

Bedrijfstakonderzoek  
BTO 2023.062 | Augustus 2023

## Passive sampling van micro-organismen en virussen

# Colofon



## Passive sampling van micro-organismen en virussen

**BTO 2023.062 | Augustus 2023**

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

### Opdrachtnummer

402045/320

### Projectmanager

Michiel Hootsmans

### Opdrachtgever

BTO - Verkennend onderzoek

### Auteur(s)

Dr Peer H.A. Timmers, Dr Elvio Amato, Goffe Elsinga BSc

### Kwaliteitsborger(s)

Prof Gertjan Medema

### Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

### Keywords

Passive sampling, bacteroides, crAssphage, micro-organismen, virussen, microbial source tracking

Jaar van publicatie  
2023

### Meer informatie

Dr Peer H.A. Timmers

T +31 30 606 9636

E [peer.timmers@kwrwater.nl](mailto:peer.timmers@kwrwater.nl)

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511

E [info@kwrwater.nl](mailto:info@kwrwater.nl)

I [www.kwrwater.nl](http://www.kwrwater.nl)

# KWR

Augustus 2023 ©

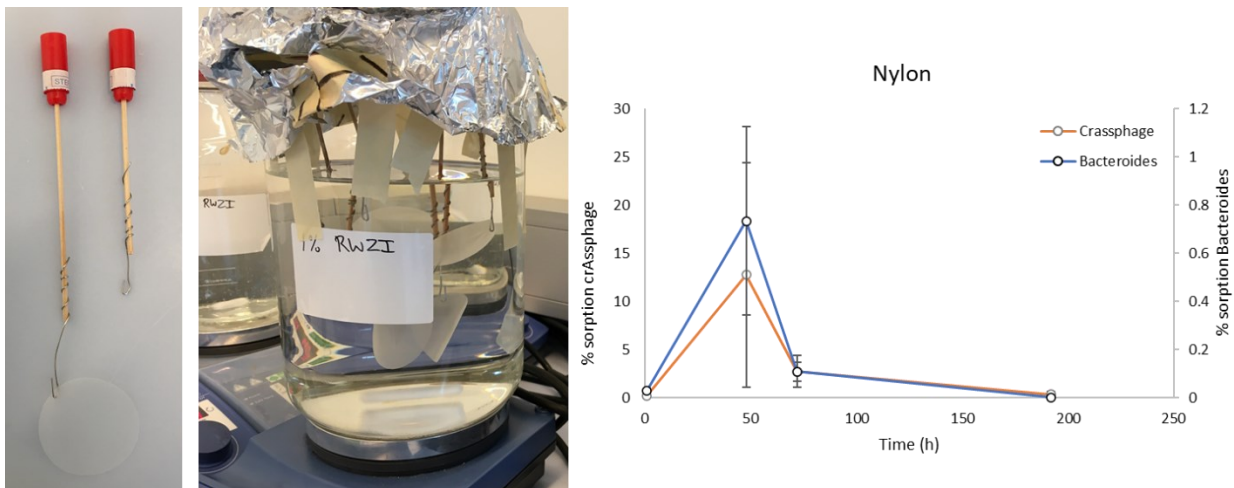
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden veeleevoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen,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

# Managementsamenvatting

## Passive sampling van micro-organismen en virussen kan de ‘pakkans’ van contaminatie vergroten ten opzichte van steekmonsters

**Auteur(s):** dr. Peer Timmers, dr. Elvio Amato en Goffe Elsinga BSc

Passive sampling voor detectie van bacteriën of virussen in de drinkwaterpraktijk of oppervlaktewaterbeheer is mogelijk, maar de incubatietijd hangt sterk af van de temperatuur van het water. Daarnaast vertonen bacteriën en virussen een grote variatie in opname-kinetiek en zijn er grote verschillen in sorptie tussen replica's van sorptiemiddelen. Dit blijkt uit een studie naar een toepassing van passieve sampling voor microbiologische detectie van bacteriën en virussen in water (Figuur 1). Passive sampling wordt doorgaans gebruikt voor het bemonsteren van chemische stoffen in verscheidene milieus. Hierbij worden over een langere periode stoffen in een matrix geaccumuleerd, zodat de gemiddelde concentratie met een lage detectielimiet is te bepalen. Voor microbiologische detectie kan passieve sampling – in plaats van tijdgevoelige steekmonsters – de ‘pakkans’ en gevoeligheid van detectie van pathogenen en indicatorsoorten vergroten bij een lagere monitoringsfrequentie en tegen lagere kosten.



Figuur 1: passieve sampling experimenten met nylon als sorptiemiddel in RWZI verdunningen voor de sorptie van bacteriën (*Bacteroides*) en virussen (*crAssphage*).

### Belang: detectie van contaminatie

Voor het bepalen van de microbiologische waterkwaliteit is vooral de aan- of afwezigheid en concentratie van (opportunistische) pathogene virussen en micro-organismen van belang. In oppervlaktewater worden de pathogenen gemeten, maar in de zuivering, in grondwater en drinkwater worden indicatororganismen gebruikt. Dit zijn

organismen die zelf niet pathogeen zijn, maar waarvan de aanwezigheid gerelateerd is aan aanwezigheid van pathogene micro-organismen. Deze indicatororganismen zijn beter te detecteren omdat ze vaak in hogere concentraties voorkomen.

Voor waterkwaliteitsdoeleinden is het niet alleen belangrijk om (potentieel) gevaarlijke virussen en

bacteriën te detecteren. Het is ook van meerwaarde dat de bron van contaminatie kan worden opgespoord. Microbiële bronopsporing (microbial source tracking; MST) is hiervoor een geschikte techniek. Een veelgebruikte MST-techniek is bijvoorbeeld de toepassing van 16S rRNA merkers voor fecale indicatorsoorten zoals *Bacteroides* en *Helicobacter*. Hiermee kunnen fecale besmettingsbronnen worden opgespoord van vogels, honden, mensen of runderen. In deze studie is verkend of passieve sampling van waarde is voor detectie van virussen en bacteriën.

#### **Aanpak: passieve sampling van MST**

Voor de microbiologische waterkwaliteit worden kweekmethoden gebruikt waarbij een monster binnen 24 uur moet zijn geanalyseerd. Daarom wordt vooral gebruik gemaakt van steekmonsters, die enkel een momentopname geven. Maar met deze 'snapshots' kan een contaminatiemoment over het hoofd worden gezien, wat leidt tot een onderschatting van het risico. DNA/RNA-methoden zijn minder gevoelig voor afsterving en worden steeds vaker toegepast. Daarom ontstaan hiermee goede mogelijkheden voor passieve sampling, waarbij een langere tijd kan worden bemonsterd.

Daarbij moet een aantal belangrijke aspecten worden onderzocht. Ten eerste is gekeken welke sorptiemiddelen het beste bacteriën en virussen opnemen. Daarnaast is de opname-kinetiek onder verschillende omstandigheden bepaald. Hierbij is ook gekeken naar degradatie van de MST tijdens de experimenten.

#### **Resultaten: effect van sorptiemiddel, temperatuur en incubatietijd op passieve sampling van MST**

Nylon vertoont de hoogste sorptie van bacteriën en virussen bij 1% rioolwater, zowel voor 4°C als 20°C. Bij lage temperatuur is de sorptiesnelheid lager dan bij hogere temperatuur, en in dit geval treedt ook minder degradatie op van de MST. Degradatie van *Bacteroides* is mogelijk mede een gevolg van de hoge concentraties crAssphage die waren toegevoegd. Bij hogere temperatuur leken zowel de sorptiesnelheid als degradatiesnelheid toe te nemen. Dit houdt in dat bij lagere temperatuur, zoals grondwater, de passieve samplers mogelijk langer in het water moeten incuberen dan bij hogere temperatuur, zoals oppervlaktewater. Detectie van een MST in grondwater kan dus over een langere periode op besmettingen wijzen dan in oppervlaktewater.

#### **Toepassing: grondwater en oppervlaktewater**

Passieve sampling lijkt een veelbelovende techniek voor het opsporen van zowel bacteriële als virale merkers. Bij lagere temperatuur moet de techniek voor langere tijd worden uitgevoerd dan bij hogere temperatuur. Het is nog onduidelijk welke voor- en nadelen passieve sampling heeft ten opzichte van de huidige steekmonster-methode. Dit is mede afhankelijk van de snelheid van verzadiging van de passieve samplers in het veld. Vervolgonderzoek zal dit duidelijk moeten maken.

#### **Het Rapport**

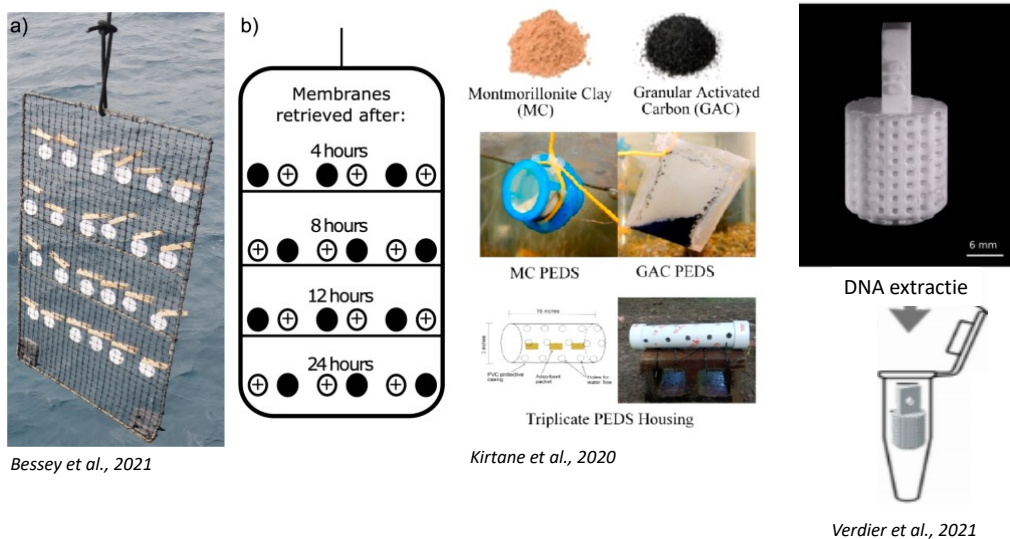
Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Passive sampling van micro-organismen* (BTO 2023.062) en in de trendalert *Passive sampling van micro-organismen en DNA* (BTO 2021.041).

# Inhoud

Colofon	<b>1</b>
<i>Managementsamenvatting</i>	<b>2</b>
Inhoud	<b>4</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>5</b>
<b>2 Doel en opzet</b>	<b>6</b>
2.1 Microbiologische waterkwaliteit	6
<b>3 Materiaal en methoden</b>	<b>7</b>
3.1 Monsternamen, DNA extractie en qPCR analyses	7
3.2 Experiment 1	7
3.3 Experiment 2	8
3.4 Experiment 3	9
<b>4 Resultaten</b>	<b>12</b>
4.1 Experiment 1	12
4.2 Experiment 2	15
4.3 Experiment 3	17
<b>5 Discussie</b>	<b>19</b>
5.1 Sorptiemiddelen	19
5.2 Temperatuur	19
5.3 Incubatietijd	20
<b>6 Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>21</b>
6.1 Conclusies	21
6.2 Aanbevelingen	21
<b>7 Referenties</b>	<b>22</b>

# 1 Inleiding

Passive sampling wordt frequent toegepast voor het bemonsteren van chemische stoffen in verscheidene milieus (Morin, Miège et al. 2012, Poulier, Lissalde et al. 2014, Clokey, Hawker et al. 2023). Hierbij worden stoffen geaccumuleerd in een matrix (een sorptiemiddel of 'sorbent' in het Engels) over een lange periode zodat de gemiddelde concentratie met een lage detectielimiet kan worden bepaald. Passive sampling voor microbiologische detectie wordt in de drinkwaterpraktijk nog niet toegepast maar kan mogelijk de pakkans en gevoeligheid van detectie van pathogenen en indicator organismen vergroten. Daarnaast zijn lagere monitoringsfrequentie en lagere kosten de mogelijke voordelen boven het nemen van steekmonsters. Er zijn voorbeelden van passieve sampling voor microbiologische detectie van pathogenen, microbiële indicatoren en eDNA (Figuur 1). Nader onderzoek is nodig om bredere toepassing in de drinkwaterpraktijk of oppervlaktewaterbeheer mogelijk te maken.



Figuur 1: Enkele voorbeelden van passieve sampling materialen om DNA, bacteriën en/of virussen te binden in verschillende milieu.

Het in dit rapport beschreven verkennend onderzoek is naar aanleiding van een trendalert waarin uitvoerig is beschreven wat passieve sampling inhoudt en waar het voor gebruikt wordt. Daarnaast wordt de potentie van passieve sampling voor micro-organismen en DNA ook daarin beschreven. Voor de inleiding van dit rapport wordt dan ook naar deze trendalert gerefereerd (Timmers and De Baat 2021).

## 2 Doel en opzet

### 2.1 Microbiologische waterkwaliteit

Voor het bepalen van de microbiologische waterkwaliteit is vooral de aan- of afwezigheid en de concentratie van (opportunistische) pathogene micro-organismen en virussen van belang. In oppervlaktewater worden deze pathogenen direct gemeten, maar in de zuivering, in grondwater en drinkwater worden indirecte metingen via indicatororganismen toegepast. Dit zijn organismen die zelf niet pathogeen zijn, maar waarbij de aanwezigheid impliceert dat er ook mogelijk pathogene micro-organismen aanwezig zijn. Deze indicatororganismen zijn beter te detecteren omdat ze vaak in hogere concentraties voorkomen.

Voor waterkwaliteitsdoeleinden is het naast het belang dat humaanpathogene virussen en bacteriën gedetecteerd kunnen worden, ook van meerwaarde dat de bron van contaminatie opgespoord kan worden. Microbiële bronopsporing (microbial source tracking; MST) kan hiervoor worden gebruikt. Een veelgebruikte MST techniek is bijvoorbeeld het gebruik van 16S rRNA markers voor fecale indicatorsoorten zoals *Bacteroides* en *Helicobacter* om de fecale besmettingsbron op te sporen van vogels, honden, mensen of runderen (Layton, McKay et al. 2006, Jardé, Jeanneau et al. 2018). Deze markers zijn ook al veelvuldig toegepast in bronopsporingsonderzoek van KWR (Hootsmans 2021, Timmers and Schans van der 2022).

Omdat voor de microbiologische waterkwaliteit kweekmethoden worden gebruikt en voor kweekmethoden een monster niet ouder mag zijn dan 24u voor analyse, wordt nog vooral gebruik gemaakt van steekmonsters, die enkel een momentopname geven. Deze 'snapshots' kunnen leiden tot het missen van een contaminatie moment en daardoor onderschatting van het risico van contaminatie. Dit geldt vooral voor pathogene virussen en bacteriën (Ikner, Gerba et al. 2012), maar ook voor indicatororganismen en voor MST die sporadisch aanwezig zijn, ondanks de hogere concentraties dan de pathogene organismen. Omdat DNA/RNA methoden steeds meer ingang vinden, en die methoden minder gevoelig zijn voor afsterving, ontstaan ook goede mogelijkheden voor passieve sampling. Inmiddels is passieve sampling ook al succesvol toegepast in rioolwateronderzoek naar Covid deeltjes (Schang, Crosbie et al. 2021).

Het doel van dit project is om te testen of passieve sampling van micro-organismen en virussen mogelijk een alternatief kan zijn voor het nemen van steekmonsters. De verwachting is dat passieve sampling de pakkans vergroot en dat de detectielimiet verlaagd t.o.v. steekmonsters. Dit verkennend onderzoek bestaat uit laboratorium experimenten waarin voor verschillende materialen de sorptie-kinetiek is getest voor verschillende MST markers zoals humane *Bacteroides* en crAssphage bij verschillende concentraties van rioolwater.



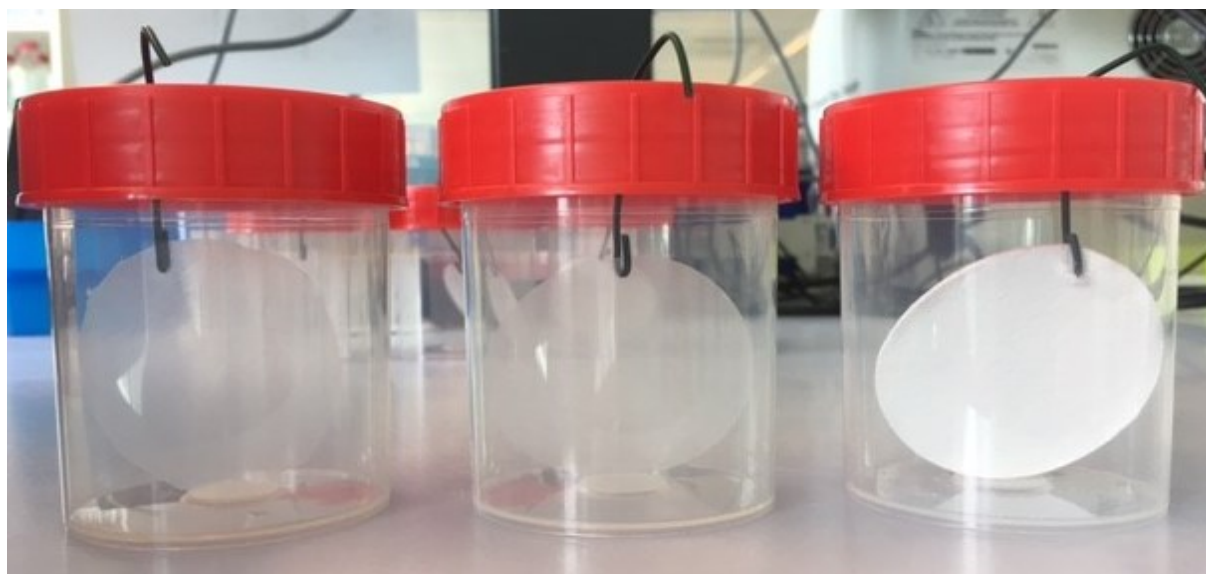
## 3 Materiaal en methoden

Het project is opgedeeld in 3 experimenten. De experimenten zijn chronologisch na elkaar uitgevoerd zodat experimenten aangepast konden worden aan de hand van de tussentijdse resultaten. Dit was gedaan om efficiënt tot enkele kern-inzichten te komen om te toetsen of passieve sampling toegepast kan worden voor de detectie van micro-organismen en virussen.

### 3.1 Monsternamen, DNA extractie en qPCR analyses

### 3.2 Experiment 1

In dit experiment is de stabiliteit van de MST merkers humane *Bacteroides* en van het virus crAssphage bepaald. Daarnaast is van een drietal materialen de opname van de MST merkers bepaald. Uit literatuur bleek dat nylon, LDPE en een electropositief geladen 0.45  $\mu\text{m}$  filter (verkocht onder de naam 'Zetapor') geschikte materialen zijn voor de sorptie van bacteriën en virussen (Vincent-Hubert, Morga et al. 2017, Vincent-Hubert, Wacrenier et al. 2021). Omdat het Zetapor filter niet meer leverbaar was, is gekozen voor een ander electropositief geladen filter dat verkocht wordt onder de naam NanoCeram® (Agonide corporation, FL, US). De nylon en Nanoceram® materialen waren aangeleverd als ronde schijven met een doorsnede van 47mm, het LDPE materiaal was in ronde schijven geknipt met een doorsnede van 47mm. Deze materialen zijn in enkelvoud in plastic potjes gehangen, door gebruik te maken van steriele haakjes (Figuur 2).



*Figuur 2: Foto's van de plastic potjes waar de verschillende materialen ingehangen zijn d.m.v. metalen haakjes. De rioolwaterverduunning zijn later toegevoegd. Van links naar rechts: LDPE, Nylon en NanoCeram®.*

Deze potjes waren in enkelvoud gevuld met 0.01%, 0.1% of 1% rioolwater. Deze verduunningen waren gemaakt door een 24u monster van RWZI Hoogvliet te verdunnen in drinkwater uit de kraan van KWR (v/v) (Tabel 1). Na grondig mengen was 100 ml van deze verduunningen toegevoegd aan de potjes met de verschillende sorptiemiddelen, elk in enkelvoud.

Experimenten zijn uitgevoerd bij 4°C voor 0u, 24u en 48u op een schudincubator. Deze temperatuur was gekozen om de minimum temperatuur van grondwater te vertegenwoordigen. Na incubatie was DNA extractie uitgevoerd



door de schijfjes van de sorptiemiddelen, met behulp van een steriele pincet, direct toe te voegen aan een buisje met lysisbuffer van de Biomerieux Nuclisens kit. Op deze manier werd al het materiaal toegevoegd voor DNA extractie zodat er geen verlies optreedt. Daarnaast was na incubatie ongeveer 100 ml van elke rioolwater verdunning geconcentreerd met een CentriconPlus-70 30kDa Centrifugal Filter (Millipore). Het concentraat was ook direct toegevoegd aan een buisje met lysisbuffer van de Biomerieux Nuclisens kit. Voordat de DNA extractie plaatsvond, werd aan elk monster een bekende hoeveelheid interne controle DNA (IC-DNA) toegevoegd. Door het toevoegen van een bekende hoeveelheid IC-DNA kan aan de hand van de hoeveelheid DNA die men na DNA extractie en analyse terug meet berekenen hoe goed de isolatie van IC-DNA en de qPCR analyses zijn verlopen: het rendement. Het rendement is uitgedrukt als percentage van de bekende hoeveelheid IC-DNA die aan de monsters toegevoegd is. Dit rendement wordt gebruikt om de gevonden hoeveelheden van het target DNA te kunnen corrigeren. Rendementen kunnen negatief beïnvloed worden door de aanwezigheid van stoffen die extractie of de PCR reactie verstoren, dat noemen we remming van de PCR analyse. De DNA extractie is uitgevoerd met Biomerieux Nuclisens® reagentia met behulp van een KingFisher™ mL Purification System zoals ook in het door KWR uitgevoerde rioolwater onderzoek naar SARS-CoV-2 (Medema, Heijnen et al. 2020).

Het elutie volume van de DNA extractie was 100 µl. Voor elke PCR was, in duplo, 10 µl van het DNA extract geanalyseerd met het CFX96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad). Bij de interne controle PCR (NEN 6254+C1) bestond elke 50 µl PCR reactie uit 25 µl iQ™ Supermix (Bio-Rad), 5 µl 4 mg/ml BSA (Roche, art. nr. 10711454001), 0,2 µM eindconcentratie primers en probe, 7 µl UltraPure water (Invitrogen) en 10 µl DNA extract. Het thermische cyclus profiel van deze PCR was 5 minuten bij 95 °C gevolgd door 43 cycli van 20 seconden bij 95 °C en 48 seconden bij 60 °C. Een humane *Bacteroides* specifieke PCR, HF183 (Seurinck, Defoirdt et al. 2005) was gebruikt voor de kwantificatie van deze bacteriesoort. Elke 50 µl PCR reactie bestond uit 25 µl iQ™ Supermix (Bio-Rad), 5 µl 4 mg/ml BSA (Roche, art. nr. 10711454001), 0,2 µM eindconcentratie primers en probe, 7 µl UltraPure water (Invitrogen) en 10 µl DNA extract. Het thermische cyclus profiel van deze PCR was 5 minuten bij 95 °C gevolgd door 39 cycli van 15 seconden bij 95 °C en 1 minuut bij 60 °C. Een crAssphage specifieke PCR, CPQ\_O64 (Stachler, Kelty et al. 2017) was gebruikt voor de kwantificatie van dit DNA-virus. Elke 50 µl PCR reactie bestond uit 25 µl iQ™ Supermix (Bio-Rad), 5 µl 4 mg/ml BSA (Roche, art. nr. 10711454001), 0,8 µM eindconcentratie primers, 0,2 µM eindconcentratie probe, 1 µl UltraPure water (Invitrogen) en 10 µl DNA extract. Het thermische cyclus profiel van deze PCR was 5 minuten bij 95 °C gevolgd door 40 cycli van 15 seconden bij 95 °C en 1 minuut bij 60 °C.

Tabel 1: Experimentele opzet van experiment 1

	Drinkwater (ml)	Rioolwater (ml)
Fles 1 - 1% rioolwater	1485	15
Fles 2 - 0,1% rioolwater	1498.5	1.5
Fles 3 - 0,01% rioolwater	1499.85	0.15

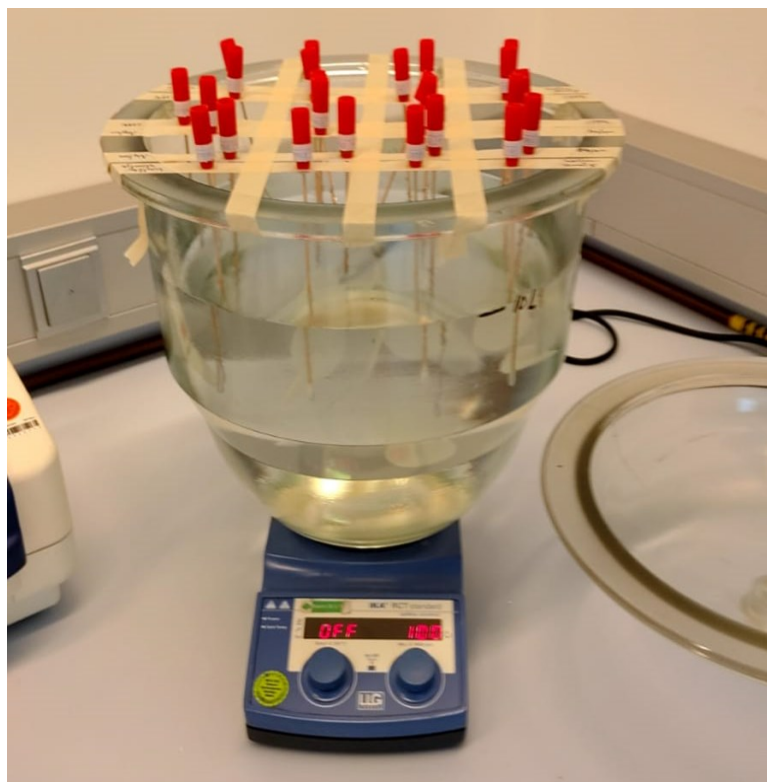
### 3.3 Experiment 2

In dit experiment was de opname kinetiek van de verschillende sorptiemiddelen bepaald om vast te stellen hoe lang de incubatietijd van de passieve samplers ongeveer mag zijn. Het sorptiemiddel NanoCeram® was vervangen door katoen (wattenstaafjes), zie de resultaten bij experiment 2 voor meer info over de redenatie voor deze keuze.

Alle materialen (LDPE, Nylon, katoen) zijn in duplo in 1% rioolwater geïncubeerd voor 1u, 48u, 72u en 2 weken. Alle materialen zijn geïncubeerd in een grote glazen container met 10 liter 1% rioolwater, roerend (100 rpm) bij 20 °C

(Figuur 3). De materialen zijn geplaatst door middel van steriele houten prikkers en zijn willekeurig in de vloeistof geplaatst. De temperatuur van 20°C was gekozen om de maximale temperatuur van oppervlaktewater te vertegenwoordigen.

De concentratie van humane *Bacteroides* en crAssphage was gemeten in het water op 0u (t=0) en na 2 weken. Hiervoor was in duplo 50 ml water geconcentreerd met een CentriconPlus-70 30kDa Centrifugal Filter (Millipore). Het concentraat was opgewerkt voor DNA extractie. De sorptiemiddelen zijn uit het medium verwijderd in duplo op 1u, 48u, 72u en 2 weken en opgewerkt voor DNA extractie. Voordat de sorptiemiddelen in de DNA extractie buisjes met lysis buffer geplaatst werden, zijn ze tweemaal achter elkaar ondergedompeld in Milli-Q water om de niet-gebonden deeltjes te verwijderen. DNA extracties en qPCR analyses zijn uitgevoerd zoals beschreven in 3.2. Na het uitvoeren van de qPCRs was het percentage sorptie berekend als  $([M]/[V] \cdot V_{\text{water}}) \cdot 100$ . [M] = concentratie crAssphage of bacteroides op membraan. [V] = concentratie crAssphage of bacteroides in vloeistof op t=0 \* volume water.



Figuur 3: Foto van de experimentele opzet waar de verschillende materialen ingehangen zijn d.m.v. houten prikkers met metalen haakjes.

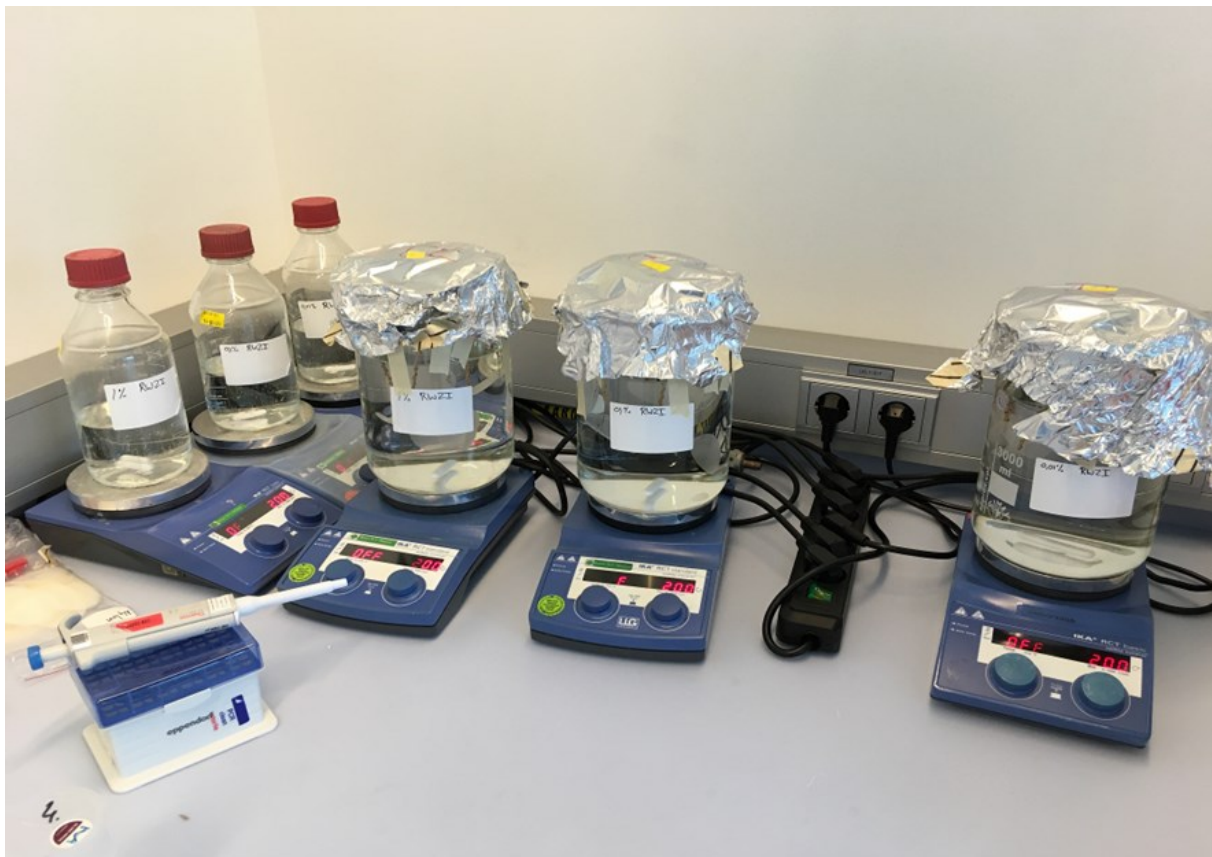
### 3.4 Experiment 3

In dit experiment was alleen nylon als materiaal gebruikt om de opname-kinetiek beter te bepalen bij verschillende concentraties rioolwater en verschillende incubatietijden. Nylon was als materiaal gekozen aan de hand van de resultaten van experiment 2. Ook was de tijdsreeks aangepast aan de hand van de resultaten van experiment 2. Daarom was het nylon materiaal geïncubeerd onder verschillende rioolwater concentraties (1%, 0.1% en 0.01%) en verschillende incubatietijd (0u, 8u, 24u, en 48u). Daarnaast was er een negatieve controle gebruikt met dezelfde rioolwater concentraties en dezelfde incubatietijd, maar zonder toevoeging van nylon materiaal aan het water. Dit om de degradatie van de MST te onderscheiden van afname door sorptie. Alle nylon sorptiemiddelen zijn weer in

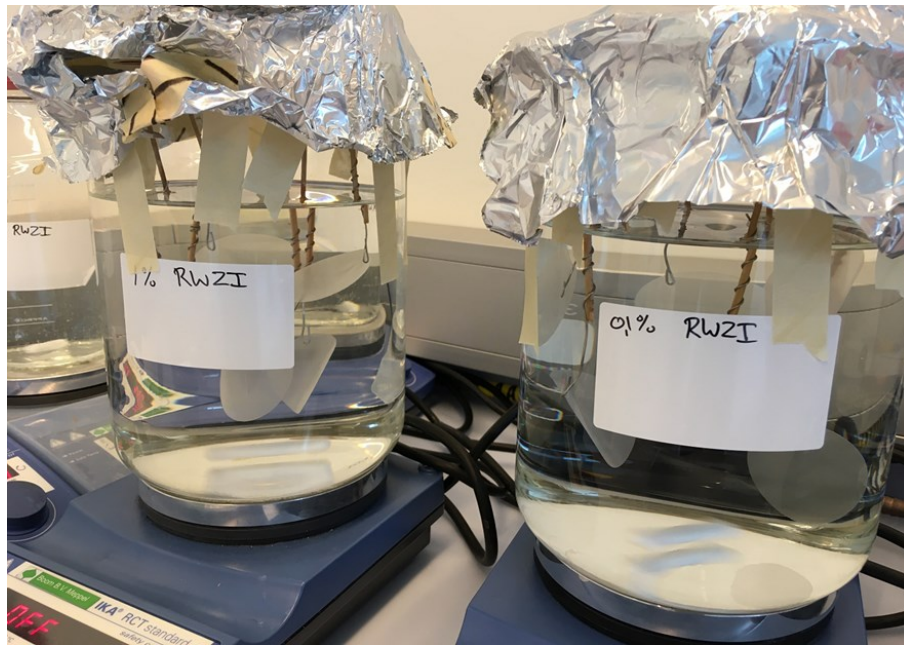
duplo in 1 glazen bak geplaatst, roerend (200 rpm) bij 20 °C (Figuur 4). Daarnaast was dezelfde methode gebruikt als in experiment 2 voor de ophang van de sorptiemiddelen (Figuur 5).

De concentratie humane *Bacteroides* en crAssphage was in duplo gemeten in het water van de negatieve controles op 0u, 8u, 24u en 48u incubatie. Hiervoor was in duplo 50 ml water geconcentreerd met een CentriconPlus-70 30kDa Centrifugal Filter (Millipore). Het concentraat was opgewerkt voor DNA extractie. Voor het bepalen van de sorptie aan nylon zijn de sorptiemiddelen in duplo uit het medium verwijderd op 0u, 8u, 24u en 48u en opgewerkt voor DNA extractie. Voordat de sorptiemiddelen in de DNA extractie buisjes met lysis buffer geplaatst werden, zijn ze tweemaal achter elkaar ondergedompeld in Milli-Q water om de niet-gebonden deeltjes te verwijderen. DNA extracties en qPCR analyses zijn uitgevoerd zoals beschreven in 3.2. Na het uitvoeren van de qPCRs is het percentage sorptie berekend als:

- % sorptie = totaal in Nylon op  $t_x - t_0$  / totaal in water op  $t_{x-1}$ .  $t$  = tijd (uren) van blootstelling van het sorptiemiddel in het medium.
- %sorptie per tijdstip = totaal in Nylon op  $t_x - t_{x-1}$  / totaal in water op  $t_{x-1}$  (om te bepalen op welk tijdstip de sorptie het hoogst was)



*Figuur 4: Foto van de experimentele opzet van experiment 3 waar de verschillende materialen ingehangen zijn d.m.v. houten prikkers met metalen haakjes. Links staan de flessen van de negatieve controles: 1%, 0.1% en 0.01% rioolwater (geen materiaal toegevoegd). Rechts staan de flessen van de positieve controles: 1%, 0.1% en 0.01% rioolwater (v/v) met nylon materiaal.*

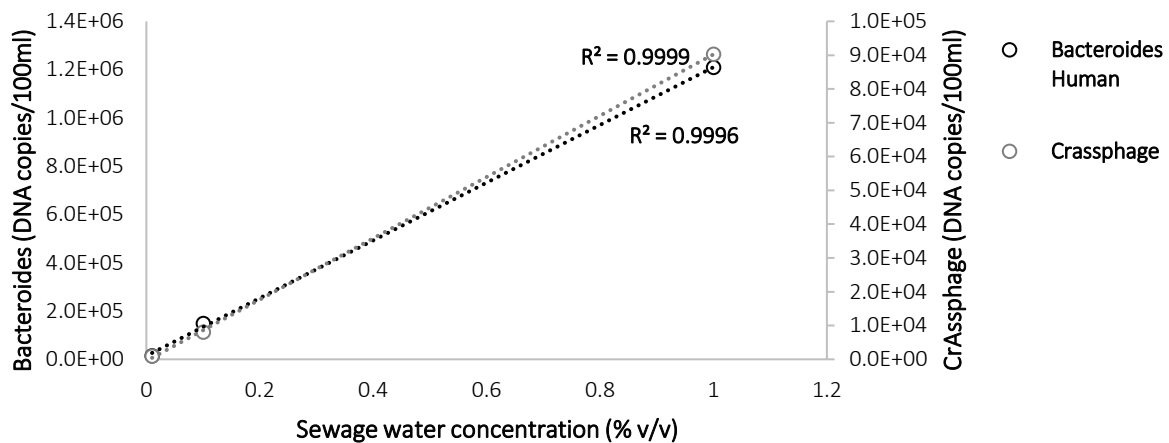


Figuur 5: Detailfoto van de experimentele opzet van experiment 3 waar de verschillende materialen ingehangen zijn d.m.v. houten prikkers met metalen haakjes.

## 4 Resultaten

### 4.1 Experiment 1

In eerste instantie was gekeken of de hoeveelheid humane *Bacteroides* en CrAssphage uit de qPCR assays overeenkwam met de hoeveelheid rioolwater die was toegevoegd. Het percentage rioolwater had een lineair verband met het aantal DNA kopieën/ml voor beide qPCR assays (Figuur 6). Dit geeft aan dat het gebruik van rioolwater een goede basis is om de opnamekinetiek van de verschillende sorptiemiddelen te testen met qPCR assays. Daarnaast was met deze kalibratie het % rioolwater omgerekend naar DNA kopieën/100ml CrAssphage en humane *Bacteroides*, zodat de data te vergelijken is met mogelijke andere studies (Tabel 2).



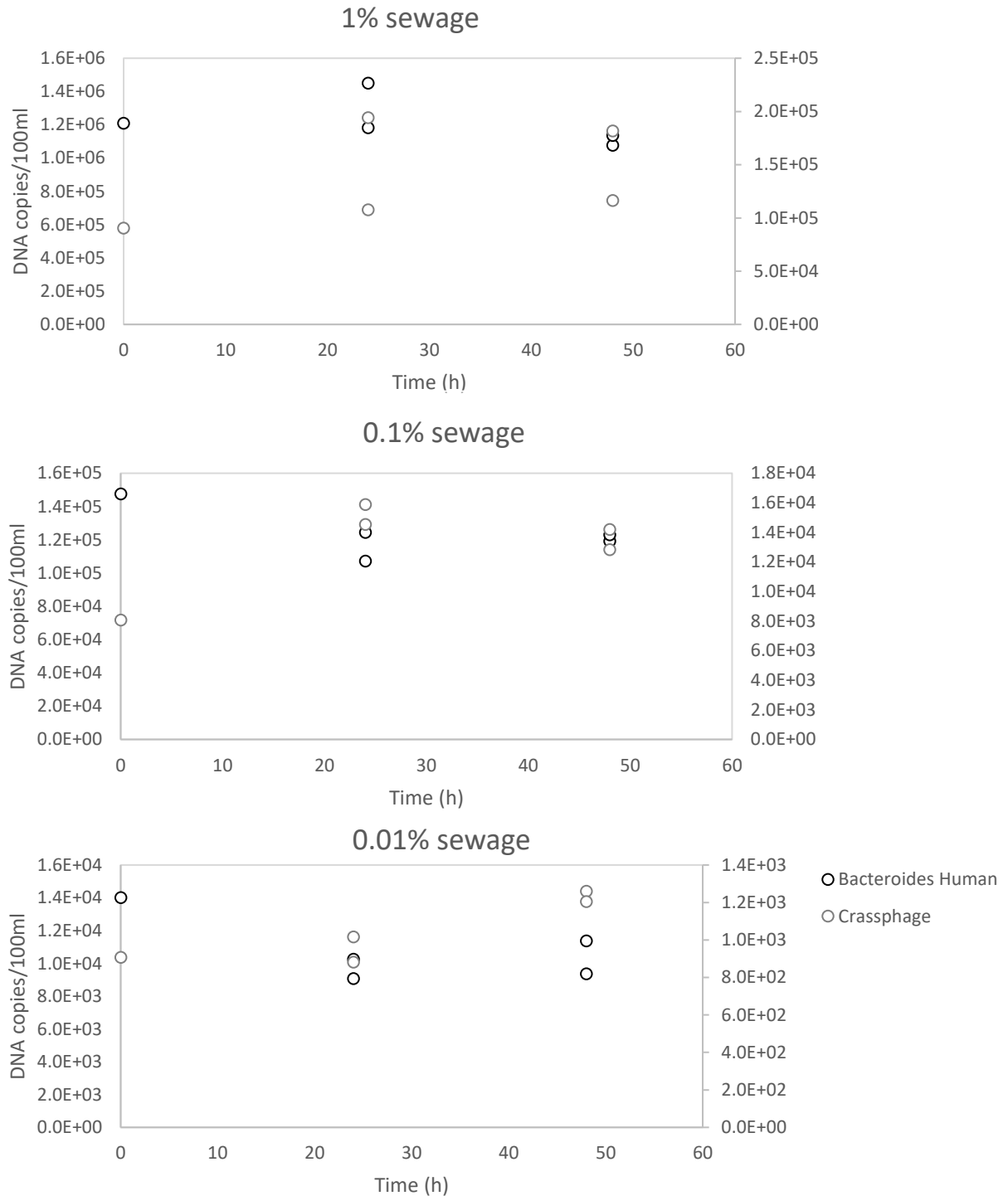
Figuur 6: Het aantal DNA kopieën/100 ml in de rioolwaterverduningen van 0.01, 0.1 en 1% (v/v).

Tabel 2: Experimentele opzet van experiment 2

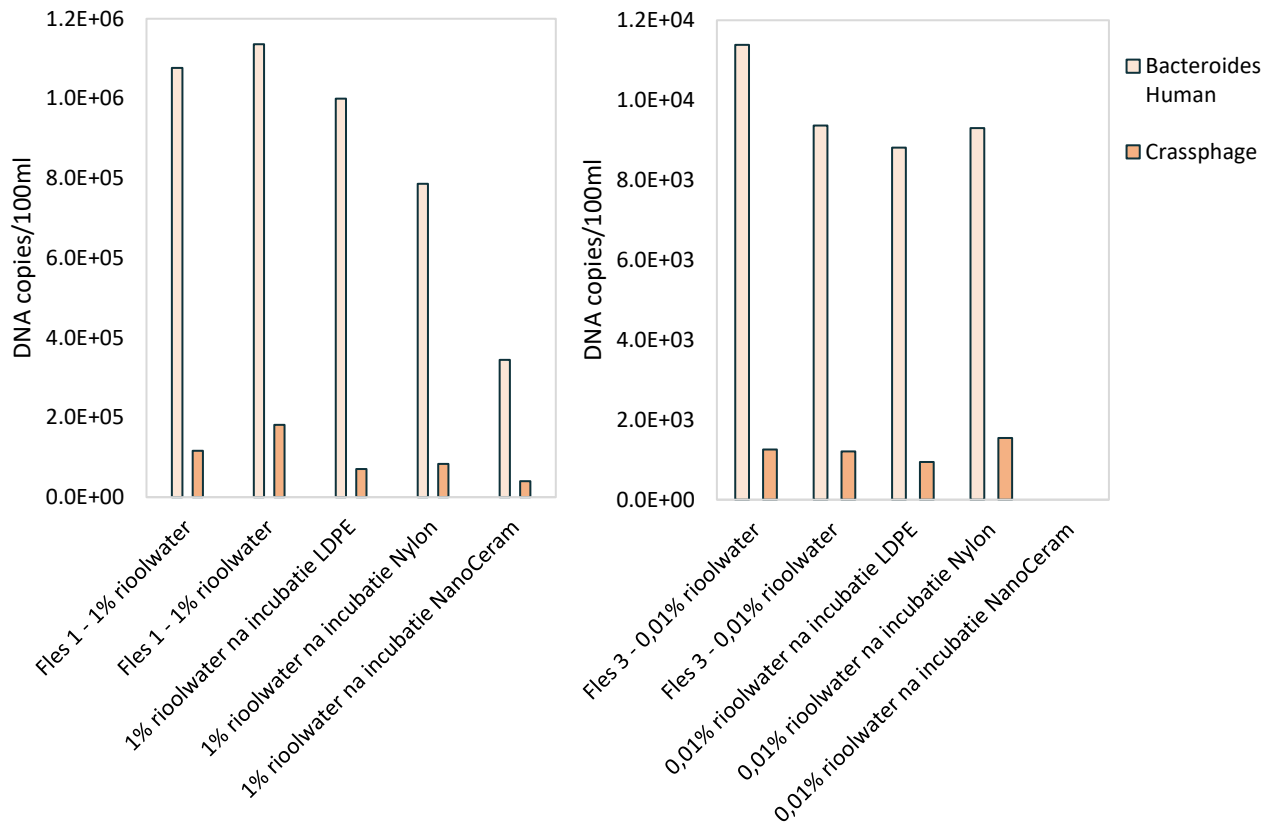
Verduunning (v/v)	Human Bacteroides (DNA copies/100ml)	CrAssphage (DNA copies/100ml)
1% rioolwater	1.21E+06	9.03E+04
0,1% rioolwater	1.47E+05	8.06E+03
0,01% rioolwater	1.40E+04	9.08E+02

Ten tweede was de stabiliteit van humane *Bacteroides* en crAssphage in water bij 4 °C bepaald gedurende 48u incubatie. Resultaten tonen dat beide humane *Bacteroides* en crAssphage zeer stabiel waren voor deze periode en

bij deze temperatuur. Er leek vrijwel geen sterfte en/of degradatie plaats te vinden. Wel bleek dat de duplo monsters enige variatie vertonen voor beide MST markers (Figuur 7).



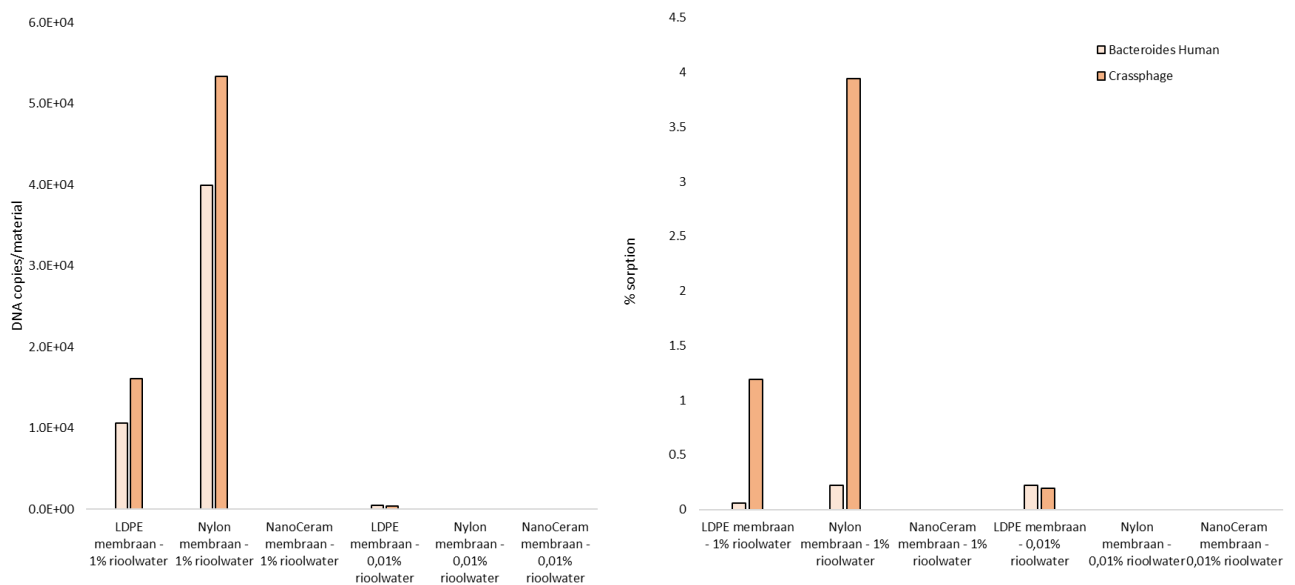
Figuur 7: DNA kopieën/100 ml van humane Bacteroides (zwart) en CrAssphage (grijs) in de tijd (uren) in 1%, 0.1% en 0.01% rioolwaterverduunningen (v/v) bij 4°C. Metingen op dezelfde tijdstippen zijn duplo genomen monsters uit dezelfde verduunning.



Figuur 8: DNA kopieën/100 ml van humane *Bacteroides* en CrAssphage in de flessen met 1% rioolwater (links) en 0.01% rioolwater (rechts) voor en na 48u incubatie met de sorptiemiddelen bij 4°C.

In het experiment met de sorptiemiddelen waren ook watermonsters genomen voor en na incubatie met de sorptiemiddelen. Hier waren ook de humane *Bacteroides* en crAssphage bepaald (Figuur 8). Het aantal DNA kopieën/100 ml was redelijk gelijk tussen de duplo flessen voordat ze geïncubeerd waren met sorptiemiddelen. Na incubatie waren er grote verschillen te zien waarbij elke fles een afname liet zien. Aangezien de merkers stabiel waren gedurende 48u bij 4°C, was de verwachting dat deze afname komt door sorptie aan de sorptiemiddelen. Deze leek het grootst te zijn bij de NanoCeram filters.





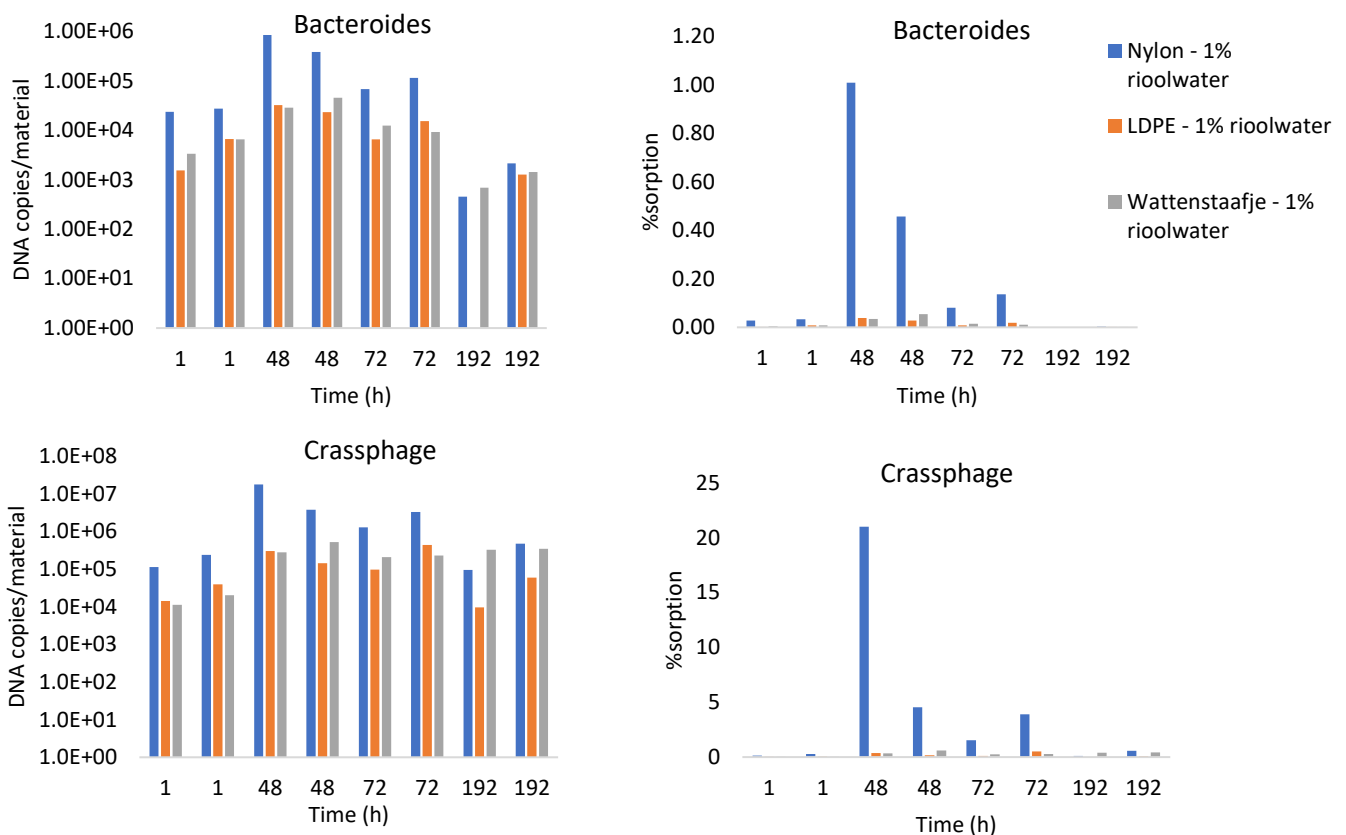
Figuur 9: DNA kopieën/materiaal (links) en %sorption (rechts) van humane *Bacteroides* en *CrAssphage* in de sorptiemiddelen die 48h bij 4 °C geïncubeerd zijn in 1% rioolwater en 0.01% rioolwater (v/v).

Resultaten van de verschillende materialen toonden dat na 48u incubatie bij 4 °C, het LDPE en Nylon materiaal de meeste humane *Bacteroides* en *crAssphage* heeft gesorbeerd bij 1% rioolwater, en LDPE het enige materiaal was waar de MST waren teruggevonden bij 0.01% rioolwater. Daarnaast was er geen enkel MST teruggevonden in het NanoCeram materiaal (Figuur 9). Dit komt niet overeen met de afname van MST in de watermonsters. Een mogelijke verklaring is dat de plastic bakjes ook MST hebben gesorbeerd, waardoor het niet meer aan de sorptiemiddelen kan hechten. In de volgende experimenten worden daarom glazen containers gebruikt. Voor het NanoCeram materiaal leek er inhibitie op te treden in de qPCRs, omdat de efficiëntie van de interne controle erg laag was (resultaten niet getoond). Dit zou een extra verklaring kunnen zijn waarom er geen MST werden gevonden in het NanoCeram materiaal. Er was ook een poeder-achtige substantie gevonden dat van het filter los leek te komen. De fabrikant wees erop dat deze filters eerst gewassen moeten worden. In experiment 2 is daarom eerst een test gedaan met gewassen filters, om te bevestigen of er inderdaad remming heeft opgetreden.

## 4.2 Experiment 2

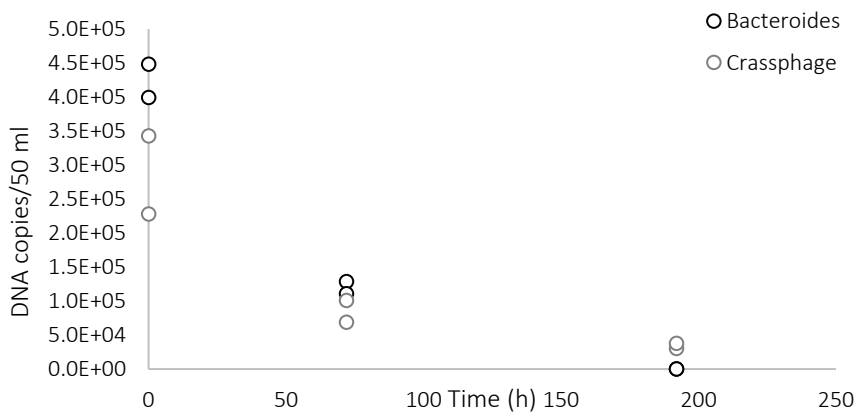
Omdat het leek dat een poeder-achtige substantie in de NanoCeram membranen remmend werkt op de DNA extractie, was eerst een korte test gedaan om dit te mitigeren. De NanoCeram filters waren alvorens deze te gebruiken grondig gewassen met Milli-Q water. Na het wassen bleek er nog steeds remming op te treden van interne controle bij de qPCR assays waardoor er geen *CrAssphage* was gedetecteerd (resultaten niet getoond). Er was ook nog steeds een poeder-achtige residu overgebleven na het centrifugeren. Er was daarom besloten om deze NanoCeram filters niet meer te gebruiken, en deze te vervangen met wattenstaafjes. Deze worden namelijk ook gebruikt als passieve sampling sorptiemiddel voor COVID-19 detectie in rioolwateronderzoek (Schang, Crosbie et al. 2021).

In experiment 2 was de opname-kinetiek van LDPE, nylon en katoen (wattenstaafjes) bepaald. In figuur 10 zijn het aantal kopieën/materiaal en het % sorptie voor *crAssphage* en humane *Bacteroides* gegeven in de tijd. Deze resultaten geven goed weer dat sorptie voornamelijk plaats heeft gevonden binnen 48 uur en dat nylon het meeste humane *Bacteroides* (0.5-1%) en *crAssphage* (7-31%) heeft opgenomen. De andere materialen vertoonden ook de meeste sorptie binnen 48 uur, maar deze was vele malen lager dan voor nylon. Daarnaast was er een groot verschil in % sorptie tussen *crAssphage* en humane *Bacteroides* voor alle materialen.



Figuur 10: DNA kopieën/materiaal van humane *Bacteroides* en *CrAssphage* in de sorptiemiddelen na bepaalde incubatietijd (1, 48, 72 en 192u) bij 20°C, geïncubeerd in 1% rioolwater. Metingen op hetzelfde tijdstip zijn duplo genomen monsters.

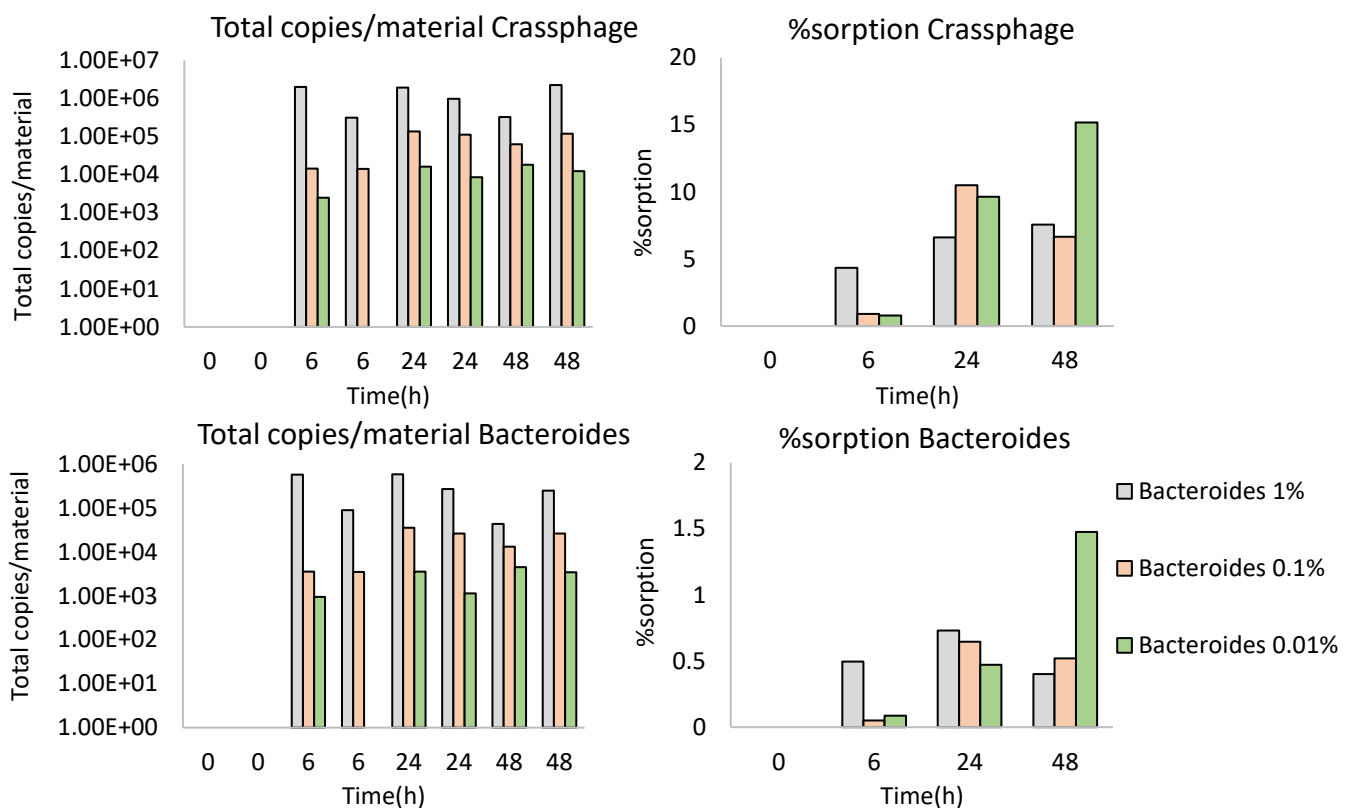
Ook waren er watermonsters genomen van de glazen container waar de sorptiemiddelen in geplaatst zijn. Deze waren ook geanalyseerd op de MST (Figuur 11) en toonden dat beide afnemen in de tijd bij 20°C. De afname van humane *Bacteroides* in het water na 72u was gemiddeld  $6.08 \times 10^5$  en de afname van *CrAssphage* na 72u was gemiddeld  $4 \times 10^5$  bij 1% rioolwater. Dit correspondeert met een afname van ongeveer 70% voor beide MST. In dit experiment was geen negatieve controle meegenomen, waardoor afname door sorptie niet onderscheiden kon worden van degradatie.



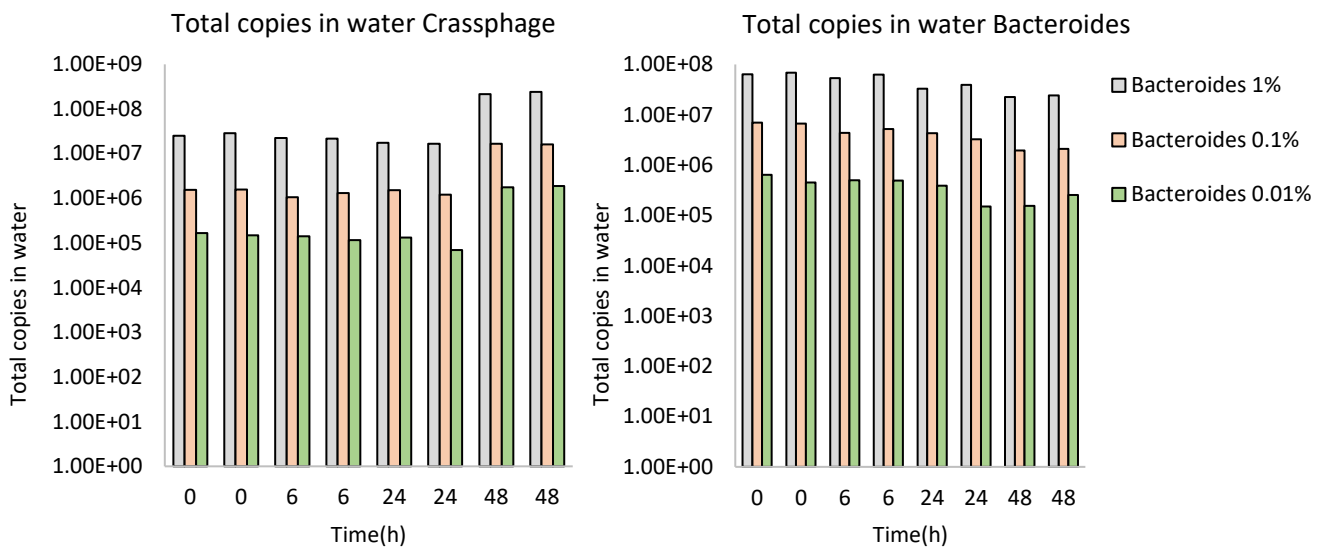
Figuur 11: DNA kopieën/100 ml van humane *Bacteroides* en *CrAssphage* in het water van het 10 litervat met 1% rioolwater en sorptiemiddelen na bepaalde incubatietijd (1, 48, 72 en 192u) bij 20°C. Metingen op hetzelfde tijdstip zijn duplo genomen watermonsters.

### 4.3 Experiment 3

Uit experiment 2 was gebleken dat nylon het meest sorptie vertoonde voor de MST. Ook is uit experiment 2 gebleken dat de meeste sorptie binnen 48 uur plaatsvindt. In experiment 3 is daarom de opname kinetiek in meer detail bepaald voor nylon, waarbij nylon is geplaatst in verschillende rioolwaterverduunningen bij een aangepaste incubatietijd. Het totaal aantal kopieën en de sorptie voor beide MST was weer bepaald en weergegeven in Figuur 12. Het aantal kopieën per materiaal was het hoogst voor 1% rioolwater en het laagst voor 0.01%. Daarnaast heerste er een grote fluctuatie tussen de duplo genomen materialen. De sorptiesnelheid van de materialen varieerde ook tussen de concentraties rioolwater. Bij 1% rioolwater heeft de meeste sorptie plaatsgevonden binnen 6 uur voor beide MST. Voor 0.1% rioolwater heeft de meeste sorptie plaatsgevonden binnen 24 uur voor beide MST. Voor 0.01% rioolwater heeft voor crAssphage de meeste sorptie plaatsgevonden binnen 24 uur, maar voor humane *Bacteroides* pas na 48 uur. In enkele gevallen bleef sorptie toenemen tot 48 uur, maar voor andere nam deze af na 24 uur, wat kan duiden op desorptie of degradatie. Het % sorptie na 48u was gemiddeld 0.4% voor humane *Bacteroides* en 7.6% voor crAssphage. Daarnaast was van alle rioolwaterverduunningen het % sorptie binnen 48 uur maximaal 1.5% sorptie van humane *Bacteroides* en maximaal 15% van CrAssphage. Dit komt sterk overeen met de bevindingen in experiment 2 en geeft aan dat het verschil in sorptie tussen humane *Bacteroides* en CrAssphage reproduceerbaar is.



Figuur 12: Totaal aantal DNA kopieën/materiaal (links) en het percentage sorptie (rechts) van CrAssphage (boven) en humane *Bacteroides* (onder) in de sorptiemiddelen na bepaalde incubatietijd (0, 6, 24, 48u) bij 20°C, geïncubeerd in 1%, 0.1% en 0.01% rioolwater (v/v). Metingen op hetzelfde tijdstip zijn duplo genomen watermonsters.



Figuur 13: Totaal aantal DNA kopieën in het water van de negatieve controles zonder sorptiemiddelen bij 20°C. Metingen zijn duplo genomen monster voor CrAssphage (links) en humane *Bacteroides* (rechts) in 1%, 0.1% en 0.01% rioolwater (v/v) na bepaalde incubatietijd (0, 6, 24, 48u).

De MST zijn ook gemeten in het water gedurende deze experimenten in de negatieve controle. Aan dit water waren geen sorptiemiddelen toegevoegd. De verandering van MST in dit water zal dus voornamelijk niet door sorptie komen. Te zien is dat er een afname optrad van beide MST gedurende incubatietijd, wat duidt op degradatie (Figuur 13). Dit gold voor alle rioolwaterconcentraties. De afname van humane *Bacteroides* in het water na 48u was gemiddeld  $3.41 \times 10^5$  (59.7%) bij 0.01% rioolwater,  $4.8 \times 10^6$  (70.3%) bij 0.1% rioolwater en  $4.3 \times 10^7$  (64.6%) bij 1% rioolwater. De afname van crAssphage na 24h was gemiddeld  $5.75 \times 10^4$  (37.4%) bij 0.01% rioolwater,  $2 \times 10^5$  (12.7%) bij 0.1% rioolwater en  $9.8 \times 10^6$  (36%) bij 1% rioolwater. De afname in het water na 72u incubatie waar wel sorptiemiddelen aan waren toegevoegd was 70% voor beide MST en dus soortgelijk voor humane *Bacteroides* in water met en zonder sorptiemiddelen (Figuur 11). Het lijkt dat afname dus vooral komt door degradatie en dat sorptie een kleiner effect heeft op de totale bacterieaantallen in het water. Dit komt ook overeen met de relatief lage sorptie percentages. Voor crAssphage is er vanaf 24 uur een sterke toename te zien in het water, wat mogelijk het gevolg is van infecteren van bacteriën in het rioolwater, met proliferatie van crAssphage als gevolg.

## 5 Discussie

### 5.1 Sorptiemiddelen

Uit de uitgevoerde experimenten bleek dat de sorptiecapaciteit erg verschilt tussen de sorptiemiddelen, maar ook tussen de duplo metingen binnen de sorptiemiddelen. Uit experiment 1 bleek dat nylon het beste materiaal was voor sorptie bij lage temperaturen en hoge rioolwater concentratie, terwijl LDPE juist als enige een opbrengst had bij lagere rioolwaterconcentratie en lage temperatuur. Uit de opvolgende experimenten bleek dat nylon het beste presteert bij hogere temperaturen en hoge rioolwaterconcentraties. Een extra experiment bij lage rioolwaterconcentraties en lage temperatuur zou nodig moeten zijn om het eerste experiment te bevestigen of te ontkrachten, maar door de grote verschillen in sorptie tussen nylon en LDPE in experiment 2, lijkt het aannemelijk dat nylon ook beter presteert bij andere omstandigheden.

De grote verschillen tussen de duplo materialen zullen ook meegenomen moeten worden in vervolgprouwen in de praktijk, waar het in ieder geval in de testfase van de methode van belang is om de materialen minstens in triplo te gebruiken. Een mogelijke verklaring voor de grote verschillen tussen de duplo materialen is dat de materialen samen in een relatief klein volume dicht bij elkaar hingen tijdens de experimenten, waarbij het water circuleerde en niet doorstroomde.

### 5.2 Temperatuur

De temperatuur lijkt naast bovengenoemde factoren ook een groot effect te hebben op de sorptiecapaciteit en snelheid. Daarnaast heeft de temperatuur ook een groot effect op de degradatie van humane *Bacteroides* en crAssphage. De degradatie van bacteriën kan naast temperatuur ook mede veroorzaakt zijn door activiteit van virussen, wat in een batch systeem zoals in dit experiment een groot effect kan hebben. CrAssphage is namelijk een bacteriofaag van *Bacteroides* (Shkoporov, Khokhlova et al. 2018). Dit betekent dat de degradatie van de bacteriën in deze experiment o.a. kan komen door de activiteit van virussen. Het is de vraag hoeveel van de degradatie wordt veroorzaakt door infectie met crAssphage, omdat deze een actief metabolisme van de gastheer nodig heeft, wat minder waarschijnlijk is voor anaerobe darmbacteriën zoals *Bacteroides* onder deze experimentele condities. We verwachten ook minder degradatie van bacteriën in natuurlijke systemen waar minder hoge concentraties virussen aanwezig zijn dan in verdund rioolwater en waar doorstroom van het water optreedt.

De temperatuur heeft in deze experimenten een dubbele werking; door degradatie neemt de concentratie in het water af, waardoor de sorptiemiddelen minder deeltjes kunnen opnemen, maar sorptie neemt wel toe bij hogere temperatuur. In de praktijk zal dit anders zijn. De degradatie van de MST zal in de praktijk, waar voornamelijk gemeten zal worden in systemen met meer doorstroom, minder van belang zijn voor de methode. Wel is deze van belang voor de interpretatie van de metingen. Bij lage temperatuur zoals grondwater betekent detectie van een MST dat er binnen een grotere tijdsperiode een mogelijk besmettingsmoment heeft plaatsgevonden; de besmetting kan mogelijk minder actueel zijn. Bij hogere temperatuur zoals oppervlaktewater betekent detectie van een MST dat er binnen een veel kleinere tijdsperiode een mogelijk besmettingsmoment heeft plaatsgevonden en dat de besmetting dus actueler is.

### 5.3 Incubatietijd

De opname-kinetiek van de sorptiemiddelen lijkt afhankelijk van de concentratie rioolwater en de temperatuur. In experiment 2 is vastgesteld dat voor alle materialen de meeste sorptie plaatsvindt binnen 48 uur en dat de sorptiesnelheid daarna afneemt. Ook treedt er afname op van het totaal aantal genkopieën per materiaal en in het water, wat duidt op desorptie van het materiaal en/of degradatie van de MST in de sorptiemiddelen en het water. In de praktijk bij hoge doorstroom zal dit gedrag anders zijn, waarbij mogelijk de sorptie langer aanhoudt. Daarnaast zijn de concentraties in de praktijk ook lager, waardoor de sorptiemiddelen pas later verzadigen en dus opname ook langer zal toenemen dan 48 uur. In experiment 3 is binnen deze 48 uur de opname-kinetiek nauwkeuriger bepaald bij verschillende rioolwater concentraties. Hier is het inderdaad duidelijk te zien dat de opname-kinetiek afhankelijk is van de concentratie MST, maar ook van het type MST. CrAssphage vertoont in twee onafhankelijke experimenten een hoger % sorptie dan humane *Bacteroides*. Voor humane *Bacteroides* en crAssphage geldt dat de meeste sorptie vooral plaatsvindt in de eerste 6 uur bij 1% rioolwater en in de eerste 24 uur bij 0.1% rioolwater. Voor 0.01% rioolwater zijn er verschillen te zien; crAssphage vertoont de meeste sorptie binnen 24 uur, maar humane *Bacteroides* pas binnen 48 uur. Dit is opvallend, vooral gezien de concentratie in het water voor humane *Bacteroides* juist afneemt binnen 48 uur, terwijl crAssphage afneemt binnen 24 uur en dan abrupt toeneemt in het water bij 48 uur. Dit kan komen door de al genoemde proliferatie van crAssphage of door desorptie, wat in een vervolg getoetst kan worden.

Degradatie van MST in het water is een factor die meer toeneemt met de tijd en ook sterk afhankelijk is van de temperatuur. Degradatie lijkt een groter effect te hebben op de concentraties in het water dan de afname door sorptie aan de materialen. In een vervolg zal gewerkt moeten worden met systemen waar doorstroom heerst, zoals ook in de praktijk het geval zal zijn indien onderzoek wordt gedaan naar oppervlaktewater en grondwater. Hier speelt een afname in concentratie door sorptie namelijk minder een rol, maar heerst een meer constante concentratie van MST in het water.

## 6 Conclusies en aanbevelingen

### 6.1 Conclusies

Passive sampling lijkt een veelbelovende techniek te zijn voor het detecteren van zowel bacteriële als virale MST zoals humane *Bacteroides* en crAssphage. Nylon vertoont de hoogste sorptie van bacteriën en virussen bij 1% rioolwater, zowel bij 4 graden (grondwater) als 20 graden (oppervlaktewater). Bij lage temperatuur is de sorptiesnelheid langzamer dan bij hogere temperatuur, maar er treedt ook minder degradatie op van de MST bij lagere temperatuur. Degradatie van bacteriën is mogelijk mede een gevolg van de hoge concentraties crAssphage die toegevoegd waren. Resultaten geven hiermee aan dat het mogelijk is om passive sampling bij lage temperatuur, zoals grondwater, voor langere tijd uit te voeren dan bij hogere temperatuur zoals oppervlaktewater. Het is nog onduidelijk welke voor- en nadelen passive sampling heeft t.o.v. de huidige steekmonster-methode. Dit is mede afhankelijk van de snelheid van verzadiging van de passive samplers in het veld.

### 6.2 Aanbevelingen

In vervollexperimenten moeten de volgende zaken nog onderzocht worden, alvorens passive sampling kan worden toegepast in de praktijk:

1. Het testen van de opname kinetiek van bacteriën en virussen kan beter apart gedaan worden i.v.m. mogelijke infectie van bacteriën door de aanwezige virussen
2. Het gedrag van passive samplers in systemen die meer lijken op de praktijk waar een doorstroom van water heerst, en de afname in het water geen of een kleinere rol speelt.
3. Materialen zullen zowel bij lage temperatuur (grondwater) als bij hogere temperatuur (oppervlaktewater) en verschillende rioolwater concentraties getest moeten worden op opname-kinetiek om per MST en materiaal te bepalen hoe lang de incubatietijd moet zijn. Voor elk organisme-matrix (water) combi is het aan te raden een eigen opname-kinetiek vast te stellen.
4. Het potentieel voordeel van passive sampling t.o.v. steekmonsters vaststellen met praktijkproeven.



## 7 Referenties

Clokey, J. E., D. W. Hawker, R. Verhagen, S. Ghorbani Gorji, E. R. Knight, K. V. Thomas and S. L. Kaserzon (2023). "Calibration of a microporous polyethylene tube passive sampler for polar organic compounds in wastewater effluent." *Sci Total Environ* **874**: 162497.

Hootsmans, M. J. M. (2021). "DNA bronopsporing op zwemwaterlocatie Binnenschelde in 2021." *KWR* 2021.105.

Ikner, L. A., C. P. Gerba and K. R. Bright (2012). "Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review." *Food Environ Virol* **4**(2): 41-67.

Jardé, E., L. Jeanneau, L. Harrault, E. Quenot, O. Solecki, P. Petitjean, S. Lozach, J. Chevé and M. Gourmelon (2018). "Application of a microbial source tracking based on bacterial and chemical markers in headwater and coastal catchments." *Sci Total Environ* **610-611**: 55-63.

Layton, A., L. McKay, D. Williams, V. Garrett, R. Gentry and G. Sayler (2006). "Development of Bacteroides 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water." *Appl Environ Microbiol* **72**(6): 4214-4224.

Medema, G., L. Heijnen, G. Elsinga, R. Italiaander and A. Brouwer (2020). "Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands." *Environmental Science & Technology Letters* **7**(7): 511-516.

Morin, N., C. Miège, M. Coquery and J. Randon (2012). "Chemical calibration, performance, validation and applications of the polar organic chemical integrative sampler (POCIS) in aquatic environments." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **36**: 144-175.

Poulier, G., S. Lissalde, A. Charriau, R. Buzier, F. Delmas, K. Gery, A. Moreira, G. Guibaud and N. Mazzella (2014). "Can POCIS be used in Water Framework Directive (2000/60/EC) monitoring networks? A study focusing on pesticides in a French agricultural watershed." *Science of The Total Environment* **497-498**: 282-292.

Schang, C., N. D. Crosbie, M. Nolan, R. Poon, M. Wang, A. Jex, N. John, L. Baker, P. Scales, J. Schmidt, B. R. Thorley, K. Hill, A. Zamyadi, C.-W. Tseng, R. Henry, P. Kolotelo, J. Langeveld, R. Schilperoort, B. Shi, S. Einsiedel, M. Thomas, J. Black, S. Wilson and D. T. McCarthy (2021). "Passive Sampling of SARS-CoV-2 for Wastewater Surveillance." *Environmental Science & Technology* **55**(15): 10432-10441.

Seurinck, S., T. Defoirdt, W. Verstraete and S. D. Siciliano (2005). "Detection and quantification of the human-specific HF183 Bacteroides 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater." *Environ Microbiol* **7**(2): 249-259.

Shkoporov, A. N., E. V. Khokhlova, C. B. Fitzgerald, S. R. Stockdale, L. A. Draper, R. P. Ross and C. Hill (2018). "ΦCrAss001 represents the most abundant bacteriophage family in the human gut and infects Bacteroides intestinalis." *Nature Communications* **9**(1): 4781.

Stachler, E., C. Kelty, M. Sivaganesan, X. Li, K. Bibby and O. C. Shanks (2017). "Quantitative CrAssphage PCR Assays for Human Fecal Pollution Measurement." *Environ Sci Technol* **51**(16): 9146-9154.

Timmers, P. H. A. and M. De Baat (2021). "Trendalert - Passive sampling van micro-organismen en DNA." *BTO rapport* **BTO 2021.041**.

Timmers, P. H. A. and M. Schans van der (2022). "Opsporing van fecale besmettingsbronnen in grondwaterwinningen met multi-tracing technieken: casus Roodborn." *BTO* 2022.16.

Vincent-Hubert, F., B. Morga, T. Renault and F. S. Le Guyader (2017). "Adsorption of norovirus and ostreid herpesvirus type 1 to polymer membranes for the development of passive samplers." J Appl Microbiol **122**(4): 1039-1047.

Vincent-Hubert, F., C. Wacrenier, B. Morga, S. Lozach, E. Quenot, M. Mege, C. Lecadet, M. Gourmelon, D. Hervio-Heath and F. S. Le Guyader (2021). "Passive Samplers, a Powerful Tool to Detect Viruses and Bacteria in Marine Coastal Areas." Front Microbiol **12**: 631174.