanbevelingen voor nader onderzoek

Uit het onderzoek blijkt dat zowel de MST-qPCR als de MST-NGS nuttige informatie kan opleveren over bron van besmettingen wanneer de reistijd niet langer is dan enkele dagen tot weken en het DNA-materiaal in vrij hoge concentraties aanwezig is.

Tabel 5-2 bevat voorstellen hoe de microbiologische tracertechnieken verder te ontwikkelen, zodat ze een grotere zeggingskracht krijgen en goedkoper worden om grootschalig toe te passen bij andere waterbedrijven.

Tabel 5-2. Aanbevelingen voor de drinkwatersector: verder ontwikkelen van microbiologische tracers

Nr	Aanbeveling	Motivatie
10	Valideer de toepasbaarheid van de MST-qPCR en MST-NGS ook voor monsters tegen de huidige detectielimiet (in sub- en anoxische grondwatermonsters) door te testen of er geen valse positieven optreden. Voer hiertoe een sequentie analyse uit op het MST-qPCR product in de WPs, PP's en rioolwater en vergelijk de sequenties onderling en met humaan fecale <i>Bacteroides</i> . En voer metingen MST-qPCR en MST-NGS metingen uit op locaties waar nooit besmetting heft opgetreden of verwacht wordt	De methode kan een nuttig instrument zijn voor bronopsporing, maar is nog niet gevalideerd voor dieper grondwater.
11	Ontwikkeling van een qPCR voor rioolwater en RWZI-effluent.	Snelle en goedkopere identificatie van besmettingsbronnen en is mogelijk beter in staat onderscheid te maken tussen rioolwater en RWZI effluent
12	Ontwikkelen van een passieve sampler voor fecale indicatororganismen.	Passive samplers kunnen de pakkans vergroten voor detectie van indicator organismen vergeleken met reguliere steekmonsters.

## 6 Referenties

- Cirkel, D.G., Prevoo, R., 2015. Tracerproef Roodborn: Proefbeschrijving en resultaten, KWR 2015.034 KWR Water Research Institute, Nieuwegein.
- Cirkel, D.G., van der Schans, M.L., van Loon, A., Stuyfzand, P.J., van Huijgevoort, M., 2018. Betrouwbare en betaalbare tracerproeven, update 2017 BTO 2018.069 BTO 2018.069, KWR Water Research Institute, Nieuwegein. <https://library.kwrwater.nl/publication/59216399/>
- Faith, D.P., 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological conservation*, 61(1): 1-10. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(92\)91201-3](https://doi.org/10.1016/0006-3207(92)91201-3)
- Heijnen, L., 2015a. Eigenschappen van DNA merkers voor fecale verontreiniging. [Properties of DNA Markers for Fecal Contamination] BTO 2015.023.
- Heijnen, L., 2015b. Identificeren van de bron van fecale besmettingen. [Identification of the Source of Fecal Contamination] KWR 2015.036, KWR Water Research Institute, Nieuwegein.
- Heijnen, L., Learbuch, K., 2013. Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen. [Development and application of quantitative PCR methods to identify the source of fecal contaminations] BTO 2013.014, KWR Water Research Institute, Nieuwegein.
- Heijnen, L. et al., 2014. Fecale verontreiniging in zwemwater identificeren met DNA-merkers. H2O-Online, 23 april 2014. <https://edepot.wur.nl/300892>
- ILT, 2019. Richtsnoer analyse microbiologische veiligheid drinkwater (AMVD). [Guideline for analysis of microbial safety of drinking water.], Inspectie Leefomgeving en Transport. <https://www.ilent.nl/documenten/publicaties/2020/11/27/richtsnoer-analyse-microbiologische-veiligheid-drinkwater-amvd>
- Jardé, E. et al., 2018. Application of a microbial source tracking based on bacterial and chemical markers in headwater and coastal catchments. *Science of The Total Environment*, 610: 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.235>
- Knights, D. et al., 2011. Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nature methods*, 8(9): 761-763. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1650>
- Layton, A. et al., 2006. Development of Bacteroides 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Applied and environmental microbiology*, 72(6): 4214-4224. <https://doi.org/10.1128/AEM.01036-05>
- Lee, D.-Y. et al., 2014. Characterization of sources and loadings of fecal pollutants using microbial source tracking assays in urban and rural areas of the Grand River Watershed, Southwestern Ontario. *Water research*, 53: 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.003>
- Meshnik, J., 2012. Fliesswege für infiltrierendes Bachwasser in das Rohwasser einer Wassergewinnungsanlage bei einem Überflutungsszenario. [Translated Titl.], Reinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Aachen.
- Ramette, A., 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*, 62(2): 142-60. 10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x
- Stuyfzand, P.J., 2017. Hydrogeochemical (HGC 2.4), for storage, management, control, correction and interpretation of water quality data in Excel® spread sheet, updated june 2017 BTO 2012.244(s), KWR, Nieuwegein.
- Timmers, P., 2021. NGS bronopsporing pilot inlaatwater Woerden. [NGS source detection of inlet water in Woerden] KWR 2021.013, KWR Water Research Institute, Nieuwegein.
- Timmers, P. et al., 2020. Microbiële vingerafdruk voor bronopsporing in oppervlaktewaterbeheer. H2O, Juni 2020: 4-7. <https://library.kwrwater.nl/publication/61182770/>
- Timmers, P. et al., 2019. DNA fingerprinting in oppervlaktewaterbeheer KWR 2019.039.
- TNO, 2020. Subsurface models: borehole logs with interpretation BRO REGIS II v 2.2. <https://www.dinoloket.nl/en/subsurface-models>
- Ullmann, A.V., 2012. Lokale, GIS-basierte Wasserbilanz für eine Wassergewinnungsanlage und Ermittlung der Hochwasserüberschwemmungszonen eines angrenzenden Baches. [Translated Titl.], Reinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Aachen.
- Van Driel, F., 2018. Geneesmiddelen onderzoek winveld Roodborn, 40749360 (AMVD's 2018) WML, Maastricht. WML, 2015. Memo: Gegevens Eijserbeek - WBL, Watermaatschappij Limburg, Maastricht.



# I MST-qPCR resultaten

Locatie	Sampling Date	DNA after extraction (ng/μl)	Recovery (%)	Bacteroides (copies/L)				
				Human	Dog	Ruminant	Helicobacter	Pig
Septic tank	28-11-2019	3.4	40.3	9.50E+07	<5.0E+04	<5.0E+04	<2.5E+05	<2.5E+05
	03-12-2019	4.52	59.1	7.5E+07	<3.4E+04	<3.4E+04	<1.7E+05	<1.7E+05
	05-12-2019	3.82	55.5	8.4E+07	<3.6E+04	<3.6E+04	<1.8E+05	<1.8E+05
Riool Piepert	25-11-2019	0.92	3.9	Present	R too low	R too low	R too low	R too low
	27-11-2019	8.84	42.8	3.90E+10	9.30E+04	<4.7E+04	<2.3E+05	<2.3E+05
	02-12-2019	8.96	57.8	4.7E+10	<3.5E+04	<3.5E+04	<1.7E+05	<1.7E+05
Rioolgemaal Eys	25-11-2019	4.16	15.8	Present	Not Present	Present	Not Present	Not Present
	27-11-2019	7.12	43.6	6.40E+10	<4.6E+04	<4.6E+04	<2.3E+05	<2.3E+05
	02-12-2019	12.04	60.5	5.9E+10	5.5E+04	<5.5E+04	<2.8E+05	<2.8E+05
RWZI influent	25-11-2019	0.46	1.7	Present	R too low	Present	R too low	R too low
	27-11-2019	7.56	39.1	4.20E+10	1.80E+05	3.20E+07	<2.6E+05	<2.6E+05
	02-12-2019	7.88	55.5	2.4E+10	1.1E+05	4.0E+07	1.9E+05	<1.8E+05
RWZI effluent	25-11-2019	1.21	2.1	Present	R too low	R too low	R too low	R too low
	27-11-2019	23.1	40.4	6.00E+07	<4.9E+03	3.70E+04	<2.5E+04	<2.5E+04
	12-02-2019	15.8	44.8	2.60E+07	<4.5E+03	1.10E+04	<2.2E+04	<2.2E+04
Eijserbeek, boven RV	27-11-2019	3.61	34.9	2.90E+05	2.40E+03	6.00E+03	<7.6E+03	<7.6E+03
	02-12-2019	4.36	56.4	1.1E+06	<890	1.2E+04	2.7E+04	<4.4E+03
	04-12-2019	4.04	62.9	7.8E+05	<800	<800	7.1E+03	<4.0E+03
Eijserbeek, beneden	27-11-2019	33.5	46.9	4.50E+07	3.70E+03	1.10E+04	<1.8E+04	<1.8E+04
	12-02-2019	12.68	33.6	1.00E+07	<3.0E+03	4.60E+03	<1.5E+04	<1.5E+04
	04-12-2019	20.00	68.8	6.8E+06	1.6E+03	6.7E+03	<7.3E+03	<7.3E+03
Eijserbeek	27-11-2019	9.8	43.8	2.00E+06	<2.1E+03	1.70E+07	2.20E+04	<1.0E+04
	02-12-2019	6.24	55.2	1.1E+06	<1.2E+03	1.7E+05	4.4E+04	<6.0E+03
	04-12-2019	6.04	61.5	4.4E+05	<1.1E+03	9.9E+05	6.0E+04	<5.4E+03
WP22A	25-11-2019	0.28	61.7	<160	<160	<160	<810	<810
	27-11-2019	4.32	29.3	1.80E+04	<310	830	<1.6E+03	<1.6E+03
	02-12-2019	0.00	0.0	R too low	R too low	R too low	R too low	R too low
	04-12-2019	2.63	51.1	3.7E+03	<300	<300	<1.5E+03	<1.5E+03
WP06A	02-12-2019	1.65	58.2	630	<90	<90	<450	<450
	04-12-2019	1.02	55.1	<91	<91	<91	<450	<450
	27-11-2019	0.26	37.7	<140	<140	<140	<700	<700
WP04A	27-11-2019	0.23	25.1	620	<210	<210	<1.0E+03	<1.0E+03
	02-12-2019	0.37	61.2	406	<85	<85	<430	<430
	04-12-2019	0.37	64.3	<78	<78	<78	<390	<390

Locatie	Sampling Date	DNA after extraction (ng/μl)	Recovery (%)	Bacteroides (copies/L)				
				Human	Dog	Ruminant	Helicobacter	Pig
PP03	27-11-2019	0.22	37.3	<130	<130	<130	<670	<670
	02-12-2019	0.28	53.4	460	<94	<94	<470	<470
	04-12-2019	0.27	69.0	180	<72	<72	<360	<360
PP06	27-11-2019	0.25	40	<120	<120	<120	<620	<620
	02-12-2019	0.22	55.6	<90	<90	<90	<450	<450
	04-12-2019	0.22	54.5	<92	<92	<92	<460	<460
PP08	27-11-2019	0.41	43.4	<120	<120	<120	<580	<580
	02-12-2019	0.82	56.1	160	<91	<91	<460	<460
	04-12-2019	0.45	64.9	<77	<77	<77	<390	<390
PP09	28-11-2019	0.26	38.5	<130	<130	<130	<650	<650
	03-12-2019	0.11	47.8	410	<230	<230	<1.2E+03	<1.2E+03
	03-12-2019	0.18	65.4	400	<150	<150	<760	<760
	05-12-2019	0.31	60.0	<83	<83	<83	<420	<420
PP10	05-12-2019	0.29	53.6	<93	<93	<93	<470	<470
	27-11-2019	0.26	35.1	210	<140	<140	<710	<710
	02-12-2019	0.37	53.9	110	<93	<93	<460	<460
PP13	04-12-2019	0.35	64.2	<78	<78	<78	<390	<390
	27-11-2019	0.17	29.3	<170	<170	<170	<850	<850
	02-12-2019	0.17	51.8	300	<97	<97	<480	<480
PP15	04-12-2019	0.15	61.9	<81	<81	<81	<400	<400
	28-11-2019	0.14	38	<130	<130	<130	<660	<660
	03-12-2019	0.13	53.1	<94	<94	<94	<470	<470
PP16	05-12-2019	0.20	56.0	<89	<89	<89	<450	<450
	28-11-2019	0.33	32.9	<150	<150	<150	<760	<760
	03-12-2019	0.31	56.3	<89	<89	<89	<440	<440
PP17	05-12-2019	0.40	57.8	<87	<87	<87	<430	<430
	28-11-2019	0.24	33.6	<150	<150	<150	<740	<740
	03-12-2019	0.25	59.5	<84	<84	<84	<420	<420
PP18	05-12-2019	0.29	52.4	<95	<95	<95	<480	<480
	27-11-2019	0.19	29	<170	<170	<170	<860	<860
	04-12-2019	0.17	54.3	<92	<92	<92	<460	<460
PP20	05-12-2019	0.23	57.0	<88	<88	<88	<440	<440
	28-11-2019	0.57	39.2	<130	<130	<130	<640	<640
	03-12-2019	0.74	56.9	160	<88	<88	<440	<440
PP20	05-12-2019	0.81	57.2	<87	<87	<87	<440	<440