

## Een snellere meetmethode voor bacteriën na werkzaamheden in het leidingnet

*Frits van Charante, Nikki van Bel, Marcelle van der Waals, Paul van der Wielen (KWR), Liesbeth Vissers (Brabant Water)*

**Na werkzaamheden of calamiteiten in het distributienet duurt het nu ongeveer vier dagen tot de resultaten voor alle te meten microbiologische parameters, waaronder het koloniegetal (KG22), bekend zijn. Voor de fecale indicatoren *E. coli* en enterococcen zijn resultaten binnen vier uur beschikbaar. Snellere alternatieven voor KG22 zijn de ATP-methode en het ColiMinder-systeem. Aanbevolen wordt om eerst de ATP-methoden tot twee jaar 'schaduw te draaien' naast KG22. Door snelle alternatieve methoden voor *E. coli*, enterococcen en KG22 te gebruiken kunnen drinkwaterbedrijven snel(ler) handelen bij verontreinigingen na werkzaamheden, of het distributienet eerder vrijgeven.**

Tijdens onderhoud of calamiteiten wordt de integriteit van het distributienet aangetast en bestaat het risico op verontreiniging door (pathogene) micro-organismen. Hierdoor voldoet het drinkwater dat klanten ontvangen mogelijk niet langer aan de normen. Een drinkwaterleiding wordt pas vrijgegeven wanneer die aan meerdere voorwaarden voor de microbiologische drinkwaterkwaliteit voldoet. Dit zijn allereerst de fecale indicatoren, *E. coli* en enterococcen. De wettelijke eis is dat drinkwater <1 kolonievormende eenheid (kve) per 100 ml bevat. Ook zijn er aanvullende parameters, namelijk de bacteriën van de coligroep, met een grenswaarde van <1 kve/100 ml en koloniegetal bij 22°C (KG22) en een actiegrens van 1000 kve/ml. Voor vrijgave van de leiding hoeft het resultaat van de parameter KG22 niet te worden afgewacht. Bij een overschrijding van de actiegrens van KG22 zijn eventuele aanvullende acties nodig om de situatie zo snel mogelijk te normaliseren.

Tot enkele jaren geleden kon de tijd tussen de afsluitende spuiactie bij werkzaamheden of calamiteiten en vrijgave van het distributienet ongeveer vier dagen bedragen. 12 tot 24 uur na spuien werd een watermonster genomen en microbiologische parameters gemeten:

- *E. coli* en bacteriën van de coligroep (duur: 1 dag)
- enterococcen (duur: 2 dagen)
- koloniegetal bij 22°C (KG22, duur: 3 dagen)

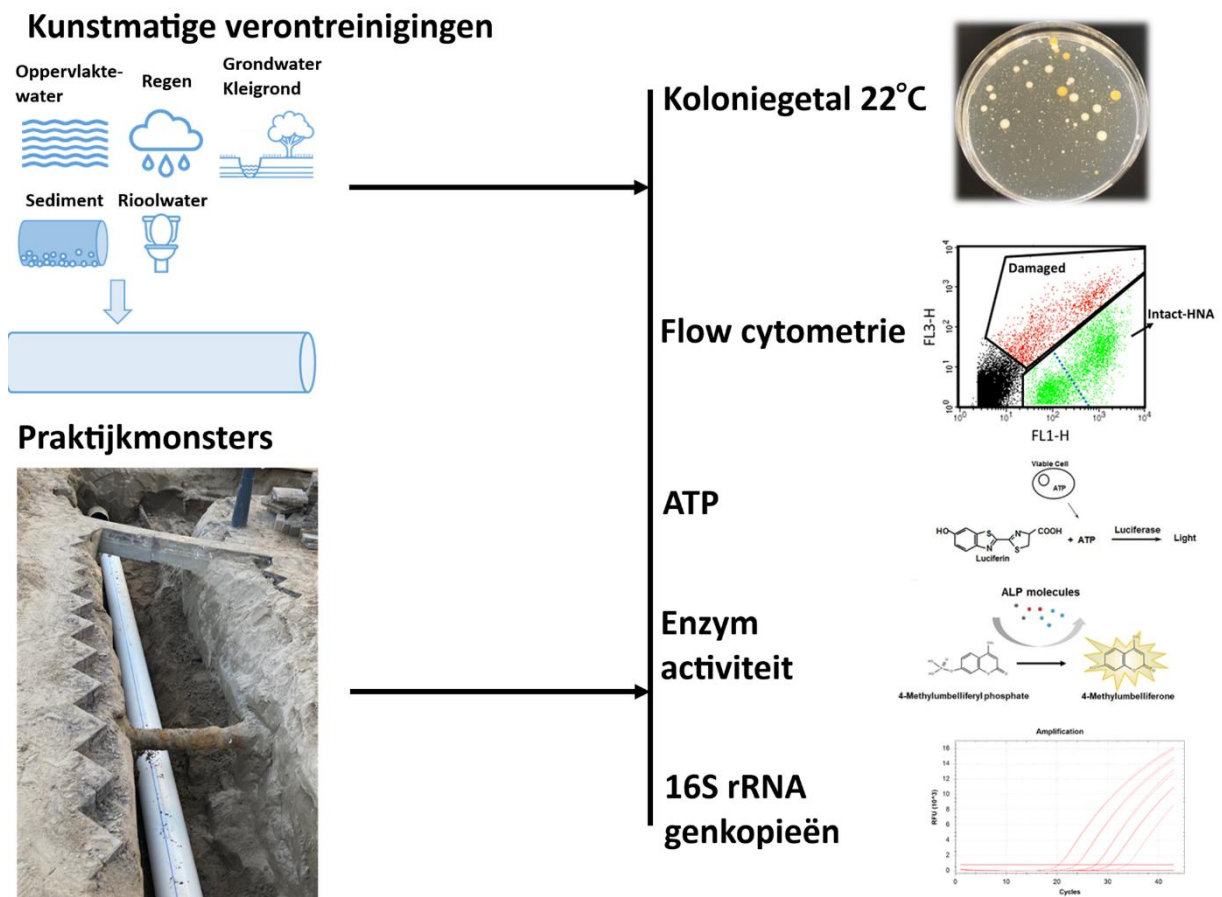
In de afgelopen jaren zijn in het onderzoeksprogramma Waterwijs (KWR Water, de Nederlandse drinkwaterbedrijven, het Vlaamse De Watergroep en VEWIN) en COBIO (Contactgroep Biologie van alle Nederlandse drinkwaterlaboratoria) meerdere opeenvolgende projecten uitgevoerd om deze tijd tussen werkzaamheden en vrijgave van het distributienet te verkorten. Zo is de 24 uur wachttijd tussen spuien (na werkzaamheden) en monsternamen teruggebracht naar 1 tot 24 uur. Daarnaast zijn er twee snelle alternatieve methoden ontwikkeld voor *E. coli* (RT-PCR, in 2019 door de Inspectie Leefomgeving en Transport (ILT) geaccepteerd voor gebruik) en voor enterococcen (RT-PCR, in 2024 geaccepteerd door ILT). Beide methoden geven binnen vier uur een resultaat. Ook loopt er een onderzoek naar een

sneller alternatief voor de kweekmethode voor (de bedrijfstechnische parameter) bacteriën van de coligroep.

Als er daarnaast ook voor KG22 een snelle, alternatieve methode komt, wordt de tijd tussen spuien en resultaat van de microbiologische analyses verkort van ongeveer vier dagen naar slechts vier tot acht uur. Dit geeft de drinkwaterbedrijven de mogelijkheid om sneller te handelen bij een fecale of niet-fecale verontreiniging, of om het distributienet eerder vrij te geven bij afwezigheid van normoverschrijdingen.

### Alternatieven voor KG22

KG22 is een van de oudste microbiologische waterkwaliteitsparameters. Hierbij wordt een watermonster op een voedingsbodem voor bacteriën aangebracht en drie dagen geïncubeerd bij 22°C. Hierna worden de bacteriekolonies geteld. Doordat er veel meer voedingsstoffen aanwezig zijn, wijkt de gebruikte voedingsbodem af van drinkwater. Hierdoor groeien er voornamelijk andere bacteriën op dan er van nature voorkomen in het distributienet. Bacteriën die van buitenaf het drinkwater hebben verontreinigd zijn dus beter te detecteren. Een plotselinge toename in KG22 is zodoende een signaal dat er mogelijk een verontreiniging van buiten het distributienet heeft plaatsgevonden. Daarnaast is KG22 een algemene parameter, waarbij voornamelijk niet-pathogene bacteriën worden geteld. Een toename in KG22 betekent dus niet direct dat er pathogene bacteriën aanwezig zijn die mogelijk schadelijk zijn voor de gezondheid.



Afbeelding 1. Overzicht verontreinigingen en mogelijke detectiemethoden

Er zijn meerdere snelle alternatieven beschikbaar voor de KG22-methode, die een beeld geven van het aantal aanwezige bacteriën in water. Deze detecteren plotselinge toenames in aantallen bacteriën, veroorzaakt door verontreiniging tijdens werkzaamheden. Een voordeel is dat deze methoden binnen enkele minuten tot uren een resultaat geven, in tegenstelling tot de drie dagen voor KG22. De volgende mogelijke alternatieve parameters zijn daarbij onderzocht (zie afbeelding 1):

- ATP is een maat voor de hoeveelheid actieve biomassa. De concentratie kan binnen enkele minuten bepaald worden. Voor dit onderzoek zijn twee methoden getest: een laboratorium- en een veldmethode (ATP LuminUltra).
- Flowcytometrie (FCM) is een telling van het aantal bacteriecellen in een watermonster. Flowcytometrie levert in 15 tot 30 minuten een resultaat op. In dit onderzoek is alleen de laboratoriummethode voor flowcytometrie gebruikt, maar er bestaan systemen die ook meegenomen kunnen worden het veld in.
- Er zijn twee sensoren onderzocht die het enzym alkalische fosfatase, dat in alle bacteriën aanwezig is, detecteren in een watermonster. Deze sensoren kunnen zowel in het laboratorium als in het veld worden gebruikt en geven in ongeveer 30 minuten resultaat. De geteste sensoren zijn de BACTcontrol (microLAN, Nederland) en de ColiMinder (VWMS, Oostenrijk).
- Kwantitatieve PCR (qPCR) is een moleculairbiologische methode waarmee in het laboratorium de totale hoeveelheid DNA van bacteriële oorsprong (16S rRNA-genkopieën) kan worden bepaald. Dit geeft een resultaat in 2,5 tot 4 uur.

Deze alternatieve parameters zijn in laboratoriumexperimenten vergeleken met KG22, waarbij kunstmatige contaminaties zijn toegevoegd om verontreiniging na werkzaamheden na te bootsen. Daarnaast zijn praktijkmonsters onderzocht die waren genomen na eerdere werkzaamheden. Ook zijn de kosten en technische eigenschappen van de alternatieve methoden vergeleken om een advies te kunnen geven over de methode die de beste vervanger zou kunnen zijn voor KG22, specifiek voor gebruik na werkzaamheden en calamiteiten in het distributienet.

### Laboratoriumexperimenten

Voor de laboratoriumexperimenten is drinkwater van twee drinkwaterproductielocaties kunstmatig verontreinigd met verschillende hoeveelheden van verontreinigingsbronnen die ook tijdens werkzaamheden of calamiteiten het drinkwater in het distributiesysteem kunnen vervuilen: regenwater, oppervlaktewater, grondwater, rioolwater, sediment uit spuiacties en (klei)aarde. Vervolgens zijn verdunningsreeksen gemaakt om de detectielimieten van de verschillende methoden te achterhalen voor elke afzonderlijke soort verontreiniging. Ook is gekeken naar de correlatie tussen KG22 en de alternatieve methoden om te achterhalen of deze correlatie voor de verschillende verontreinigingen vergelijkbaar is. Het doel hiervan is om te achterhalen of de nieuwe methoden vergelijkbare stijgingen in resultaat laten zien als KG22 bij een stijging in de concentratie van vervuiling. Zo kan vastgesteld worden of er inderdaad vergelijkbare informatie uit de meting te halen is.

KG22 bleek de meest gevoelige methode en kon bij de meeste verontreinigingssoorten de laagste concentratie verontreiniging onderscheiden van het achtergrondsignaal. De laagste concentratie verontreiniging (uitgedrukt in een percentage) dat kon worden gedetecteerd, varieerde van 0,0001% (rioolwater) tot 1,2% (oppervlaktewater). Van de alternatieve methoden detecteerde de ColiMinder-sensor het vaakst de laagste concentratie verontreiniging, gevolgd door de twee geteste ATP-methoden (laboratorium- en veldmethode), de FCM-parameters en tot slot qPCR en de BACTcontrol-sensor. KG22 en de twee ATP-methoden konden alle verontreinigingsbronnen in drinkwater detecteren, terwijl de ColiMinder en de andere alternatieve parameters regenwater en/of (klei)grond als verontreinigingsbron in drinkwater niet konden detecteren.

Alle alternatieve parameters waren significant gecorreleerd aan KG22, waarbij de sterkste correlaties werden verkregen tussen KG22 en de ATP-methoden ( $R^2 = 0,68 - 0,76$ ) en tussen KG22 en de ColiMinder ( $R^2 = 0,71$ ). De correlatie tussen 16S rRNA-genkopieën en KG22 was ook relatief sterk ( $R^2 = 0,61 - 0,68$ ). De correlaties van de BACTcontrol en de verschillende FCM-parameters met KG22 waren zwakker ( $R^2 = 0,24 - 0,44$ ) dan de andere parameters. Ook is gekeken naar correlaties voor de watermonsters uit de verdunningsreeks met alleen lagere KG22-aantallen (<1000 kve/ml) om een beeld te krijgen van de correlatie tussen KG22 en de alternatieve methoden bij meer realistische praktijkmetingen. De correlaties waren het sterkst voor beide ATP-methoden en de Coliminder ( $R^2 = 0,65 - 0,73$ ). De andere alternatieve methoden kwamen slecht overeen met KG22 in monsters met lage KG22-aantallen ( $R^2 = 0,24 - 0,51$ ). Samengevat leken de twee ATP-methoden en de ColiMinder op basis van de laboratoriumresultaten de beste kandidaten als vervanging voor KG22.

### **Praktijkmetingen**

Voor de praktijkmetingen zijn na vijf werkzaamheden en na één calamiteit watermonsters genomen. De monsters werden genomen vóór de werkzaamheden en op meerdere tijdstippen in de 48 uur na de spuiactie die volgt op de werkzaamheden. Deze watermonsters zijn vervolgens gemeten met alle methoden (zie afbeelding 2).

KG22-aantallen in watermonsters genomen na werkzaamheden of een calamiteit in het distributienet varieerden over het algemeen weinig gedurende 48 uur na spuien. Dit geeft aan dat er geen verontreiniging heeft plaatsgevonden met een verontreinigingsbron met hogere KG22-waarden. De KG22-aantallen lagen meestal onder de actiegrens van 1000 kve/ml, met uitzondering van een enkele locatie.



Afbeelding 2. Monstername met een monsterkast gedurende 48 uur na de werkzaamheden

Het gebrek aan variatie in KG22-aantallen maakte het ook moeilijk om een uitgebreide vergelijking te maken tussen KG22 en de alternatieve parameters die ook zijn gemeten aan de praktijkmonsters. Hierdoor was de correlatie tussen KG22 en de alternatieve parameters meestal afwezig of zwak ( $R^2$  per locatie: 0,28 – 0,37). Een uitzondering hierop waren beide ATP-parameters ( $R^2$  per locatie: 0,23 – 0,91) en de Coliminder ( $R^2$  per locatie: 0,36 – 0,7), die vaker een wat sterkere correlatie lieten zien. Hoewel ook bij de praktijkmetingen beide ATP-methoden en de ColiMinder het beste lijken van de alternatieve methoden, zijn de resultaten minder eenduidig dan de laboratoriumresultaten.

### Andere kenmerken

Voor de drie alternatieve parameters met de beste prestatiekenmerken (de twee ATP-methoden en de ColiMinder) zijn de kosten en technische eigenschappen vergeleken met KG22. De totale benodigde tijd tot resultaat is kort voor ATP (5 min.) en ColiMinder (35 min.) vergeleken met KG22 (3 dagen). Dit is exclusief de tijd die nodig is voor monstername en transport naar het laboratorium.

De kosten voor de drie alternatieve parameters variëren sterk, maar zijn een factor 5.000-50.000 duurder in uitvoering, reagentia en hardware (exclusief standaard microbiologische laboratoriumbenodigdheden als pipetten), vergeleken met de standaard kweekmethode. Dit komt gedeeltelijk doordat veel hardware voor de kweekmethode tot de normale laboratoriumapparatuur behoort, zoals incubatoren. De laboratorium-ATP-methode en de

ColiMinder worden als duurst geclassificeerd van de drie onderzochte alternatieve parameters, vooral omdat de eenmalige aanschaf van hardware (luminometer voor ATP en ColiMinder-sensor) kostbaar is. Alle drinkwaterlaboratoria hebben echter al een luminometer voor ATP-metingen, waardoor de kosten hiervoor in een drinkwaterlaboratorium sterk dalen en vergelijkbaar zijn met KG22-bepalingen. Voor de ATP-LuminUltra-methode is een aparte veldkit noodzakelijk waarvoor de reagentia en hardware van de laboratorium ATP-methode niet gebruikt kunnen worden. De reagentia van de ATP-LuminUltra-methode zijn duurder dan die van de laboratorium-ATP-methode, maar de hardware is juist goedkoper.

Met het oog op de leveringszekerheid is KG22 een veilige methode, aangezien er meerdere leveranciers zijn van het benodigde kweekmedium. Van de alternatieve parameters komt de laboratorium ATP-methode als beste naar voren. Er zijn meerdere leveranciers van luminometers en reagentia voor deze methode. Voor de veld-ATP-methode en de ColiMinder is er één leverancier. De BACTcontrol detecteert hetzelfde enzym als de ColiMinder, maar presteerde wel anders in dit onderzoek. Een enzymsensor kan zodoende niet zomaar vervangen worden door een enzymsensor van een andere partij, ook niet als deze sensoren hetzelfde enzym detecteren.

### **Conclusies en vooruitblik**

Vergeleken met de alternatieve parameters blijft KG22 de meest gevoelige methode om verontreiniging van drinkwater met een andere bron te detecteren: KG22 kan van de geteste parameters de laagste concentratie verontreiniging detecteren. Van de alternatieve methoden detecteerde de ColiMinder de laagste concentratie verontreiniging, gevolgd door de twee ATP-methoden, de FCM-parameters en tot slot 16S rRNA-genkopieën en de BACTcontrol. De correlatie van KG22 met iedere alternatieve parameter was het sterkst voor beide ATP-methoden en de ColiMinder.

KG22 en de twee ATP-methoden detecteerden alle verontreinigingsbronnen in drinkwater. De andere alternatieve methoden konden regenwater en/of (klei) aarde als verontreinigingsbron in drinkwater niet detecteren.

Monsters genomen na reparaties of een calamiteit in het DWDS vertoonden over het algemeen een beperkte variatie in KG22 in de tijd, wat aangeeft dat er geen verontreiniging plaatsvond met water van een bron met hogere KG22-waarden. Het gebrek aan variatie in KG22 maakte het ook moeilijk en minder betrouwbaar om met praktijkmonsters een uitgebreide vergelijking te maken tussen KG22 en de alternatieve parameters.

Op basis van de resultaten van het onderzoek wordt aanbevolen om in eerste instantie een vervolgtraject in te gaan met de laboratorium-ATP-methode, met als doel deze methode uit te werken als alternatieve parameter voor KG22 na ingrepen in het leidingnet [1], [2]. Een volgende stap hiervoor zou langdurig (b.v. één à twee jaar) schaduwdraaien zijn, waarbij watermonsters na werkzaamheden zowel met KG22 als met de laboratorium ATP-methoden worden geanalyseerd. Hiermee kan een grote gezamenlijke dataset van verschillende drinkwaterbedrijven, voorzieningsgebieden en seizoenen opgebouwd worden. Deze gezamenlijke dataset kan dan gebruikt worden in een validatietraject richting implementatie. De database kan waarschijnlijk ook worden gebruikt om een actiewaarde af te leiden, die vergelijkbaar is met de huidige actiewaarde voor KG22 (1000 kve/ml). Aqualab Zuid, het

drinkwaterlaboratorium van WML, Brabant Water en Evides, gaat deze stappen het komende jaar zetten voor de drie moederbedrijven.

### **Financiering**

Dit onderzoek is gefinancierd uit het collectieve onderzoeksprogramma Waterwijs van de Nederlandse drinkwaterbedrijven, het Vlaamse De Watergroep en Vewin, uitgevoerd door KWR Water Research Institute.

### **Referenties**

1. Van Bel, N., van der Waals, M., van Charante, F., van Rijn, J., van der Veen, A. (2024). *Alternatieve parameter voor KG22 na werkzaamheden en calamiteiten in het distributienet*. BTO 2024.018, KWR Watercycle Research Institute.
2. Van der Waals, M. J. et al. (2024). 'Alternative for HPC22 after repairs in the drinking water distribution system'. Water Research, 265, 122264.