



Bedrijfstakonderzoek
KWRW 2025.037 | September 2025

AMVD Meetmethoden

Colofon

AMVD Meetmethoden

KWRW 2025.037 | September 2025

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

Opdrachtnummer

402045-252

Projectmanager

Michiel Hootsmans
Marcelle van der Waals

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische veiligheid

Auteur(s)

Patrick Smeets, Danielle van der Linde, Tessa Pronk, Anke Brouwer, Aleida Hommes

Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Keywords

Analysemethode, hemoflow, ColorSeeds

Jaar van publicatie
2025

Meer informatie
Dr. Ir. Patrick Smeets

T +31 (0)30 6069584
E patrick.smeets@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

KWR

September 2025 ©

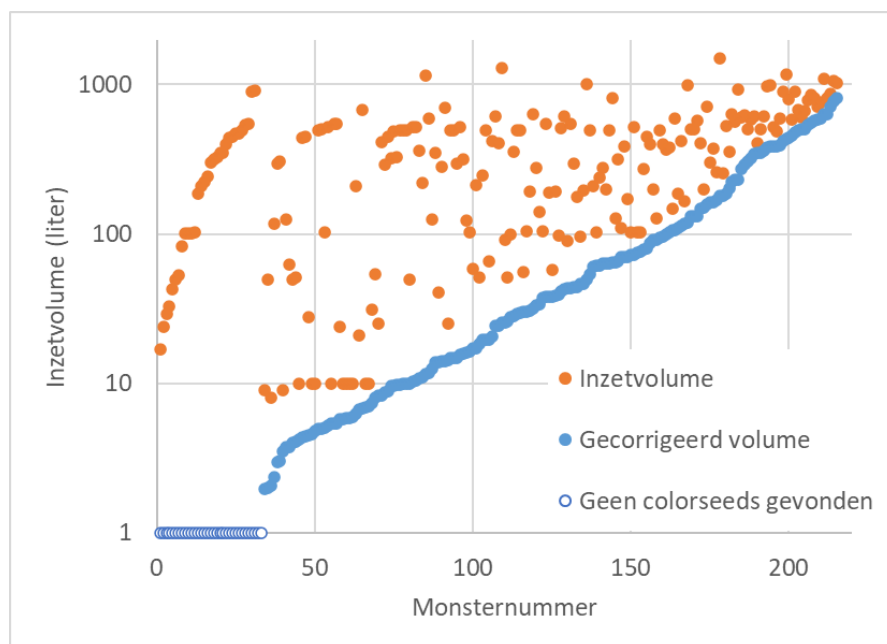
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen,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

Managementsamenvatting

Meer inzicht in de opbrengst van *Cryptosporidium* en *Giardia* analyses in grote monstervolumes

Auteur(s) Patrick Smeets, Danielle van der Linde, Tessa Pronk, Anke Brouwer, Aleida Hommes

Drinkwaterbedrijven voeren monsterprogramma's van *Cryptosporidium* en *Giardia* in oppervlaktewater uit voor de kwantitatieve microbiologische risicoanalyse in de AMVD (analyse microbiologische veiligheid drinkwater). Steeds grotere monstervolumes - tot 1000 liter - zijn gebruikt om de detectiegrens zo laag mogelijk te krijgen. Hierbij bleek de opbrengst (recovery) vaak zeer laag, waardoor alsnog de detectiegrens hoger was dan gewenst. In dit onderzoek zijn historische meetgegevens verzameld en laboratoriumexperimenten uitgevoerd om meer inzicht te krijgen in de opbrengst en een optimaal monstervolume te bepalen. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen de opbrengst van de concentratiestap met hemoflow en verdere opwerking en analyse in het laboratorium. Uit historische gegevens blijkt dat hemoflow de laagste opbrengst heeft, al spreken laboratoriumexperimenten dit tegen. Van de onderzochte waterkwaliteit- en weergegevens blijkt alleen een negatieve invloed van gesuspenderde stoffen (ook waargenomen als troebelheid) op de opbrengst. Het type gesuspenderde stof, bijvoorbeeld algen, lijkt daarbij ook van belang. Uit het experimenteel onderzoek volgt een aanbeveling voor het optimale monstervolume van 200 liter. Aanbevolen wordt om per monsterlocatie of watertype te bepalen welk monstervolume resulteert in de laagste detectiegrens. Het uitvoeren van meer waterkwaliteitsanalyses tijdens de monsternamen kan hier mogelijk inzicht in verschaffen en troebelheid zou tijdens monsternamen kunnen worden gemeten om niet meer monster te concentreren dan kan worden onderzocht onder de microscoop. Ander oplossingsrichtingen zijn het onderzoeken van verbeterde hemoflow of andere concentratiemethoden, het toepassen van andere analysetechnieken of het bovenstrooms meten waar pathogeenconcentraties hoger zijn.



Wanneer het inzetvolume wordt gecorrigeerd voor opbrengst volgt hier vaak een relatief klein onderzocht volume uit, en daarmee een hoge meetgrens

Belang: Grote monstervolumes leiden vaak niet tot lage detectiegrenzen door lage opbrengst

Drinkwaterbedrijven voeren iedere vier jaar een analyse microbiologische veiligheid drinkwater (AMVD) uit voor oppervlaktewaterzuiveringen. Het bepalen van de concentratie pathogenen, waaronder *Cryptosporidium* en *Giardia*, is van belang om een nauwkeurige risicoschatting te maken. Aangezien hiervoor positieve monsters nodig zijn, worden grote volumes water geanalyseerd om zo de detectiegrens zo laag mogelijk te krijgen. Hierbij is gebleken dat de opbrengst (het percentage teruggevonden pathogenen in het monster) vaak erg laag is, waardoor de detectiegrens alsnog zo hoog is dat weinig pathogenen worden gedetecteerd. Er is daarom behoefte aan een optimalisatie tussen monstervolume en opbrengst om zo de analyse zo gevoelig mogelijk te maken. In dit onderzoek lag de nadruk op de pathogenen *Cryptosporidium* en *Giardia*.

Aanpak: Historische data en experimenten

De drinkwaterbedrijven hebben gezamenlijk al enkele honderden metingen uitgevoerd. Voor dit onderzoek zijn alle meetgegevens verzameld, inclusief aanvullende gegevens over waterkwaliteit. Doel was meer inzicht te krijgen in factoren die de opbrengst negatief beïnvloeden. Het aantal beschikbare waterkwaliteitsparameters bleek echter beperkt.

Daarnaast zijn experimenten uitgevoerd waarbij een bekend aantal pathogenen werd toegevoegd aan een grootvolumemonster. Daarbij werden ook zogenaamde ColorSeeds toegevoegd die in de praktijk worden gebruikt om de opbrengst te bepalen. Tot slot is met simulaties onderzocht hoe de opbrengst de nauwkeurigheid van de risicoanalyse beïnvloedt.

Resultaten: Deeltjes grootste storende factor

De verwachte relatie tussen monstervolume en opbrengst werd gevonden voor de ColorSeeds opwerking en analyse in het laboratorium, maar niet voor de natuurlijke organismen.

Waterkwaliteitsmetingen laten zien dat gesuspendeerde stoffen (ook gemeten als troebelheid) een negatieve invloed op de opbrengst kunnen hebben. Daarbij lijkt het type stof, zoals algen, ook van belang. Uit simulaties blijkt dat het aantal positieve monsters bepalend is voor de nauwkeurigheid (of onzekerheid) van de risicoanalyse.

Toepassing: Kleiner monstervolume en nader onderzoek

Het vinden van een optimale combinatie van monstervolume en opbrengst blijkt gerelateerd aan de waterkwaliteit die per locatie kan verschillen. Nader onderzoek kan zich richten op deze locatiespecifieke aspecten, bijvoorbeeld door het gelijktijdig bepalen van de waterkwaliteit, waarbij de troebelheid kan worden gebruikt om een te groot monstervolume te voorkomen. Andere oplossingsrichtingen zijn het bovenstrooms meten van pathogenen, waar concentraties hoger zijn, het optimaliseren van hemoflow of andere concentratiemethoden of het toepassen van andere analysemethoden. Op korte termijn wordt aanbevolen monstervolumes te beperken tot maximaal 200 liter, tenzij ervaring voldoende recovery bij grotere volumes laat zien.

Het Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *AMVD Meetmethoden* (KWRW 2025037).

Inhoud

Colofon	2
<i>Managementsamenvatting</i>	3
Inhoud	5
1 Inleiding	7
1.1 Projectomschrijving	7
1.2 Activiteiten	7
1.3 Leeswijzer	7
2 Historie opbrengst <i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i>	9
2.1 Huidige analyse <i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i> voor AMVD	9
2.2 Opbrengst inclusief hemoflow concentratie	10
2.3 Opbrengst exclusief hemoflow concentratie (laboratorium-analyse)	11
2.4 Mogelijke oorzaken lage opbrengst	12
2.5 Onderzoeksvragen	14
2.6 Oplossingsrichtingen	14
2.7 Opbrengst in de AMVD	14
2.8 Eerder onderzoek opbrengst hemoflow	15
3 Analyse van historische meetgegevens	17
3.1 Historische opbrengst gegevens KWR	17
3.1.1 Invloed opbrengst op het effectief onderzochte monstervolume	17
3.1.2 Opbrengst hemoflow concentratie versus opbrengst laboratoriumanalyse	18
3.1.3 Invloed monstervolume op opbrengst	19
3.1.4 Invloed hoeveelheid pellet op opbrengst	20
3.2 Historische opbrengstgegevens, waterkwaliteit alle laboratoria en weergegevens	22
3.2.1 Aanpak historische opbrengst gegevens	22
3.2.2 Invloed locatie of bron watermonster op opbrengst	23
3.2.3 Invloed waterkwaliteit op opbrengst	27
3.2.4 Invloed weer op opbrengst	29
3.2.5 Correlatie tussen <i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i> opbrengst	30
3.2.6 Meervoudige regressie van historische gegevens	31
3.3 Conclusies analyse historische data	32
3.3.1 Beperkingen in het onderzoek van historische gegevens	32
3.3.2 Bevindingen uit analyse van historische gegevens	32
4 Experimenten opbrengst	35

4.1	Doelen experimenten opbrengst	35
4.2	Uitgevoerde experimenten opbrengst	35
4.3	Resultaten experimenten opbrengst	36
4.3.1	Relatie ColorSeeds en UV afgedode protozoa laboratoriumanalyse (exclusief hemoflow)	36
4.3.2	Opbrengst <i>Cryptosporidium</i> versus <i>Giardia</i> bij laboratoriumanalyse	39
4.3.3	Relatie ColorSeeds en UV afgedode protozoa inclusief hemoflow	41
4.3.4	Opbrengst <i>Cryptosporidium</i> versus <i>Giardia</i> bij concentratie met hemoflow	43
4.3.5	Opbrengst exclusief versus inclusief hemoflow	45
4.3.6	Relatie monstervolume en opbrengst inclusief hemoflow	47
4.3.7	Optimaal monstervolume voor opbrengst ColorSeeds inclusief hemoflow	49
4.3.8	Relatie monstervolume en opbrengst exclusief hemoflow	50
4.3.9	Vergelijking SSRC opbrengst	50
5	Invloed opbrengst op AMVD berekeningen	52
5.1	Variatie van concentraties pathogenen in oppervlaktewater en bemonstering	52
5.2	Variatie en onzekerheid in QMRA	53
5.3	Aantal monsters in relatie tot zekerheid over concentratieverdeling	55
5.4	Meetprogramma optimaliseren	56
5.5	Simulatie effect verbeterde opbrengst op onzekerheid	57
5.6	Invloed opbrengst op de AMVD	60
6	Conclusies en aanbevelingen	61
6.1	Conclusies	61
6.2	Aanbevelingen	63
7	Referenties	64
I	BIJLAGE HISTORISCHE DATA	66

1 Inleiding

1.1 Projectomschrijving

In dit project zijn knelpunten van en oplossingen voor meetmethoden voor het kwantificeren van microbiologische risico's onderzocht. Dit betreft de opbrengst (recovery) bij het concentreren van grote volumes voor de analyse van *Cryptosporidium* en *Giardia*. Voor het uitvoeren van de analyse microbiologische veiligheid drinkwater (AMVD) worden meetprogramma's uitgevoerd om de concentratie pathogenen in ruwwater en de reductie van indicatororganismen door drinkwaterbehandelingsprocessen te bepalen. Hiervoor worden monstervolumes tot 1000 liter onderzocht die voor deze analyses moeten worden geconcentreerd tot enkele milliliters. De opbrengst is het percentage van de organismen in het oorspronkelijke monster dat bij de analyse wordt teruggevonden. Deze opbrengst wordt bepaald door een vergelijkbaar organisme voor en na concentratie (en verdere opwerking) te meten. Dit kunnen van nature aanwezige organismen zijn (bijvoorbeeld somatische colifagen voor enterovirussen) of deze organismen worden aan het ruwe monster toegevoegd (bijvoorbeeld ColorSeed voor *Cryptosporidium* en *Giardia*). In AMVD-berekeningen worden analyseresultaten gecorrigeerd voor deze opbrengst. Bij eerdere meetcampagnes is gebleken dat in een aantal gevallen de opbrengst voor *Cryptosporidium* en/of *Giardia* extreem laag is of niet kan worden bepaald (bijvoorbeeld <1%). Onduidelijk is of de opbrengst werkelijk zo laag is, of dat de opbrengstbepaling niet representatief is voor het onderzochte organisme.

1.2 Activiteiten

Dit rapport betreft de opbrengst voor de analyse van *Cryptosporidium* en *Giardia*, bij grote monstervolumes geconcentreerd met hemoflow. Het onderzoek omvatte hiervoor de volgende activiteiten:

1. Historische data over opbrengst: naast de opbrengst zelf is zo veel mogelijk informatie verzameld die relevant kan zijn om de oorzaak van lage recoveries te bepalen, zoals locatie, monstervolume, datum (jaargetijde), concentratie- en analysemethode, spike, watermatrix en stoorflora inclusief algen.
 - Minimale opbrengst AMVD: uit praktijkvoorbeelden is afgeleid wanneer opbrengst tot knelpunten in de AMVD leidt. Vervolgens is onderzocht welke opbrengst minimaal nodig is in relatie tot het monstervolume en de kans op een positief monster. Hierbij is uitgegaan van de huidige analysetechnieken die voor de AMVD worden toegepast. Het toepassen van alternatieve technieken, bijvoorbeeld moleculaire technieken, valt buiten deze studie.
 - Experimenten opbrengst: de opbrengst van de spike (ColorSeed) is vergeleken met de opbrengst van natuurlijke protozoa (*Cryptosporidium* en *Giardia*) in combinatie met en zonder concentratie met hemoflow, door een spike aan het concentraat toe te voegen. Daarbij is onderscheid gemaakt tussen effect van concentratie en de invloed van de geconcentreerde matrix op de analyse zelf.

1.3 Leeswijzer

In Hoofdstuk 2 worden de ervaringen met opbrengst tot nu toe besproken. Mogelijke verklaringen voor een lage opbrengst worden uiteengezet als basis voor het onderzoek. Ook worden de eisen in het Richtsnoer AMVD (ILT 2019) ten aanzien van opbrengst en meetresultaten samengevat. In Hoofdstuk 3 is een analyse uitgevoerd op historische gegevens van de *Cryptosporidium* en *Giardia* analyses die zijn uitgevoerd bij KWR. Hieruit volgt de mate waarin de opbrengst varieert, welke rol de concentratie met hemoflow speelt ten opzichte van de opwerking en analyse in het laboratorium en hoe dit de detectiegrens van de analyses beïnvloedt. Daarnaast zijn historische gegevens van alle drinkwaterlaboratoria over de waterkwaliteit ten tijde van de monsternamen verzameld, naast de

opbrengst gegevens. Ook zijn weergegevens op de momenten van monstername verzameld. Vervolgens is onderzocht of er correlaties zijn tussen waterkwaliteit of weer en de resulterende opbrengst. In Hoofdstuk 4 worden de experimenten beschreven die zijn uitgevoerd voor dit project. Hierbij is de overeenkomst tussen de opbrengstbepaling met ColorSeeds en de opbrengst van toegevoegde , UV-afgedode *Cryptosporidium* en *Giardia* onderzocht. Deze organismen zijn door de leverancier (Waterborne Inc.) verkregen uit mest van geïnfecteerde kalveren, waarvoor dezelfde eigenschappen worden verwacht als de 'natuurlijke' protozoa die in oppervlaktewater aanwezig zijn. Ook zijn diverse invloedsfactoren zoals het monstervolume en mogelijke verbeteringen aan de methode onderzocht. In Hoofdstuk 5 zijn simulaties beschreven waarbij de invloed van de opbrengst op de AMVD is onderzocht. De invloed van het aantal te nemen monsters, monstervolume en opbrengst op de onzekerheid is onderzocht middels tweedimensionale Monte Carlo simulaties. Hieruit volgen aanbevelingen over hoe het monsterprogramma te optimaliseren. Hoofdstuk 6 bevat de conclusies en aanbevelingen uit de hele studie en in Hoofdstuk 7 zijn de referenties opgenomen.

2 Historie opbrengst *Cryptosporidium* en *Giardia*

2.1 Huidige analyse *Cryptosporidium* en *Giardia* voor AMVD

De variatie van de concentraties *Cryptosporidium* en *Giardia* in oppervlaktewaterbronnen moet voor de AMVD worden vastgesteld door middel van een monitoringsprogramma. Concentraties *Cryptosporidium* en *Giardia* in oppervlaktewater zijn zeer variabel en de concentraties zijn vaak laag. Om de variatie in concentraties goed te kunnen vaststellen, is het van belang ook deze lage concentraties te meten. Daarom worden volumes tot 1000 liter oppervlaktewater geanalyseerd. Concentratie met hemoflow wordt gebruikt om dit volume te reduceren tot circa 0,5 liter. Figuur 1 toont de hemoflow opstelling. Het te bemonsteren water wordt op locatie met een slang en pomp aangesloten op het metalen monstervat, of een IBC container wordt op locatie gevuld met monster en vervolgens op een geschikte locatie aangesloten op het monstervat. Water uit het monstervat wordt door het hemoflow membraan gepompt, waarbij het permeaat wordt afgevoerd, en het concentraat wordt teruggevoerd in het monstervat. Het monstervat wordt bijgevuld met te bemonsteren water via een vlotter. Debiet, transmembraandruk en bemonsterd volume worden daarbij continu gemeten. Wanneer voldoende water is bemonsterd, wordt het membraan doorspoeld om ook het achtergebleven materiaal in het monstervat op te vangen.

Zo wordt een concentraat van circa 0,5 liter verkregen dat op het laboratorium verder wordt opgewerkt en geanalyseerd. Dit omvat globaal de volgende stappen (zie ook Figuur 2):

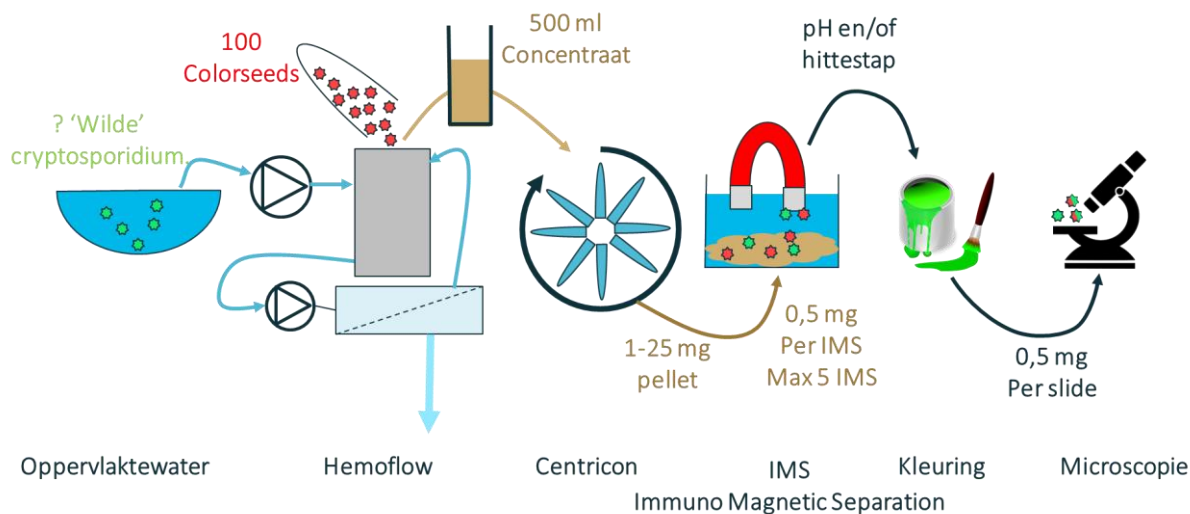
- Centrifugeren van het monster en afgieten van het decantaat.
- Het pellet wordt verder verwerkt met behulp van IMS (immuno-magnetic separation). Magnetische bolletjes, gecoat met antigenen voor *Cryptosporidium* en *Giardia* worden gemengd met het pellet om aan deze organismen te binden. Vervolgens worden de deze met een magneet gescheiden van het pellet. Per IMS kan maximaal 0,5 ml (circa 0,5 g) pellet worden onderzocht. Bij een grotere hoeveelheid pellet moeten dus meerdere IMS parallel worden uitgevoerd.
- De magnetische bolletjes worden weer gescheiden van de *Cryptosporidium* en *Giardia* door een pH schok (pH ...) toe te passen.
- *Cryptosporidium* en *Giardia* in het resulterende monster worden fluorescerend groen gekleurd met een antilichaam met een chromofoor: easystain®
- Hiermee worden preparaten gemaakt die met fluorescentie-microscopie worden geanalyseerd. Er worden maximaal 5 preparaten onderzocht per monster.
- Het getelde aantal cysten of oöcysten wordt gedeeld door het oorspronkelijke volume (gecorrigeerd voor opbrengst) dat met hemoflow is geconcentreerd om de concentratie in oppervlaktewater te bepalen. Dit inzetvolume wordt eventueel gecorrigeerd voor verliezen tijdens de opwerking en het aantal onderzochte preparaten.
- Voor de AMVD worden het getelde aantal cysten of oöcysten gerapporteerd en het inzetvolume.
- Daarnaast wordt de opbrengst bepaald, voor alle stappen als geheel of voor de stappen na hemoflow. Zie hieronder. Gegevens van de opbrengstbepaling worden ook gerapporteerd voor de AMVD.



Figuur 1 hemoflow opstelling. Water uit het monstervat wordt door het hemoflow membraan gepompt, waarbij het permeaat wordt afgevoerd, en het concentraat wordt teruggevoerd in het monstervat. Het monstervat wordt bijgevuld met te bemonsteren water via een vlotter.

2.2 Opbrengst inclusief hemoflow concentratie

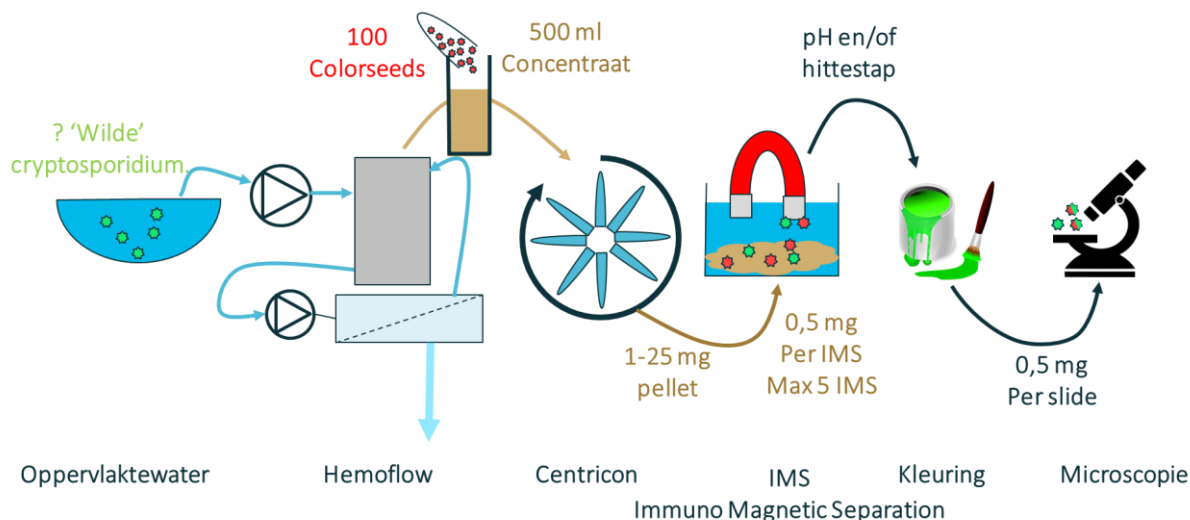
Tijdens het concentreren, opwerken en analyseren van het monster gaat een deel van de organismen in het oorspronkelijke monster ‘verloren’. De opbrengst van de gezamenlijke stappen wordt bepaald om de resultaten van de analyse hiervoor te corrigeren. Bij voorkeur worden hierbij alle stappen van monsternamen tot telling meegenomen. Dit is schematisch weergegeven in Figuur 2. Hiervoor wordt bij de start van de monsternamen een bekende hoeveelheid ColorSeed, van de leverancier Biopoint, toegevoegd. Hiervoor zijn standaard buisjes beschikbaar met 100 ColorSeeds. ColorSeed zijn *Cryptosporidium* en *Giardia* cellen die reeds een rode kleuring hebben ondergaan, waarmee ze bij fluorescentiemicroscopie kunnen worden onderscheiden van de ‘natuurlijke’ organismen in het monster. ColorSeed is al ca. 20 jaar de internationale standaard voor opbrengstbepaling van de *Cryptosporidium* en *Giardia* detectiemethoden in water, en goedgekeurd door de USEPA. Door het aantal getelde ColorSeed (oö)cysten te delen door het aantal toegevoegde organismen (spike) wordt de opbrengst berekend. Wanneer er meer pellet is dan met 5 IMS kan worden geanalyseerd, wordt de spike hiervoor gecorrigeerd. Het inzetvolume wordt gecorrigeerd voor de opbrengst om zo de concentratie organismen in het bemonsterde water te bepalen. Door niet de telling maar het volume te corrigeren voor opbrengst worden ook metingen waarbij geen organismen zijn geteld gecorrigeerd voor de lagere gevoeligheid als gevolg van de opbrengst. Indien er geen organismen zijn geteld, resulteert dit in een ‘kleiner dan’ concentratie voor een kleiner monstervolume. Deze waarde wordt beschouwd als de meetgrens van de methode.



Figuur 2 Schematische weergave van de stappen voor *Cryptosporidium* en *Giardia* analyse in grote volumes, opbrengst-bepaling inclusief hemoflow

2.3 Opbrengst exclusief hemoflow concentratie (laboratorium-analyse)

In de praktijk bleek de opbrengst, wanneer bepaald over de analyse inclusief hemoflow concentratie, vaak zeer laag en werden slechts enkele of helemaal geen ColorSeeds teruggevonden bij de fluorescentiemicroscopie. Voor de AMVD is daarom afgesproken alleen de opbrengst van de opwerking en analyse op het lab te bepalen. Daarvoor worden de ColorSeeds toegevoegd aan het concentraat van de hemoflow. Dit is schematisch weergegeven in Figuur 3. Het verlies aan organismen door de concentratie met hemoflow wordt daarbij dus niet meegenomen bij de correctie van de resultaten. Deze aanpak leidt daarom tot een onderschatting van de werkelijke concentratie in het monster. Het is immers bekend dat de opbrengst van de hemoflow stap lager is dan 100%. Toch heeft RIVM aanbevolen deze methode te gebruiken om bruikbare opbrengst-resultaten te verkrijgen. Het heeft niet de voorkeur, omdat een zeer lage opbrengst die anders zou leiden tot verworping van de analyseresultaten voor de AMVD (zie Paragraaf 2.7) nu niet wordt opgemerkt.



Figuur 3 Schematische weergave van de stappen voor *Cryptosporidium* en *Giardia* analyse in grote volumes, opbrengst-bepaling exclusief hemoflow (laboratorium-analyse)

2.4 Mogelijke oorzaken lage opbrengst

Natuurlijke protozoa en ColorSeeds worden geconcentreerd en gedetecteerd op basis van een aantal eigenschappen. Deze eigenschappen kunnen in verschillende stadia van concentratie en opwerking worden aangetast, waardoor de opbrengst afneemt. Daarbij is het mogelijk dat dit niet in gelijke mate plaatsvindt voor natuurlijke protozoa en ColorSeeds. In dat geval geeft de opbrengstbepaling geen goed beeld van de werkelijke opbrengst van de natuurlijke protozoa. De volgende eigenschappen kunnen worden aangetast met een lagere opbrengst als gevolg en worden hieronder meer uitgebreid besproken:

- Kapot gaan van cyste of oöcyste als gevolg van milieu, isolatie, kleuring, transport en opslag
- Verlies antigenen aan oppervlakte (oö)cyste
- Hechting/afdekking antigenen op protozoa door andere stoffen
- Kleuring grijpt niet aan, of wordt afgevangen door andere stoffen
- Interne kleuring (rood) verliezen (alleen ColorSeeds)
- Externe kleuring (groen) verliezen

Daarnaast zijn er andere fysieke mogelijke oorzaken voor een lagere opbrengst:

- Verlies doordat slechts een deel van het pellet wordt onderzocht. De hoeveelheid pellet hangt af van de watermatrix (onder condities als stroming, wind, opwerveling, regen) en het monstervolume. Wanneer de hoeveelheid materiaal in het oppervlaktewater tijdens monsternamen kan worden geschat zou het volume beperkt kunnen worden zodat de hoeveelheid pellet geheel kan worden onderzocht en er geen ColorSeeds verloren gaan. Daardoor wordt een telling <10 ColorSeeds minder waarschijnlijk.
- Verlies door achterblijvend materiaal in het systeem (membraan, recirculatievat, slangen, watermeter). Dit wordt beïnvloed door de crossflowsnelheid (begin->eind verschil), de transmembraandruk, procedure voor uitspoelen/monster verzamelen, de watermatrix (algen of biopolymeren die hechten, pH) en het aantal maal circuleren.
- Verlies in supernatant bij centrifugeren (Veenendaal en Brouwer-Hanzens 2007)
- Schurend verwijderen van protozoa van de metalen bolletjes tijdens het mengen bij IMS – bij veel beweging/zand
- Niet optimale condities voor hechting aan antilichamen aan metalen bolletjes en weer onthechten bij IMS (b.v. pH)
- Concurrerende stoffen voor hechting aan antilichamen aan metalen bolletjes bij IMS

Robuustheid, kapot gaan (oö)cyste

De robuustheid van natuurlijke protozoa kan worden beïnvloed door tijd in het milieu, zonlicht en temperatuur. Gezien de persistentie van een cyste wordt verwacht dat dit weinig invloed heeft op de analyse. ColorSeeds zijn geïsoleerd uit kalvermest, wat mogelijk al invloed heeft op de eigenschappen. Daarnaast heeft kleuring plaatsgevonden en zijn ze langere tijd geconserveerd en getransporteerd, waarbij condities zoals temperatuur kunnen variëren. Deze invloed is waarschijnlijk ook beperkt, omdat het gebruik van ColorSeeds is gevalideerd voor de overeenkomst met natuurlijke protozoa. Voor dit onderzoek is van belang: Onder welke condities zijn ColorSeeds gevalideerd t.o.v. natuurlijke protozoa (welke bron van natuurlijke protozoa, welke watermatrix, welke opwerking en analysemethode)? Het is mogelijk dat verschillen in het test stadium zo klein zijn dat zij geen invloed hebben onder de testcondities, maar wel bij verdere stress in onze toepassing in de praktijk.

Verlies antigenen aan oppervlakte

Verlies van antigenen zou kunnen plaatsvinden door schuring met gesuspenderde deeltjes (Warncke et al. 2003). Verwachting is dat dit een grotere invloed heeft dan contact met het membraanfilter. De verwachting is dan ook dat de aanwezigheid van schurende deeltjes in het monster belangrijker is dan de drukval over het hemoflow membraan. Daarnaast gaven Warnecke et al. aan dat loog ook hiertoe kan leiden. Moore et al. (1998) beschreven dat chloor ook tot verlies van antigenen kan leiden, maar dit is niet relevant voor de Nederlandse monsters.

Storende elementen in analyse

Kalk, pH, ijzer, algen en mogelijk andere parameters van de watermatrix zouden invloed kunnen hebben op de IMS en kleuring van de protozoa. Mogelijk bezetten stoffen de hechtingsplaatsen van protozoa op de metalen bolletjes, of schermen ze protozoa af van deze bindingsplaatsen. Ook kunnen ze invloed hebben op het los maken van de protozoa van de bolletjes door het effect van een pH shock te neutraliseren. Algen kunnen waarneming onder de microscoop bemoeilijken, doordat zij ook fluorescentie kunnen vertonen of protozoa afdekken.

Het mechanisme van aantasting of storing, en de mate waarin, kan verschillen per stap in de opwerking en analyse. Voorgaande stappen kunnen daarbij invloed hebben op achterliggende stappen. In Tabel 1 is een overzicht gegeven van de mogelijke factoren die de opbrengst negatief kunnen beïnvloeden. Daarbij is onderscheid gemaakt tussen de watermatrix en condities. In de laatste kolom zijn factoren benoemd die de mate van storing kunnen beïnvloeden.

Tabel 1 Overzicht factoren die opbrengst in verschillende stadia van analyse zouden kunnen beïnvloeden

	Matrix (verandering)	Conditie (deels beïnvloedbaar)	Bepalende uitkomst
Oppervlaktewater	Deeltjes Algen Zand	Zonlicht (opslag monster) Temperatuur (opslag monster) Opwerveling (stroming, schepen, regen, wind)	Gesuspenderde deeltjes Zand Storende stoffen
Hemoflow	Concentratie deeltjes verhoogd	Volume/indikking Aantal cycli Transmembraandruk	Fractie beschadiging organismen
Centrifuge	Concentratie deeltjes verhoogd	Aantal G Duur Supernatant afvoer	Hoeveelheid pellet (splitsen in aantal IMS) Zandgehalte
IMS + extra IMS	pH Zand	Hoeveelheid bolletjes pH voor hechting/losweken Beweging (schuring)	Storende stoffen Fractie metalen bolletjes die kan worden teruggewonnen
Kleuring en microscopie	Kleur-afvangende stoffen	Type kleuring Hoeveelheid kleurstof Expertise analist	Mate kleuring organismen

Fradette et al. (2022) noemen enkele onderzoeken waarbij verstoring van de analyse door verschillende factoren is onderzocht. Kyung-Yu et al. (2006) zagen het grootste verlies (circa 38%) bij de elutie van organismen uit het filter bij concentratie van drinkwatermonsters. Daarbij werd echter dead-end filtratie gebruikt, terwijl hemoflow een cross-flow methode is. Centrifugeren resulteerde in 4 tot 7% verlies van organismen. Bij IMS trad weinig verlies (0-3%) op bij de geconcentreerde drinkwatermonsters, maar oppervlaktewater is niet onderzocht. Rodgers et al. (1995) identificeerden 24 algensoorten die fluorescentie vertonen en daarmee de detectie van cysten en oöcysten bemoeilijken. Kothavade (2012) rapporteerden ook verstoring van de IMS door kruisreacties met met name andere

eukaryoten zoals algen, gisten en silicaten (in Fradette 2022). Hu et al. (2004) vonden een verbetering van *Cryptosporidium* opbrengst van de filtratiestap bij lage toevoeging van silicaten, maar juist een lagere opbrengst bij hoge concentraties silicaten ($> 0,216$ g/l). Voor *Giardia* vonden zij met name invloed van de rotatietijd van IMS, waarbij een langere rotatie nodig was voor oudere IMS-kits.

2.5 Onderzoeksvragen

- Geven ColorSeeds een goede indicatie van opbrengst van natuurlijke protozoa in de praktijk? Daarbij zijn alle mechanismen van belang die een verschillende invloed op ColorSeeds en natuurlijke protozoa kunnen hebben.
- Wat is de opbrengst van alleen hemoflow, en van welke factoren is dat afhankelijk?
- Wat is de opbrengst van opwerking en analyse in het lab, en van welke factoren is dat afhankelijk?
- Heeft de hemoflow een negatief effect op de opbrengst van de opwerking en analyse in het lab door concentreren van stoffen en effect op protozoa?
- Kan de hoeveelheid pellet bij een monsternamen worden voorspeld? Daarmee kan optimaal monstervolume worden gekozen zodat geen ColorSeeds verloren gaan doordat meer dan 5 IMS nodig zijn.

2.6 Oplossingsrichtingen

Wanneer er meer inzicht is in de zaken die de opbrengst nadelig beïnvloeden, kunnen oplossingsrichtingen worden onderzocht. Experimenteel onderzoek naar oplossingsrichtingen was geen onderdeel van het onderzoeksplan, maar waar mogelijk zijn enkele opties wel geprobeerd/verkend.

- Monstervolume afhankelijk maken van hoeveelheid verwacht pellet; niet meer concentreren dan in 5 IMS kan worden verwerkt
- Meer dan 5 IMS analyses inzetten om al het pellet te kunnen onderzoeken; dit drijft kosten op
- Voorbehandeling voor hemoflow concentratie; verwijderen van storende elementen
- Andere concentratiemethode dan hemoflow
- PCR-analyse; is mogelijk gevoeliger, maar directe analyse geeft waarschijnlijk storing. IMS is dan nodig voor zuivering. Nadeel is dat niet infectieuze protozoa ook worden gemeten. *Giardia* kunnen een variërend aantal genkopiën per organisme bevatten, wat omrekening bemoeilijkt. Nuclisense is een methode die ook magnetisme gebruikt en heeft daarom mogelijk dezelfde nadelen. N.B. de huidige methode bepaalt alleen intacte organismen, maar bepaalt niet of ze infectieus zijn.
- een ander organisme zoals SSRC als opbrengst indicatorgebruiken

2.7 Opbrengst in de AMVD

Voor een nauwkeurige risicoschatting en het voorkomen van een onderschatting van het infectierisico is het van belang de opbrengst van monsternamen- en analysemethoden mee te nemen in de berekeningen. In de praktijk komt het voor dat slechts een klein deel of geen van de ColorSeeds wordt teruggevonden na analyse. In het Richtsnoer AMVD is de aanpak voor rekenen met opbrengst voorgeschreven (zie Bijlage 1 in ILT 2019). Dit geeft de volgende randvoorwaarden:

- Minimaal 10 getelde organismen voor de opbrengstbepaling in spike (onbehandeld monster) en recovered (na concentratie en analyse)
- Minimaal 1% opbrengst

Daarnaast speelt het benodigde monstervolume een rol in de AMVD:

Er wordt een zodanig monstervolume onderzocht dat de kans op het aantreffen van pathogenen voldoende hoog is om de variatie te kunnen bepalen (zie ook Appendix I). Dat betekent voor sommige locaties dat onderzoek van 10 liter water voldoende is, terwijl voor andere locaties onderzoek van 100 tot maximaal 1000 liter nodig is.

Het richtsnoer schrijft dus geen monstervolume voor. Het aantal te nemen monsters is ook niet voorgeschreven in het richtsnoer. In het richtsnoer is als doel beschreven om bij een meetprogramma minstens 8 positieve monsters te verkrijgen voor een betrouwbare schatting van de variatie van de concentratie (zie ook Hoofdstuk 5). Een groter monstervolume kan de meetgrens van de analyse verlagen, maar kan ook leiden tot een lagere opbrengst, of minder betrouwbare opbrengst bepaling, waardoor dit (deels) teniet wordt gedaan. Er zal een punt zijn waarop te veel monsters nodig zijn om 8 positieve monsters te verkrijgen. Het aantal monsters dat daarbij als ‘redelijk maximum’ kan worden beschouwd is niet bepaald. Een uitkomst van dit onderzoek zou kunnen zijn een schatting van de uitkomsten van een nieuw monsterprogramma, geoptimaliseerd voor opbrengst, als basis voor een keuze van het aantal monsters. Hierop wordt in Hoofdstuk 5 verder ingegaan.

2.8 Eerder onderzoek opbrengst hemoflow

In het verleden zijn meerdere onderzoeken uitgevoerd naar de opbrengst van de Hemoflow concentratie en de analysemethode van *Cryptosporidium* of *Giardia*. Hieronder worden deze kort samengevat.

In het bedrijfstakonderzoek (BTO) is de opbrengst van hemoflow-centrifugeren-IMS bepaald (Veenendaal en Brouwer-Hanzens 2007). Daarnaast wordt onder centricon genoemd “Voor de bepaling van *Cryptosporidium* en *Giardia* is het onderzochte volume van het filtraat direct op een membraanfilter gepipetteerd en vervolgens gekleurd m.b.v. immunofluorescentie”. Centricon was minder effectief dan centrifugeren en resultaten worden niet in deze memo genoemd. Voor de experimenten is een spike van gekochte protozoa (Waterborne Inc., VS) gebruikt. Bij dit onderzoek werden geen ColorSeeds gebruikt. Naast de protozoa werden wel ook bacteriën en fagen onderzocht. Relevante resultaten zijn samengevat in Tabel 2

Tabel 2 Samenvatting eerder onderzoek naar opbrengst van hemoflow concentratie en analyse (Veenendaal en Brouwer-Hanzens 2007)

Medium	Inzetvolume	Opbrengst (min-max)
Drinkwater:	1146 L	95%
WRK product:	600 L	85-100%
Leiduin voor/na O3:	600 L	75-98%
Lekkanaal:	50 L	35-94%
Div oppervlaktewater: ca	40 L	14-76%

Voor fagen zijn ook monstervolumes van 3000 en 7000 liter drinkwater onderzocht waarbij de opbrengst terugliep naar resp. 13% en 0,2%.

Warnecke et al. (2003) concludeerden dat de opbrengst van ColorSeeds 3-4% lager was dan van easyseed (ongekleurde (oö)cysten), dus beiden kwamen vrij goed overeen. Experimenten werden uitgevoerd met 10 liter monsters van ruw en gezuiverd water, gefiltreerd over Millipore en geconcentreerd met IMS. Recoveries varieerden respectievelijk van 58 tot 65% voor *Cryptosporidium* en 72-81% voor *Giardia*.

Francy et al. (2004) onderzochten de opbrengst van gedoseerde *Cryptosporidium* en ColorSeeds in oppervlaktewatermonsters van 10 liter. Voor beiden bedroeg de gemiddelde opbrengst circa 23,7% en de recoveries varieerden van 2% tot 61%. De opbrengst van *Cryptosporidium* in 30 monsters van 20 locaties kwam globaal overeen met die van ColorSeeds, maar was gemiddeld 10% hoger en kon per monster 20 procentpunt afwijken. De grootste afwijkingen bedroegen een factor 6,5 lagere respectievelijk 4,5 hogere opbrengst van *Cryptosporidium* dan van ColorSeeds. Hogere troebelheid en gesuspendeerde stof leidden tot lagere recoveries, met name bij >100 NTU of >100 mg/l TSS. In deze studie werd geen relatie gevonden tussen opbrengst en pH, geleidbaarheid, ijzer, silica of alkaliteit. Francy et al. noemen dat in meerdere studies invloed van troebelheid of gesuspendeerde stoffen is gevonden (Bukhari, et al. 1998, Campbell et al. 1994, Digorgio et al. 2002, Kuhn et al. 2002a, Simmons et al. 2001). Andere studies vonden wel een zwakke relatie met pH, geleidbaarheid of alkaliteit (Kuhn et al. 2002b). Ook noemen zij dat in andere studies invloed van ijzer en silica (USEPA 2003) is gevonden, maar alleen bij concentraties die doorgaans niet in oppervlaktewater voorkomen. Anderzijds werd in USEPA (2001) geen relatie tussen opbrengst en de watermatrix gevonden, inclusief voornoemde parameters.

Sammarro et al. (2021) onderzochten de opbrengst van *Cryptosporidium* en *Giardia* uit slib van oppervlaktewater-bezinking in laboratorium. Daarbij werden ook lage recoveries van 11 tot 35% voor *Giardia* en 2 tot 20% voor *Cryptosporidium* gevonden met behulp van ColorSeeds. De opbrengst van natuurlijke organismen en ColorSeeds is daarbij echter niet vergeleken. De auteurs noemen het verbeteren van opbrengst uit dergelijke complexe matrices als belangrijk vervolgonderzoek. In een literatuuronderzoek noemen Fradette et al. (2022) dat de opbrengst 'maar' 50% kan zijn (MDDELCC 2017), wat in het licht van voorliggend onderzoek juist hoog is. Centrifugerende zou 8 tot 14% verlies aan organismen veroorzaken. Concentreren met een Envirocheck™ capsule filter (Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA), een soortgelijk systeem als hemoflow, leidde tot 29 tot 34% verlies van organismen (Kim et al. 2006). Daarnaast zou IMS en labeling met monoclonal antibody met FITC kunnen leiden tot kruis-reacties met andere eukaryoten zoals algen, gisten, silicaten en celmateriaal (Rodgers et al. 1995, Kothavade et al. 2012). Bij microscopie moet dan onderscheid worden gemaakt tussen *Cryptosporidium* en andere organismen of materialen.

Biopoint, de producent van ColorSeed, heeft diverse informatie toegestuurd over ColorSeed:

- Validatie ColorSeed voor de opbrengst van natuurlijke *Cryptosporidium*
- Suggesties voor verbeteren opbrengst
- Gebruik van flowcytometrie kan de organismen beschadigen, leidend tot lage opbrengst. Dit geeft aan dat de ColorSeeds (en mogelijk ook natuurlijke protozoa) gevoelig zijn voor fysieke stress, bijvoorbeeld bij lang hemoflow proces
- Mogelijkheid om hogere aantallen ColorSeeds te leveren (1000 of 10.000)

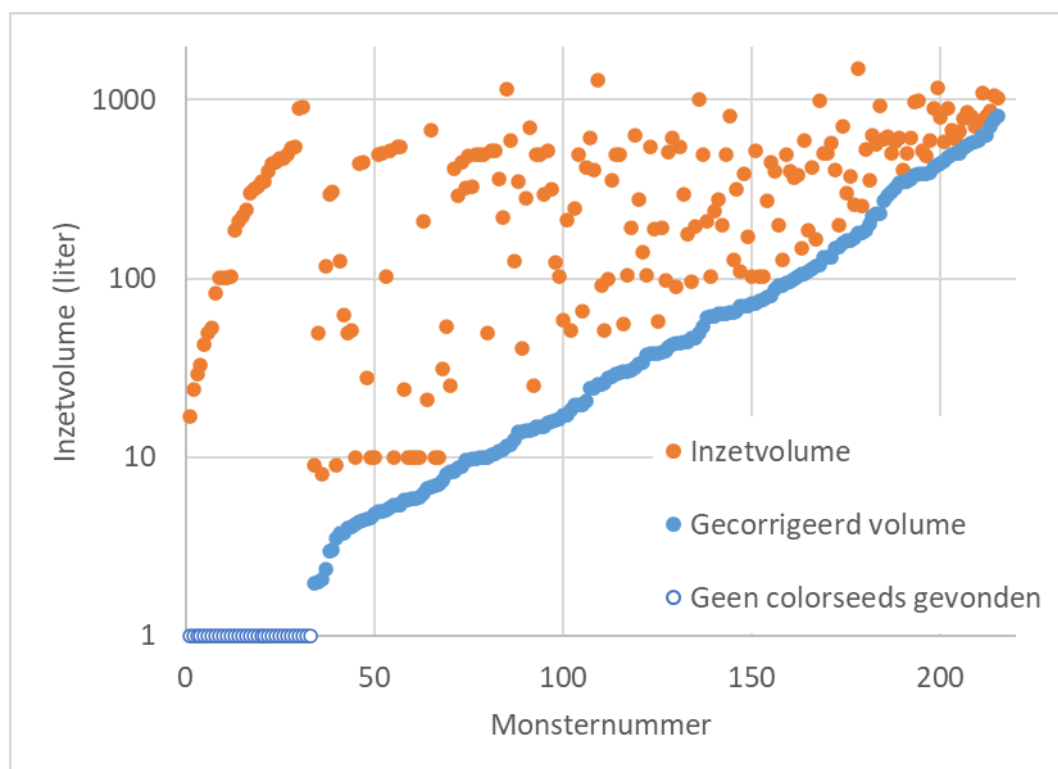
Biopoint geeft aan dat de validatie van ColorSeeds daarbij is uitgevoerd met drinkwater in volumes tot 10 liter. Onder deze condities blijkt de opbrengst van ColorSeeds goed overeen te komen met die van natuurlijke *Cryptosporidium*. De verschillende suggesties voor verbetering van de opbrengst zijn enkele malen uitgeprobeerd in het laboratorium, maar daarbij bleek de opbrengst niet beter te verlopen. Voor het onderzoek is overwogen een hogere dosering ColorSeeds toe te passen zodat ook een hogere spike van UV-geïnactiveerde *Cryptosporidium* mogelijk zou zijn. Daarmee zou de opbrengst nauwkeuriger kunnen worden bepaald, en ook de invloed van een achtergrondconcentratie minder zijn. Het bleek echter niet mogelijk om in de periode van het onderzoek grotere aantallen ColorSeeds te verkrijgen. Het aantal gedoseerde natuurlijke *Cryptosporidium* en *Giardia* is daarom ook op 100 gesteld, zodat beiden nauwkeurig konden worden geteld.

3 Analyse van historische meetgegevens

3.1 Historische opbrengst gegevens KWR

3.1.1 Invloed opbrengst op het effectief onderzochte monstervolume

De opbrengst wordt bepaald om getelde aantallen organismen hiervoor te corrigeren. Veel monster zijn echter negatief, wat zou resulteren in geen correctie voor opbrengst aangezien de telling 0 is. Daarom wordt het volume gecorrigeerd voor opbrengst, waarmee het effectief onderzochte volume wordt bepaald. Dit kan worden geïnterpreteerd als de detectiegrens van de analyse. Deze aanpak wordt ook in het Richtsnoer AMVD gehanteerd. In Figuur 4 is voor analyses waarbij opbrengst inclusief hemoflow concentratie is bepaald met oranje stippen het onderzochte volume weergegeven, en met blauwe stippen is het effectieve onderzochte volume weergegeven. De metingen zijn gerangschikt naar effectief volume.

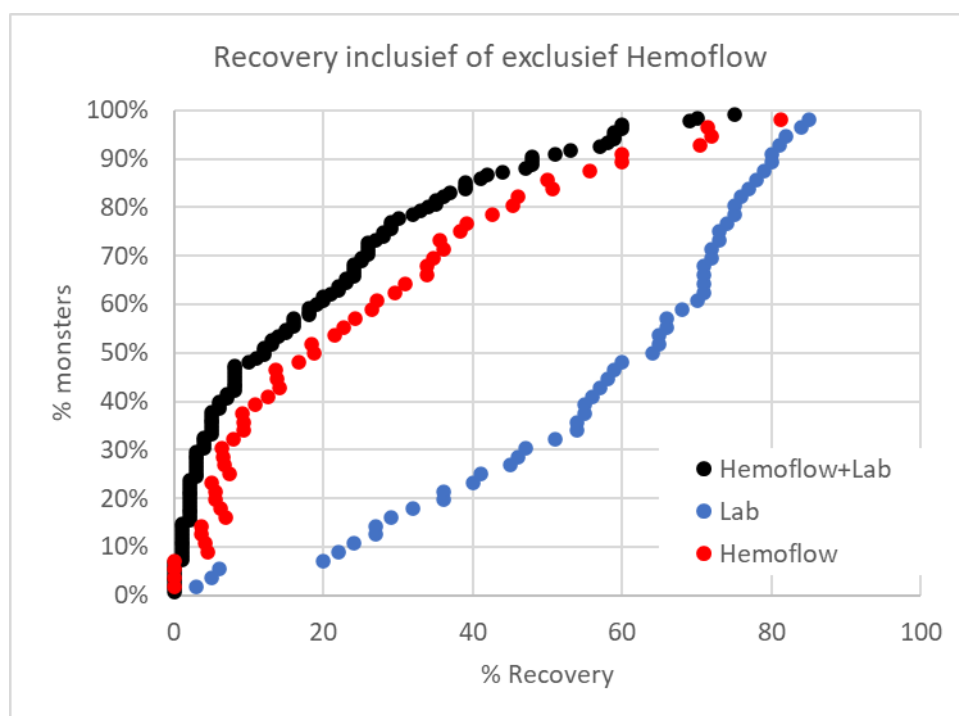


Figuur 4 Effect van opbrengst op het effectief onderzochte volume, waarbij opbrengst inclusief hemoflow is bepaald. Oranje is het inzetvolume, blauw het voor opbrengst gecorrigeerde volume.

Uit Figuur 4 blijkt dat de lage opbrengst er vaak voor zorgt dat zelfs bij een inzetvolume van 1000 liter het effectief onderzochte volume slechts 10 tot 100 liter bedraagt. Een groter monster- of inzetvolume leidt dus niet altijd tot een gevoeliger meting. Het concentreren van een groot volume betekent dat het monster een lange tijd door de hemoflow recirculeert, tot meer dan 10 uur. Dit kan een negatief effect hebben op de opbrengst. Op basis van deze bevindingen kan worden overwogen om niet meer dergelijke grote volumes te onderzoeken. Een kleiner volume met een hogere opbrengst leidt immers tot eenzelfde of groter effectief onderzocht volume en daarmee tot eenzelfde of lagere detectiegrens. Het bepalen van het optimale monstervolume is dan ook een deel van dit onderzoek, zie Hoofdstuk 3 en Hoofdstuk 4. In Hoofdstuk 5 wordt onderzocht wat de consequenties van een optimaal monstervolume voor de AMVD zouden zijn.

3.1.2 Opbrengst hemoflow concentratie versus opbrengst laboratoriumanalyse

Opbrengst van alleen de hemoflow stap is geschat vanuit de verdeling van opbrengst inclusief en exclusief hemoflow, met de aanname dat de totale opbrengst het product is van de hemoflow opbrengst en opbrengst van de opwerking en analyse in het laboratorium (lab-opbrengst). Het effect van hemoflow op organismen dat IMS en kleuring beïnvloed is daarbij ook onderdeel van de hemoflow opbrengst, aangezien de ColorSeeds bij lab-analyse dit niet ondergaan. De storende werking van geconcentreerd materiaal is onderdeel van de lab-opbrengst, aangezien dat materiaal ook aanwezig is wanneer ColorSeeds na hemoflow worden gedoseerd. Hierbij moet worden bedacht dat bij HWL alleen lab-opbrengst is uitgevoerd en bij KWR men van doseren voor hemoflow naar doseren na hemoflow is overgestapt. De dataset zonder hemoflow bevat daarom ook andere monsterlocaties dan de dataset inclusief hemoflow. Bovendien zijn de recoveries niet in dezelfde monsters bepaald, aangezien dit niet mogelijk is omdat maar één keer colorseeds gedoseerd kunnen worden. Om toch de hemoflow opbrengst te schatten wordt uitgegaan van de frequentieverdelingen van beide recoveries in beide datasets. Dit impliceert dat hoge recoveries inclusief hemoflow alleen worden bereikt wanneer de lab-opbrengst hoog is. De recoveries met/zonder hemoflow met dezelfde frequentie van voorkomen zijn in Figuur 5 met elkaar vergeleken en de theoretische opbrengst van alleen hemoflow is daaruit berekend (rode punten). In Figuur 5 is te zien dat de totale opbrengst (inclusief hemoflow) dicht bij de berekende hemoflow opbrengst ligt. De lab-opbrengst heeft blijkbaar beperkt invloed op de totale opbrengst van monster tot telling. Beide recoveries vertonen grote variatie. De hemoflow concentratie lijkt in 50% van de praktijkmonsters tot minder dan 20% opbrengst te leiden. In 20% van de gevallen lijkt de recovery groter dan 40% te zijn. De grootste winst lijkt daarom te behalen bij het verbeteren van de opbrengst van de hemoflow concentratiestap.

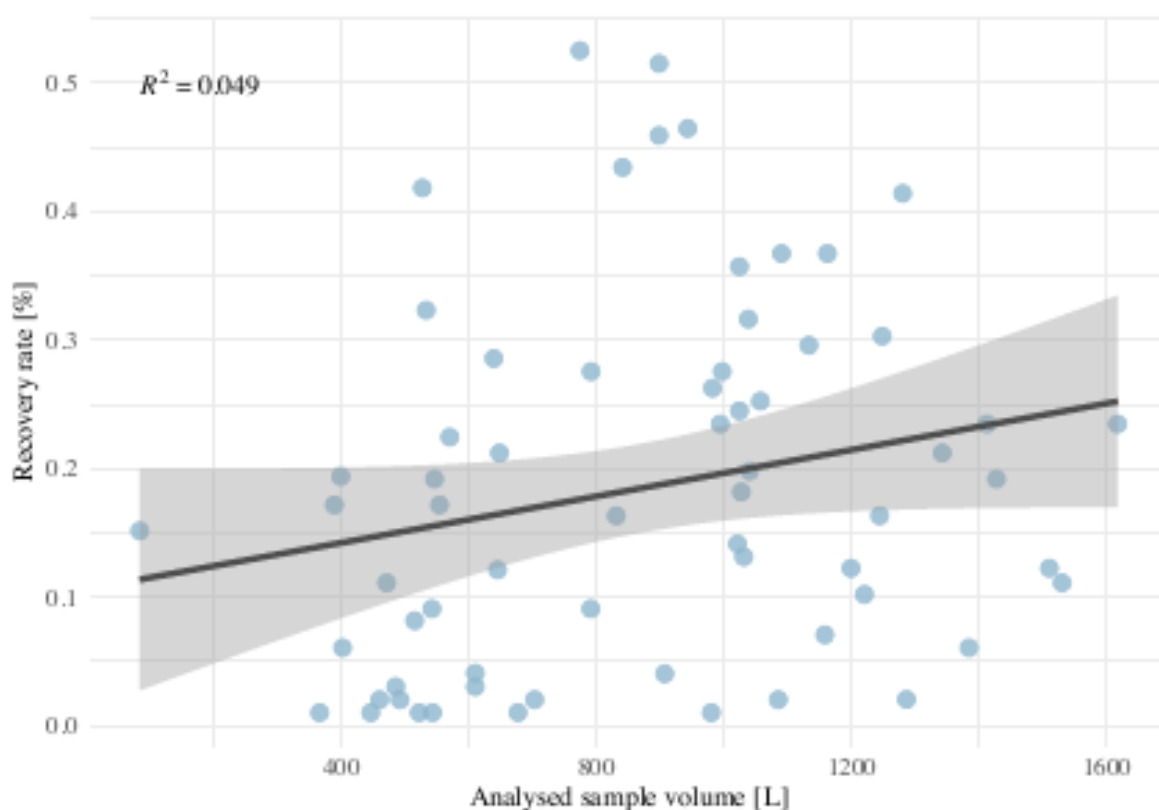


Figuur 5 Frequentie van voorkomen van recoveries met en zonder hemoflow concentratie en daaruit afgeleide opbrengst van alleen de hemoflow concentratie

3.1.3 Invloed monstervolume op opbrengst

Resultaten MSc thesis Julian Werner

Julian heeft voor zijn afstudeeronderzoek opbrengst gegevens van één drinkwaterbedrijf geanalyseerd, omdat de andere gegevens destijds nog niet beschikbaar waren. Daarnaast heeft hij gesimuleerd hoe een kleiner monstervolume met een hogere opbrengst de onzekerheid beïnvloedt. Uit eenvoudige data-analyse bleek geen significante correlatie tussen onderzocht volume en opbrengst (zie Figuur 6). Uit zijn simulaties bleek dat opbrengst meer dan evenredig moet toenemen bij kleiner monstervolume om de uiteindelijke onzekerheid in de AMVD te reduceren. Het afstudeerrapport (Werner, 2022) is gedeeld met de themagroep en wordt in het verdere onderzoek buiten beschouwing gelaten, omdat het verdere onderzoek is uitgevoerd met meer gegevens. Zie hiervoor onderstaand onderzoek naar historische data en de simulaties in Hoofdstuk 5.

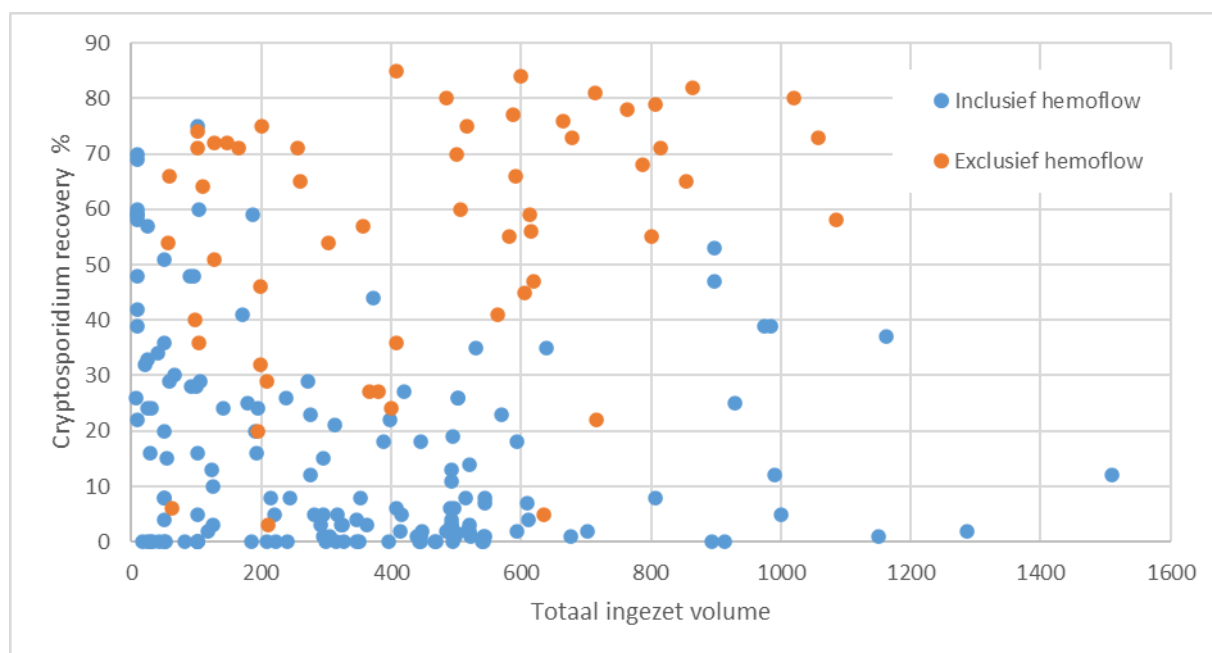


Figuur 6 Resultaten MSc onderzoek naar verband tussen monstervolume en opbrengst van *Cryptosporidium* ColorSeeds op basis van gegevens van 1 drinkwaterbedrijf.

Analyse historische data KWR

Het laboratorium van KWR beschikt over meer detailgegevens van de analyses die zij uitvoert. Daarom wordt naast de data-analyse van alle laboratoria de KWR-data ook apart gepresenteerd. In Figuur 7 zijn de recoveries van *Cryptosporidium* analyses uitgezet tegen het totale inzetvolume. Uit Figuur 7 blijkt voor zowel met als zonder hemoflow concentratie geen duidelijk verband te bestaan tussen monstervolume en opbrengst. Met hemoflow concentratie worden zowel bij kleine als grote monstervolumes lage recoveries gevonden, maar ook recoveries boven 20%. Wanneer ColorSeeds na hemoflow worden toegevoegd zijn de recoveries hoger. Daarbij valt op dat bij een volume groter dan 700 liter de opbrengst altijd hoger was dan 50%. Hierdoor lijkt er een onverwacht verband van een hogere opbrengst bij een groter monstervolume wanneer ColorSeeds na de hemoflow stap worden toegevoegd. Dit kan een artefact zijn van het feit dat van schoner water er ook grotere monstervolumes kunnen

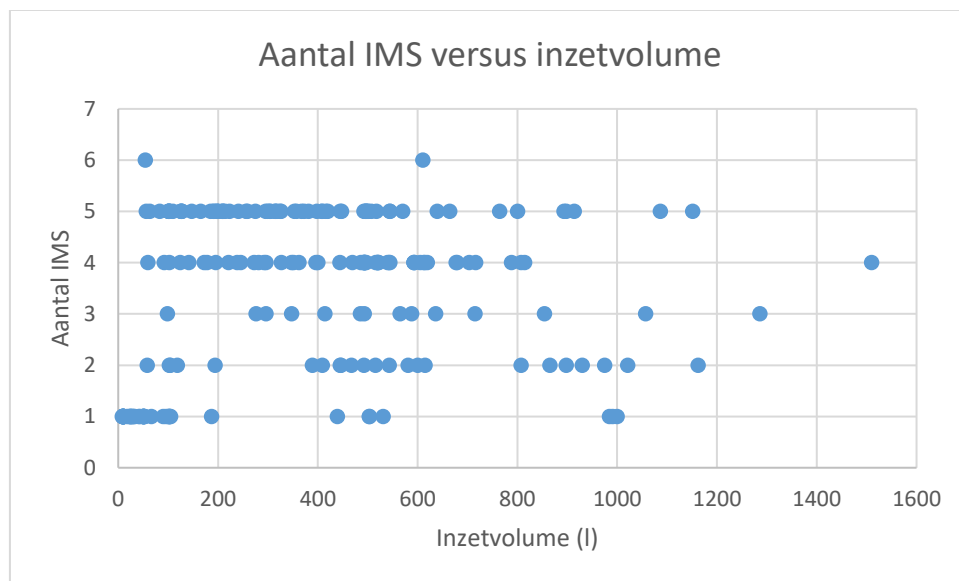
worden genomen, waardoor er minder storing van stoffen of deeltjes is dan in kleinere volumes van meer verontreinigd water.



Figuur 7 Opbrengst van Cryptosporidium analyse inclusief en exclusief hemoflow concentratie door KWR versus het oorspronkelijke monstervolume

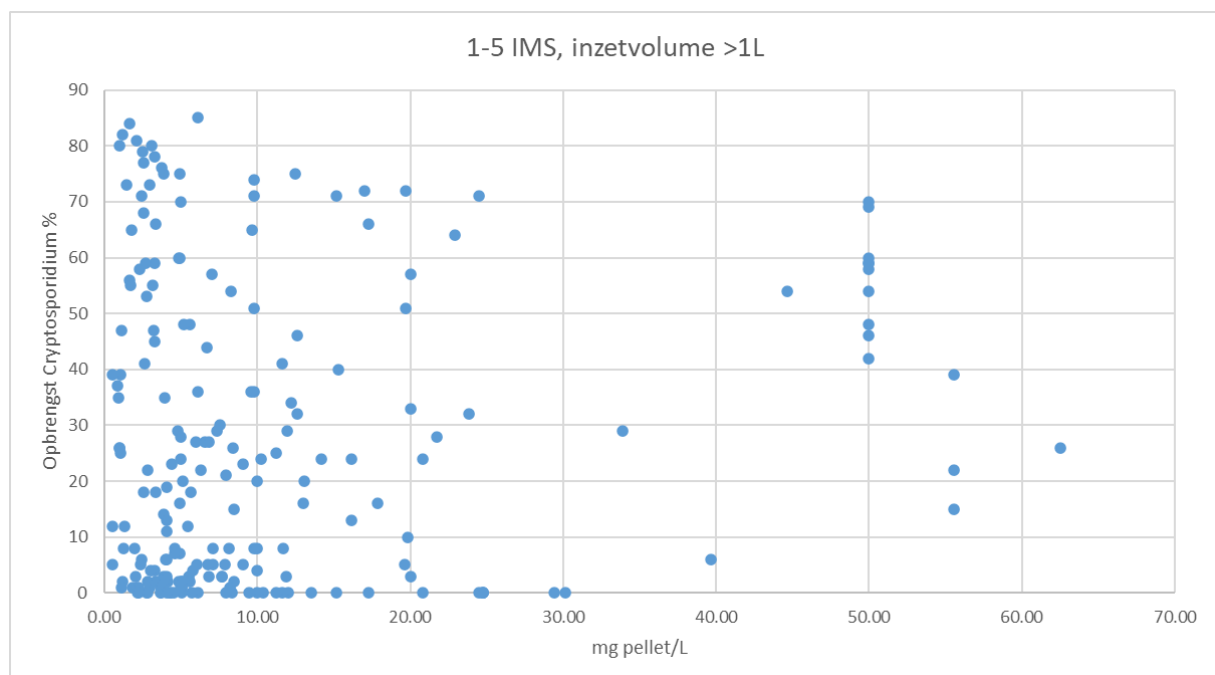
3.1.4 Invloed hoeveelheid pellet op opbrengst

Pellet is het materiaal dat na opwerking met hemoflow en centrifugeren in het monster aanwezig is. Dit materiaal beperkt verdere opwerking tot een kleiner volume. Per IMS kan maximaal 0,5 mg monster worden ingezet. Bij veel pellet zijn daarom meerdere IMS en microscopische analyses nodig, wat de kosten van de analyse opdrijft. Daarom heeft KWR afgesproken maximaal 5 IMS per monster uit te voeren. Het aantal IMS wordt geregistreerd, de hoeveelheid pellet niet. Hoe groter het monstervolume of hoe meer materiaal het oorspronkelijke monster bevat, hoe meer IMS worden verwacht. In Figuur 8 is het aantal IMS uitgezet tegen het inzetvolume. Hieruit blijkt geen duidelijke relatie tussen het inzetvolume en het aantal IMS. De concentratie materiaal in het monster lijkt bepalender te zijn voor het aantal benodigde IMS dan het totale monstervolume. Dit is van belang aangezien bij meer dan 5 benodigde IMS een deel van het opgewerkte materiaal niet wordt onderzocht en daarmee feitelijk een kleiner volume wordt onderzocht. Voor het bepalen van de opbrengst betekent dit dat de ondergrens hoger wordt dan 1% en dat deze minder nauwkeurig wordt. Men zou ernaar kunnen streven niet meer monster te nemen dan dat overeenkomt met 5 IMS. Op dit moment kan het aantal IMS echter niet voorspeld worden op basis van monstervolume (Figuur 8) of eigenschappen van het water zoals troebelheid, aangezien die niet zijn gemeten tijdens monsternamen.



Figuur 8 Het aantal ingezette IMS versus het inzetvolume bij het KWR laboratorium.

Daarnaast is onderzocht of er een verband is tussen de concentratie aan materiaal en de opbrengst. De hoeveelheid pellet is daarbij bepaald door het aantal IMS met 0,5 mg te vermenigvuldigen, aangezien de werkelijke hoeveelheid pellet niet wordt geregistreerd. De concentratie materiaal is berekend door het berekende pellet gewicht te delen door het inzetvolume. Resultaten zijn weergegeven in Figuur 9 voor inzetvolumes groter dan 1 liter. Er lijkt geen verband te zijn tussen de hoeveelheid materiaal in het monster en de opbrengst. Het materiaal zelf lijkt dus geen negatieve invloed te hebben op de opbrengst. De samenstelling van het materiaal, of de fysieke stress van de hemoflow methode blijven dan over als mogelijke verklaring voor de variaties in opbrengst van deze concentratiestap.



Figuur 9 Cryptosporidium opbrengst versus de hoeveelheid pellet per liter inzetvolume, exclusief inzetvolumes kleiner dan 1 liter

3.2 Historische opbrengstgegevens, waterkwaliteit alle laboratoria en weergegevens

3.2.1 Aanpak historische opbrengst gegevens

Historische gegevens over de opbrengst van *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn verzameld bij de drinkwaterlaboratoria Aqualab Zuid, HWL, WLN en KWR. KWR voert deze analyses onder andere voor Aqualab Zuid en WLN uit. Daarom zijn de gegevens hierover uit het laboratorium informatiesysteem (LIMS) van KWR verzameld. Ook zijn andere waterkwaliteitsparameters van dezelfde monsters of monsterlocaties op dezelfde dag of nabij liggende dagen bij de laboratoria opgevraagd. Daarnaast zijn weergegevens van de dichtstbijzijnde weerstations verzameld rond de data van de monsternames. Deze historische praktijkgegevens zijn op verschillende manieren geanalyseerd om meer inzicht te krijgen in de opbrengst en hoe deze wordt beïnvloed. Dit is in de volgende paragrafen uitgewerkt.

Resultaten van de analyses zijn weergegeven in boxplots of in X-Y grafieken waarin twee factoren worden vergeleken. In de boxplots bevindt 50% van de datapunten in het groene deel van de boxplot. De zwarte streep daarin is de mediaan. De rest van de data bevindt zich tussen de 'whiskers', behalve uitschieters welke aangegeven zijn door cirkels. De getallen boven de boxplot geven het aantal monsters aan. Bij de data-analyse is steeds onderscheid gemaakt tussen het doseren van ColorSeeds voor of na hemoflow concentratie. In X-Y grafieken zijn de data met dosering na hemoflow met rode cirkels aangegeven.

Naast de opbrengst gegevens zijn ook data over de waterkwaliteit opgevraagd bij de laboratoria. De data van Aqualab Zuid bevat geen aanvullende parameters naast parameters die zijn gebruikt voor de opbrengstbepaling in monsters waarvoor opbrengst is bepaald door KWR. Hierdoor is er vanuit AQZ geen geschikte dataset om de correlatie tussen waterkwaliteitsparameters en opbrengst te achterhalen. Daarmee kan deze correlatie niet worden onderzocht voor opbrengst inclusief hemoflow. De data van WLN bevat enkele aanvullende parameters, maar bevat weinig monsters waardoor geen significante correlatie kon worden bepaald. De HWL-data bevat veel soorten informatie voor monsters waar ook opbrengst is bepaald. Hierdoor is dit de meest geschikte dataset om een regressiemodel op te fitten. In alle resultaten zijn 'kleiner dan' resultaten beschouwd als gemeten waarde, waardoor componenten dan de waarde hebben van de rapportagegrens.

Omdat parameters kunnen verschillen tussen locaties, maar dit niet persé de oorzaak is voor een verschil in opbrengst, worden alleen de parameters die voor zowel *Giardia* als *Cryptosporidium* een licht-significant ($p < 0.1$) verband hebben in een lineaire regressie tussen de opbrengst en de parameter besproken. Sterke correlaties ($p < 0.05$) zijn niet gevonden. Naast de statistische regressie worden de verbanden ook visueel beoordeeld, wanneer bijvoorbeeld enkele uitschieters het verband bepalen wordt dit ter discussie gesteld.

In Bijlage 1 wordt de aanpak van de dataverwerking en -analyse verder toegelicht. Daarin is ook een volledige lijst van opgevraagde waterkwaliteitsparameters en weerparameters opgenomen. Met parameters waar gegevens voor zijn verkregen zijn regressieanalyses uitgevoerd. Dit betreft:

Waterkwaliteitsparameters

- Troebelheid
- Gesuspendeerde stof
- Zuurgraad (pH)
- EGV
- Anionen
- Kationen
- Temperatuur
- Corrosie-index
- Chloride
- Magnesium

- Mangaan
- Natrium
- Totaal fosfaat
- Sulfaat
- Kalium
- Koolstofdioxide
- Zuurstof
- Zuurstof-online
- Bacteriën van de coligroep (aantal kolonies)
- Bacteriën van de coligroep (aantal bevestigde kolonies)
- Cryptomonaden-pigment

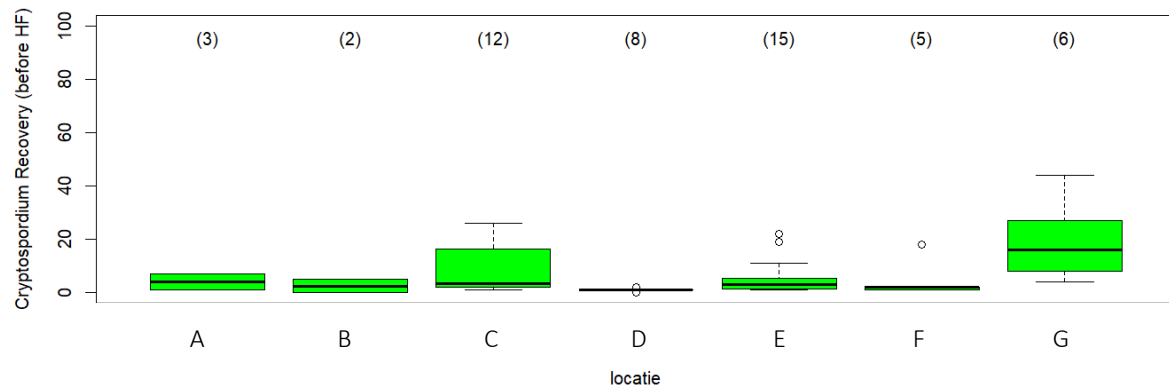
Weerparameters

- TG = Etmaalgemiddelde temperatuur (in 0.1 graden Celsius)
- TN = Minimumtemperatuur (in 0.1 graden Celsius)
- TX = Maximumtemperatuur (in 0.1 graden Celsius)
- TXH = Uurvak waarin TX is gemeten
- VVX = Maximum opgetreden zicht (m)
- UG = Etmaalgemiddelde relatieve vochtigheid (in procenten)
- UN = Minimale relatieve vochtigheid (in procenten)
- UNH = Uurvak waarin UN is gemeten
- Q = Globale straling (in J/cm²)
- EV24 = Referentiegewasverdamping (Makkink) (in 0.1 mm)
- FHN = Laagste uurgemiddelde windsnelheid (in 0.1 m/s)

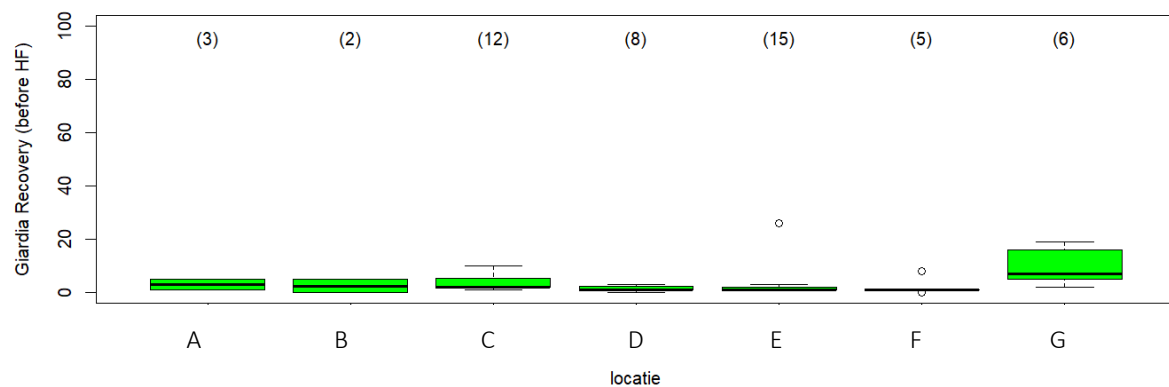
3.2.2 Invloed locatie of bron watermonster op opbrengst

De gegevens zijn per laboratorium en per monsterlocatie-code gegroepeerd om te bepalen of de opbrengst voor bepaalde locaties consequent hoger of lager is. In de figuren is ook onderscheid gemaakt naar de laboratoria, waarbij analyses voor Aqualab Zuid door KWR zijn uitgevoerd. Dat zijn deels monsters waarbij ColorSeeds voor de hemoflow concentratie zijn gedoseerd (Figuur 10 en Figuur 11), en deels na de hemoflow (Figuur 12 en Figuur 13). HWL heeft alleen ColorSeeds na hemoflow gedoseerd (Figuur 14 en Figuur 15).

Opbrengst van *Cryptosporidium* inclusief hemoflow (Figuur 10) is voor alle locaties in het onderzoek laag, doorgaans lager dan 10%. Op twee locaties worden hogere recoveries gevonden, waarbij dan ook meer variatie van opbrengst wordt waargenomen. Dit beeld komt overeen met de opbrengst van *Giardia* per locatie (Figuur 11), hoewel de hogere opbrengst slechts bij één van de twee voorgaande locaties wordt gevonden. Hieruit blijkt dat de opbrengst inclusief hemoflow per locatie wel kan verschillen, maar dat voor de meeste locaties deze zo laag is dat er geen duidelijk betere of slechtere locaties zijn.

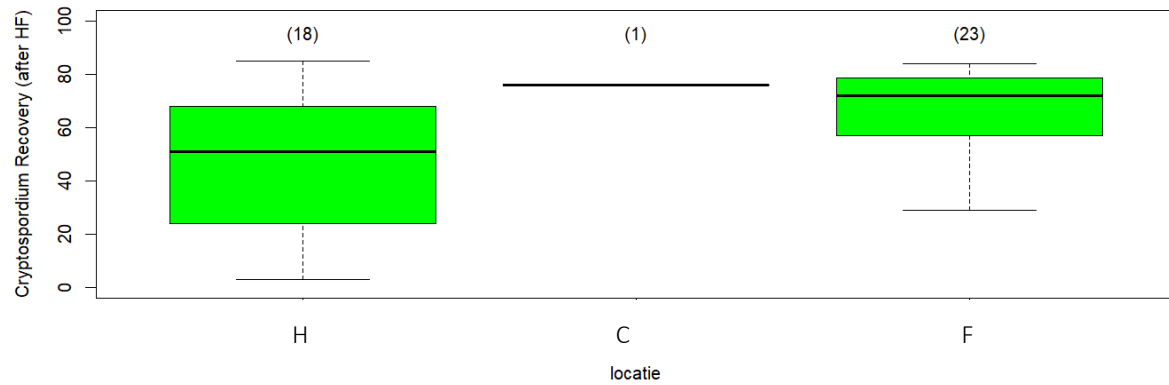


Figuur 10 Opbrengst van *Cryptosporidium* inclusief hemoflow op de verschillende monsterlocaties Aqualab Zuid (KWR)

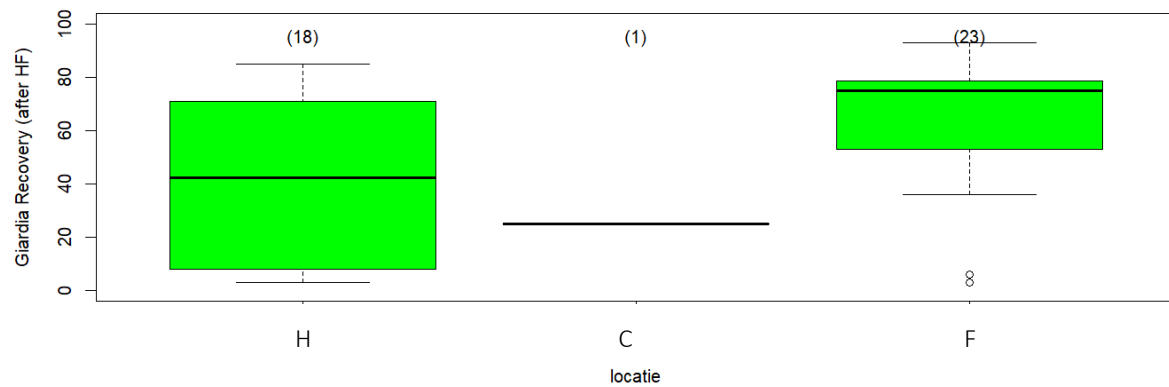


Figuur 11 Opbrengst van *Giardia* inclusief hemoflow op de verschillende monsterlocaties Aqualab Zuid (KWR)

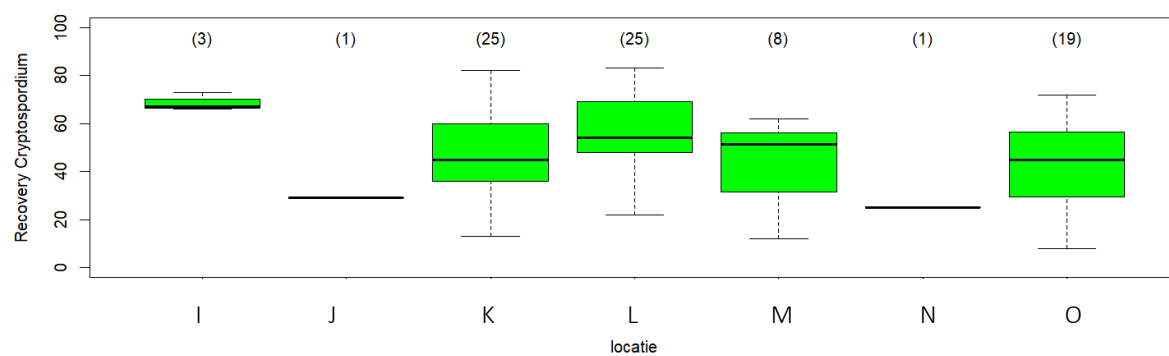
De opbrengst op het laboratorium, dus bij dosering van ColorSeeds aan het hemoflow concentraat, is duidelijk hoger voor alle locaties (Figuur 12, Figuur 13, Figuur 14 en Figuur 15). De locaties waar meer dan drie monsters zijn genomen laten allemaal tien procentpunt spreiding van de opbrengst zien op de locatie zelf. Hierbij is wel consistent verschil tussen monsterpunten zichtbaar. De meeste monsterpunten betreffen oppervlaktewater en een aantal water na zandfiltratie, maar dit lijkt niet bepalend voor de opbrengst. Daarbij moet worden bedacht dat mogelijk is besloten het snelfiltraat te bemonsteren wegens zeer lage opbrengst in ruwwater. Dit is echter niet uit de gegevens af te leiden.



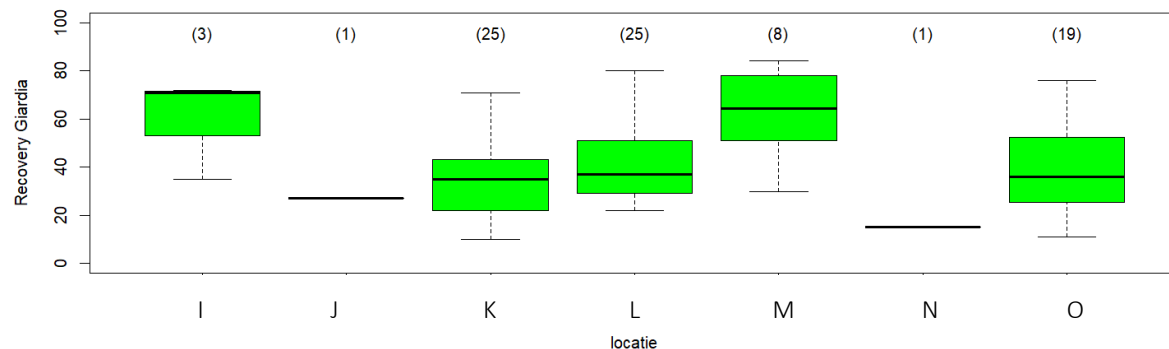
Figuur 12 Opbrengst van *Cryptosporidium* exclusief hemoflow op de verschillende monsterlocaties Aqualab Zuid (KWR)



Figuur 13 Opbrengst van *Giardia* exclusief hemoflow op de verschillende monsterlocaties Aqualab Zuid (KWR)

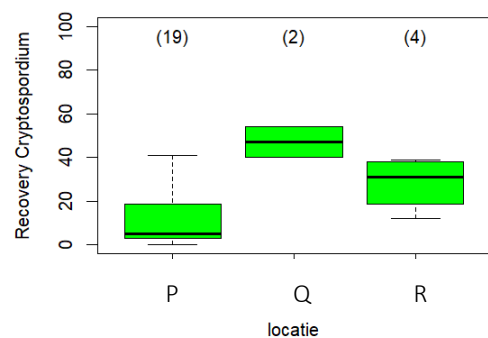


Figuur 14 Opbrengst van *Cryptosporidium* exclusief hemoflow op de verschillende monsterlocaties HWL

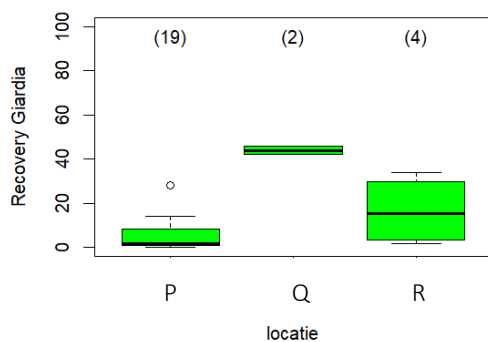


Figuur 15 Opbrengst van *Giardia* exclusief hemoflow op de verschillende monsterlocaties HWL

Voor de gegevens van WLN geldt dat de ColorSeeds voor hemoflow zijn toegevoegd. (Figuur 16 en Figuur 17). De monsters zijn allemaal afkomstig van één pompstation. De onbekende monsterlocaties betreffen, zover bekend, monsterpunten in de zuivering. Resultaten laten duidelijke verschillen zien in opbrengst voor de verschillende stadia van drinkwaterzuivering.



Figuur 16 Opbrengst van *Cryptosporidium* inclusief hemoflow op de verschillende monsterlocaties WLN (KWR)

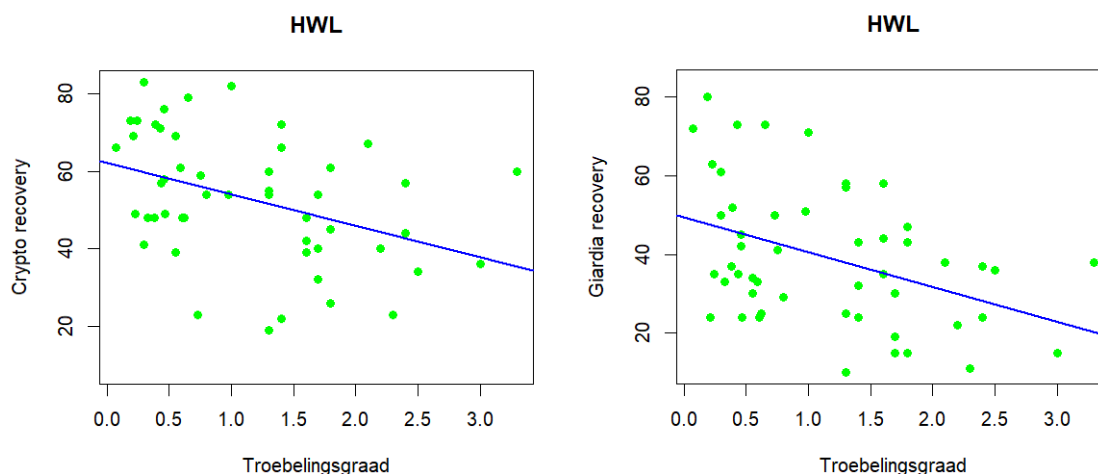


Figuur 17 Opbrengst van *Giardia* inclusief hemoflow op de verschillende monsterlocaties WLN (KWR)

3.2.3 Invloed waterkwaliteit op opbrengst

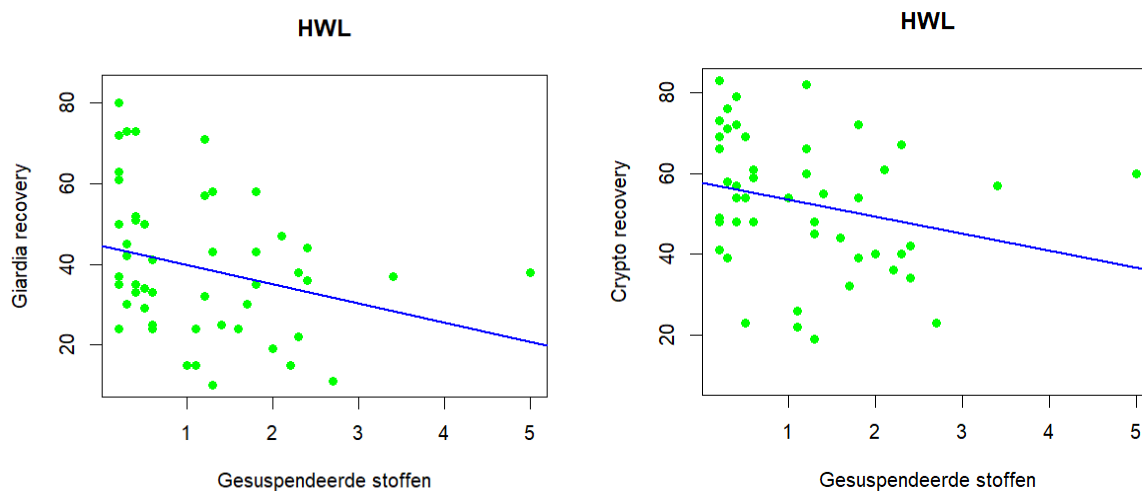
Door middel van lineaire regressie is onderzocht of er een verband is tussen gerapporteerde waterkwaliteitsparameters en de opbrengst per monster. Alle mogelijk relevante parameters zijn opgevraagd bij de laboratoria, echter slechts een beperkte hoeveelheid data was beschikbaar voor momenten (plusminus 2 dagen) waarop de monsters voor *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn genomen. In Bijlage 1 zijn alle grafieken opgenomen voor parameters waarvoor gegevens zijn verkregen. Hieronder worden alleen de parameters besproken waarvoor een mogelijk verband is gevonden.

De troebelingsgraad is een maat voor de hoeveelheid vaste stof in een monster, wat mogelijk invloed heeft op de opbrengst. In Figuur 18 is het verband weergegeven voor opbrengst exclusief hemoflow. Er lijkt een negatief verband te zijn tussen de troebelheidsgraad en de opbrengst van de laboratoriumanalyse. Dit komt overeen met de verwachting dat het isoleren van protozoa met IMS wordt verstoord door de aanwezigheid van materiaal in het water. Opvallend is dat de troebelingsgraad bij de HWL monsters lager is (<3 NTU) dan bij WLN (tot 7 NTU, zie Bijlage I), . De spreiding rond dit verband is vrij groot, waarmee het slechts een beperkte voorspeller is voor de opbrengst. Een aanbeveling zou kunnen zijn om alleen bij lage troebelheid (<2 NTU) een analyse uit te voeren, echter de concentratie pathogenen kan ook gecorreleerd zijn aan de troebelheid, omdat fecaal materiaal ook tot verhoogde troebelheid leidt. Daarmee zouden dus juist hoge pathogeenconcentraties systematisch kunnen worden gemist.



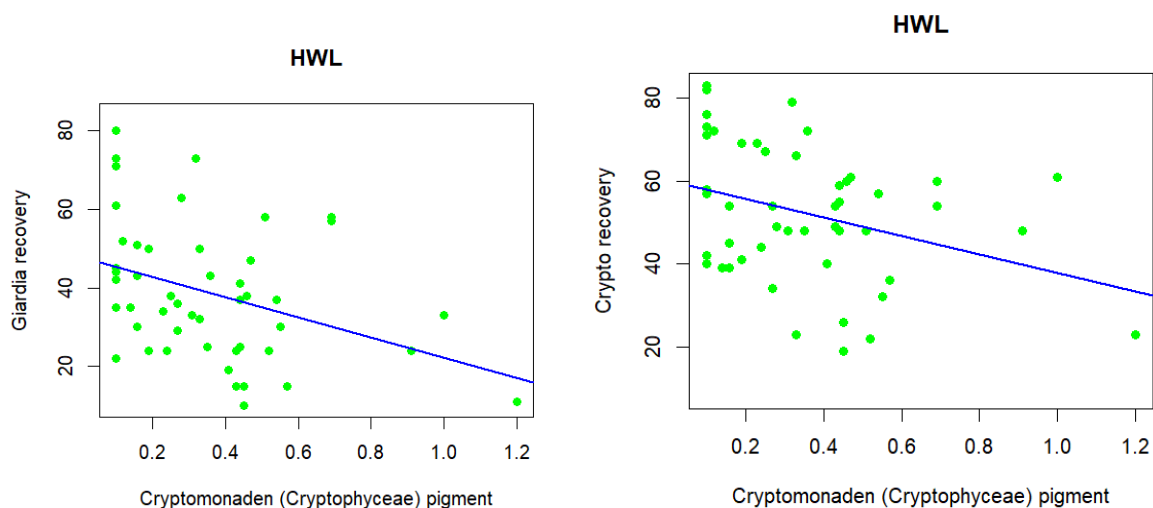
Figuur 18 Relatie tussen troebelheid (NTU) en opbrengst exclusief hemoflow per monster

Voor gesuspendeerde stoffen gelden dezelfde verwachtingen als bij troebelheid, aangezien troebelheid en gesuspendeerde stof een onderlinge correlatie wordt verwacht. In Figuur 19 is dit verband dan ook te zien. Hoewel gesuspendeerde stof in principe een nauwkeuriger maat is voor de hoeveelheid materiaal in een monster dan troebelheid, wordt er evenveel spreiding gevonden rond de correlatie. Daarmee is gesuspendeerde stof ook een beperkte voorspeller voor opbrengst en ook hier geldt dat alleen monsternamen bij lage gesuspendeerde stof gehalten kan leiden tot een onderschatting van de pathogeenconcentraties.



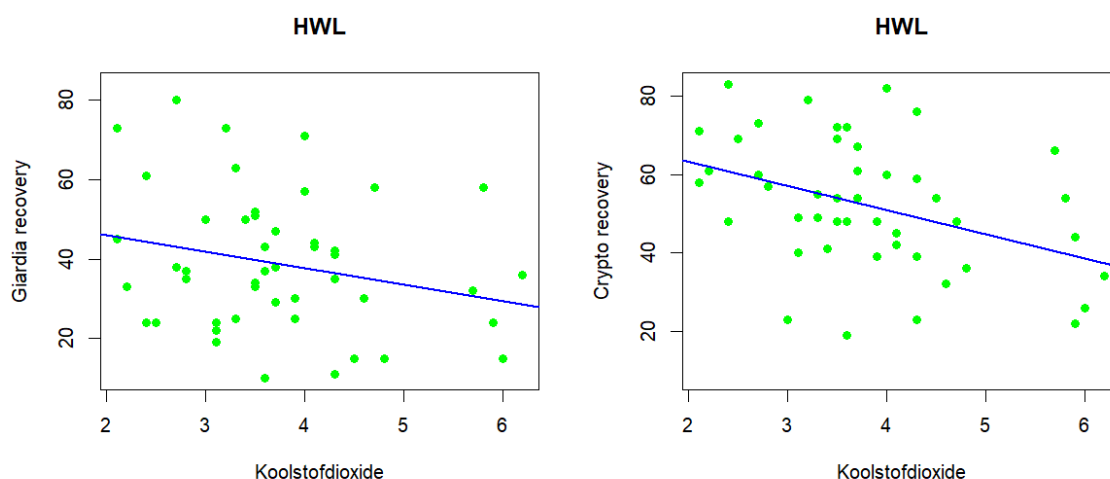
Figuur 19 Relatie tussen gesuspendeerde stoffen (mg/l) en opbrengst exclusief hemoflow per monster

Cryptomonaden zijn algen van circa 10 µm grootte en worden door de laboratoria bepaald als indicatie voor ecologische waterkwaliteit. Verwacht wordt dat algen een negatieve invloed kunnen hebben op de opbrengst doordat zij bijdragen aan de hoeveelheid materiaal in het monster, maar mogelijk ook doordat de organische stof andere negatieve effecten kan hebben bij IMS, kleuring en microscopie. Dit negatieve verband blijkt ook uit Figuur 20. Het is onbekend of Cryptomonaden verhoogd kunnen zijn bij aanwezigheid van fecaal materiaal, bijvoorbeeld in effluent of overstortend rioolwater. Analyse van Cryptomonaden lijkt geen praktische voorspeller voor opbrengst gezien de doorlooptijd van de analyse.



Figuur 20 Relatie tussen Cryptomonaden concentratie en opbrengst exclusief hemoflow per monster

Koolstofdioxide wordt ook regelmatig bepaald in watermonsters. Hoewel geen verband wordt verwacht met opbrengst, zou deze parameter gecorreleerd kunnen zijn met pH waarvan wel invloed op de opbrengst wordt verwacht. Uit de lineaire regressie volgt wel een verband met $p < 0,1$, maar uit Figuur 21 blijkt de variatie rond dit verband wel erg groot en lijkt het statistische verband een toevalligheid. Koolstofdioxide wordt daarom niet beschouwd als een relevante parameter.

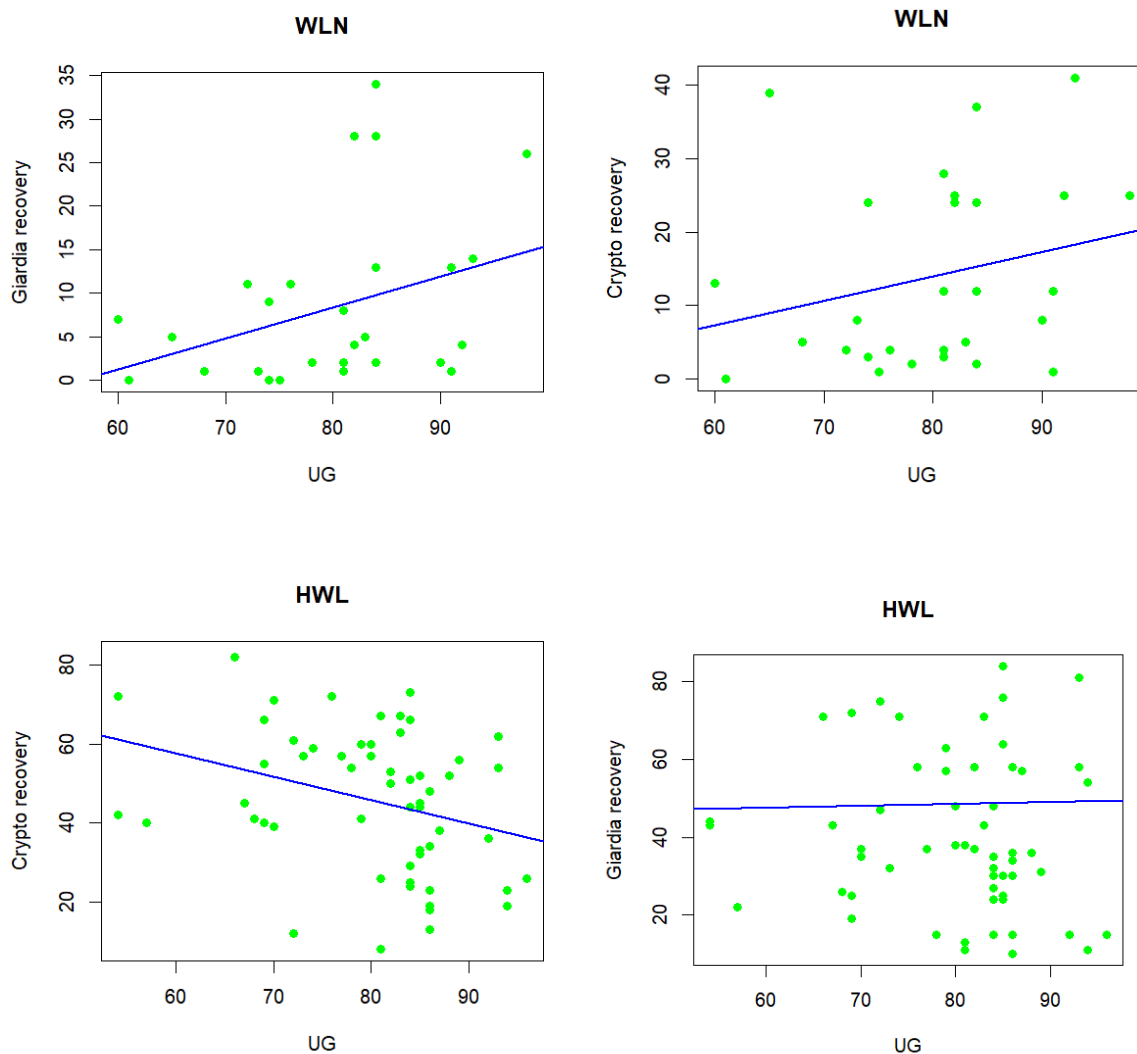


Figuur 21 Relatie tussen koolstofdioxide en opbrengst exclusief hemoflow per monster

3.2.4 Invloed weer op opbrengst

Het verband tussen weerparameters van het dichtstbijzijnde weerstation en de opbrengst op een monsterlocatie is onderzocht voor diverse parameters. In Bijlage 1 zijn alle onderzochte correlaties weergegeven. Hieronder worden alleen de resultaten besproken waarbij een lineair verband is aangetoond met $p < 0,1$.

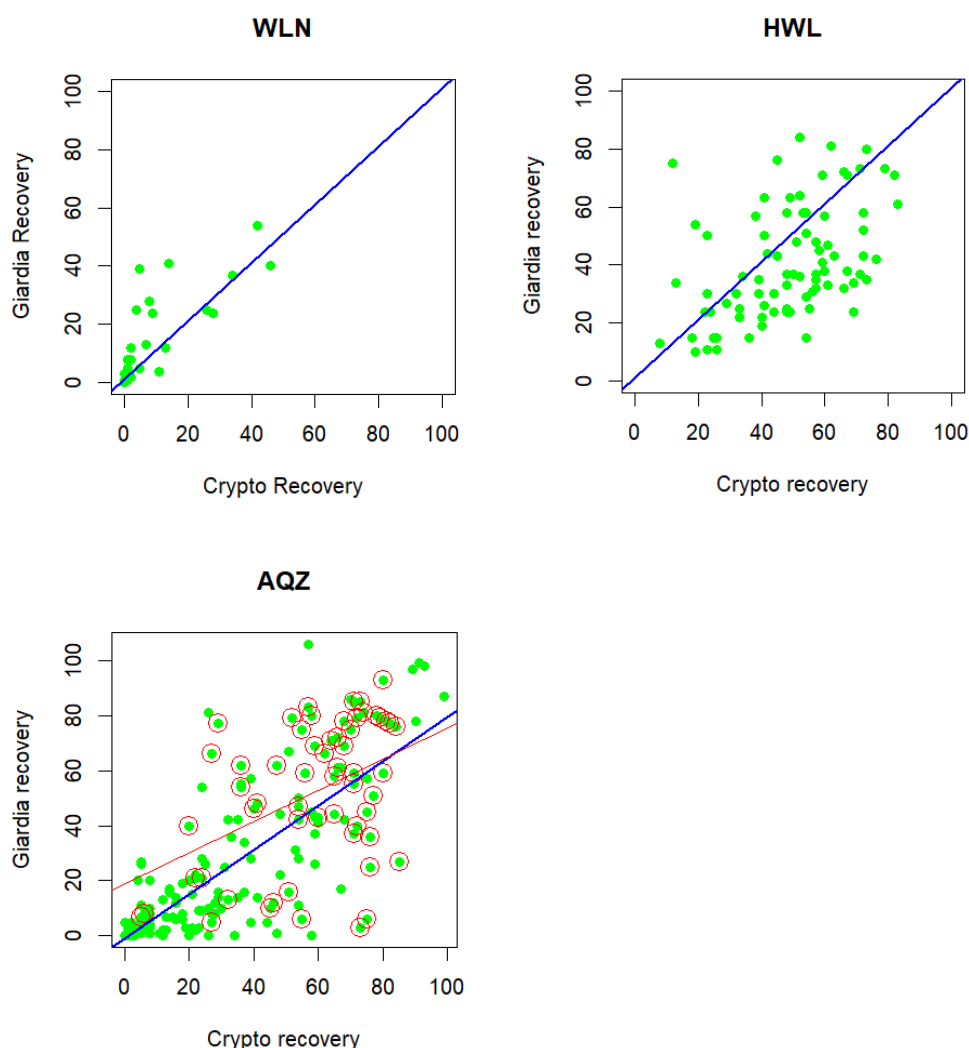
Alleen voor UG (Etmaalgemiddelde relatieve vochtigheid in procenten) is een verband gevonden met de opbrengst op het laboratorium. De UG is een resultante van de regenval in de voorgaande uren of dagen, temperatuur, wind en dergelijke. Er wordt geen direct verband verwacht tussen UG en opbrengst, aangezien de UG geen directe invloed heeft op de waterkwaliteit. De UG zou indirect een verband kunnen hebben vanwege de invloed van regenval op de waterkwaliteit de UG. Andere regen-gerelateerde parameters vertoonden echter geen verband met de opbrengst (Bijlage 1). Overigens is in een ander project een verband aangetoond tussen *E. coli* concentraties in kleine oppervlaktewateren en de UG, maar ook daar is geen oorzakelijk verband bepaald. Uit Figuur 22 volgt voor WLN een licht positief verband tussen beide parameters, maar vraag is of dit werkelijk een oorzakelijk verband is, gezien de grote spreiding rond het verband. Voor HWL wordt juist een negatief verband gevonden voor *Cryptosporidium* en geen verband voor *Giardia*. De gevonden verbanden lijken daarmee toeval.



Figuur 22 Relatie tussen UG (Etmaalgemiddelde relatieve vochtigheid in procenten) en opbrengst exclusief hemoflow per monster

3.2.5 Correlatie tussen *Cryptosporidium* en *Giardia* opbrengst

In de grafieken in Figuur 23 is de opbrengst van *Cryptosporidium* en *Giardia* in hetzelfde monster tegen elkaar uitgezet. Voor Aqualab Zuid is onderscheid gemaakt tussen opbrengst inclusief en exclusief (rood omcirkeld) hemoflow. Uit de grafieken blijkt een vrij sterke correlatie tussen beide recoveries, wat aangeeft dat dezelfde invloedsfactoren gelden voor beide organismen. Bij Aqualab Zuid lijkt de correlatie voor opbrengst exclusief hemoflow minder sterk, terwijl HWL hiervoor wel correlatie laat zien.



Figuur 23 Opbrengst van *Cryptosporidium* versus *Giardia* in hetzelfde monster voor WLN, HWL en Aqualab Zuid laboratoria. Rood omcirkelde punten zijn exclusief hemoflow voor Aqualab Zuid, HWL is exclusief hemoflow, WLN is onbekend.

3.2.6 Meervoudige regressie van historische gegevens

Waterkwaliteitsgegevens

Voor zowel de waterkwaliteitsparameters als de weerparameters is meervoudige regressies met opbrengst onderzocht. Voor het meervoudig regressiemodel zijn verschillende combinaties van parameters getest. Een meervoudige regressie met parameters 'Cryptomonaden (Cryptophyceae) pigment' en 'Troebelingsgraad' is een model dat voor zowel *Cryptosporidium* als *Giardia* significant is voor de HWL-data. Dit model verklaart voor *Giardia* 19% van de variatie. Voor *Cryptosporidium* is dit 16%. Deze twee factoren lieten individueel ook een correlatie zien met opbrengst. Deze factoren kunnen ook onderling gecorreleerd zijn, meer algen kunnen voor meer troebelheid zorgen. De negatieve correlatie is gevonden voor de analyse op het laboratorium, zonder hemoflow (HWL gegevens). Algen zouden op diverse manieren de opbrengst van centrifugatie, IMS en kleuring kunnen beïnvloeden, bijvoorbeeld door toename van de hoeveelheid pellet, het afdekken van antigenen voor de antilichamen op de metalen bolletjes, bemoeilijken van terugwinning van bolletjes door hechtende stoffen (kleverigheid) of afschermen van antigenen van (oö)cysten voor kleuring. Aanpassing van de laboratoriummethode om deze effecten te reduceren kan de totale opbrengst slechts beperkt verhogen, aangezien er meer verlies van opbrengst plaatsvindt tijdens de hemoflow stap. Op basis van de data voor opbrengst inclusief hemoflow is geen significant regressiemodel gevonden. Dit kan het gevolg zijn van de beperkte hoeveelheid data, waardoor onderzochte

factoren die wel invloed hebben geen regressie vertoonden. De bevindingen betekenen daarom niet dat onderzochte factoren zonder correlatie geen invloed hebben op de opbrengst.

Weerdata

Voor data van laboratoria WLN en HWL zijn weersdata (van het meest nabije KNMI-weerstation) gekoppeld aan de opbrengst, op datum. Uit de weerdata kwamen twee parameters die zowel in WLN- als in HWL-data geassocieerd was met opbrengst. UN (minimale relatieve vochtigheid in procenten) en UG (etmaalgemiddelde relatieve vochtigheid in procenten) lieten een verband zien. Echter, deze verbanden waren in de twee sets tegengesteld. Bovendien, in een meervoudige regressie waren deze niet significant voor zowel *Giardia* als *Cryptosporidium* in HWL-data en WLN-data. Op basis van de beschikbare gegevens lijkt het weer geen invloed te hebben op de opbrengst. Hoewel weerdata voor iedere monsternamen beschikbaar waren, is de hoeveelheid data toch beperkt en kan niet worden uitgesloten dat er weersinvloeden zijn. Ook kan de complexiteit van meerdere invloedsfactoren de invloed van weer verdoezelen.

3.3 Conclusies analyse historische data

3.3.1 Beperkingen in het onderzoek van historische gegevens

- Drinkwaterbedrijven voeren de monitoring van *Cryptosporidium* en *Giardia* uit in het kader van de AMVD, niet voor onderzoek. Het bijeenbrengen van alle relevante gegevens van de verschillende laboratoria werd daardoor tijdrovend en ook het koppelen van gegevens per monsternamen (locatie, datum) werd hierdoor bemoeilijkt. Drinkwaterbedrijven kunnen overwegen om monitoringsprogramma's aan te passen door gelijktijdig meerdere parameters te bepalen zodat op lange termijn deze gegevens kunnen worden gebruikt voor onderzoek. Met name voor kostbare parameters zoals protozoa en virussen, maar mogelijk ook andere parameters, inclusief chemische. Ook de registratie kan worden aangepast om gegevenskoppeling en -analyse te vereenvoudigen.
- De historische gegevens bevatten weinig data over de watermatrix op het moment van monsternamen voor protozoa-analyse. Gegevens van enkele dagen voor of na de monsternamen zijn daarom opgenomen in de gegevensanalyse. De waterkwaliteit kan echter sterk variëren over periodes van uren of dagen, waardoor correlaties mogelijk niet zichtbaar worden. Het beperkte aantal gegevens over de watermatrix beperkt ook de sterkte van eventuele aangetoonde correlaties.
- De twee laboratoria die protozoa-analyses uitvoeren hanteerden in eerste instantie verschillende bepalingen van de opbrengst, KWR doseerde ColorSeeds voor hemoflow, HWL erna. Het aantal gegevens inclusief hemoflow is daarom beperkt. Daarnaast is het mogelijk dat details van de werkwijze op het laboratorium verschillen tussen beide laboratoria of zelfs tussen analisten per laboratorium. Dit kan ook de opbrengst per monster beïnvloeden. Ook de werkwijze tijdens monsternamen kan verschillen tussen laboratoria, monsternemers of locaties, bijvoorbeeld direct hemoflow op het monster of het vullen van een monstertank en vervolgens hemoflow. De invloed van dergelijke verschillen kon niet worden onderzocht door gebrek aan gegevens hierover.
- De opbrengst van ColorSeeds is onderzocht op basis van de historische gegevens. In Hoofdstuk 4 wordt onderzocht in hoeverre deze overeenkomt met de opbrengst van 'natuurlijke' protozoa.
- In alle resultaten zijn 'kleiner dan' resultaten beschouwd als gemeten waarde, waardoor componenten dan de waarde hebben van de rapportagegrens.

3.3.2 Bevindingen uit analyse van historische gegevens

- Uit de totale dataset kan worden afgeleid dat de opbrengst van concentratie met hemoflow aanzienlijk lager is dan de opbrengst van opwerking en analyse op het laboratorium. In circa 40% van de monsters is

de opbrengst van hemoflow kleiner dan 10%. Exclusief hemoflow is dit voor 5% van de monsters het geval. Voor de AMVD is het van belang dat beide recoveries worden meegenomen in het bepalen van de pathogeenconcentraties in de bron. Op dit moment wordt alleen de opbrengst zonder hemoflow meegenomen in de AMVD, wat theoretisch in 40% van de metingen leidt tot meer dan 1 log onderschatting van de concentratie en daarmee potentieel ook het risico. Een verbetering van de opbrengst van hemoflow zal daarom het meeste effect hebben op de nauwkeurigheid van de risicoanalyse in de AMVD.

- Uit eerder onderzoek (Tabel 2 in Paragraaf 2.8) blijkt dat opbrengst van grote volumes deels gezuiverd water of drinkwater tot 1000 liter hoog is, groter dan 75%. Voor oppervlaktewater werden lagere recoveries gevonden bij volumes van 40-50 liter. Uit de historische gegevens blijkt geen sterk verband tussen monstervolume en opbrengst. Volumes kleiner dan 10 liter vertonen weliswaar vaker een hogere opbrengst, maar bij grotere volumes lijkt er geen invloed op de opbrengst inclusief hemoflow. Er wordt wel een correlatie wordt verwacht, omdat ColorSeeds langer aan stressfactoren worden blootgesteld en er meer materiaal wordt geconcentreerd. Dit verband wordt mogelijk gemaskeerd door verschillen in bron en waterkwaliteit.
- De opbrengst exclusief hemoflow lijkt een positief verband te vertonen met monstervolume, omdat lage recoveries <50% niet zijn gevonden bij volumes groter dan 500 liter. Dit is een onverwacht verband aangezien bij grotere volumes doorgaans meer materiaal wordt geconcentreerd. Het is mogelijk dat het monstervolume wordt beïnvloed door de waterkwaliteit, bijvoorbeeld door oplopende membraandruk door geconcentreerd materiaal. Bij meer materiaal in de bron wordt dan een kleiner volume genomen, terwijl bij zeer grote volumes de hoeveelheid materiaal in het concentraat kleiner is. De waargenomen positieve correlatie wordt daarom gezien als een artefact van deze werkwijze.
- De hoeveelheid pellet en daarmee het aantal IMS lijkt geen verband te hebben met het inzetvolume,. Het beperken van het monstervolume, en daarmee inzetvolume, vanwege oplopende transmembraandruk kan een verklaring vormen voor het ontbreken van dit verband.
- De hoeveelheid pellet of het aantal IMS lijkt geen verband te houden met de opbrengst.
- De opbrengst van *Cryptosporidium* en *Giardia* per monster vertoont correlatie. Dit suggereert dat dezelfde factoren de opbrengst van beide organismen beïnvloeden.
- De opbrengst inclusief hemoflow van *Cryptosporidium* is op twee locaties duidelijk hoger dan bij andere locaties, en van *Giardia* bij één locatie hoger. De opbrengst bij de overige locaties is zo laag dat geen duidelijk verschil waarneembaar is.
- De opbrengst exclusief hemoflow laat duidelijke verschillen zien per monsterlocatie. Vermoed wordt dat verschillen in waterkwaliteit per locatie leiden tot verschillen in opbrengst tijdens de opwerking en analyse in het laboratorium. Door het beperkte aantal waterkwaliteitsgegevens kon dit echter niet worden bevestigd.
- Troebelheid en Cryptomonaden pigment (algensoort) lijken een negatieve invloed te hebben op de opbrengst exclusief hemoflow. Dit volgt zowel uit analyse van individuele correlaties als uit een multi-regressie model. Beide parameters kunnen ook onderling gecorreleerd zijn, aangezien algen ook kunnen leiden tot verhoogde troebelheid. De aanwezigheid van meer materiaal leidt tot meer pellet, waardoor mogelijk maar een deel van het monster kan worden onderzocht. Meer materiaal kan ook de opwerking en analyse op het lab storen, waarbij algen tot storing kunnen leiden, bijvoorbeeld bij IMS. Dit biedt mogelijk aanknopingspunten voor het verbeteren van de laboratoriumanalyse. Mogelijk kan ook de

monsternamen worden aangepast om het gehalte algen te reduceren, waarbij dit geen invloed mag hebben op de protozoa in het monster.

- Koolstofdioxide vertoonde wel een statistisch verband met opbrengst met $p < 0,1$, maar visuele evaluatie laat een grote spreiding rond dit verband zien. Daarom wordt dit niet als een werkelijk verband beschouwd.
- Er werden geen correlaties gevonden met weerparameters. Luchtvochtigheid vertoonde zowel een negatieve als een positieve zwakke correlatie met opbrengst, afhankelijk van het laboratorium. Dit wordt beschouwd als een artefact van de data.

4 Experimenten opbrengst

4.1 Doelen experimenten opbrengst

Experimenten onder geconditioneerde omstandigheden zijn uitgevoerd om een aantal aspecten rond opbrengst van protozoa te onderzoeken. De volgende vragen waren leidend bij de opzet van het onderzoek:

- Geven ColorSeeds een goede indicatie van opbrengst van natuurlijke *Cryptosporidium* en *Giardia* in de praktijk? Daarbij zijn alle mechanismen van belang die een verschillende invloed op ColorSeeds en natuurlijke protozoa kunnen hebben.
- Wat is de opbrengst van alleen hemoflow, en van welke factoren is dat afhankelijk?
- Wat is de opbrengst van opwerking en analyse in het lab, en van welke factoren is dat afhankelijk?
- Heeft de hemoflow een negatief effect op de opbrengst van de opwerking en analyse in het lab?
- Kan de hoeveelheid pellet bij een monsternamen worden voorspeld zodat geen ColorSeeds verloren gaan?
- Wat is een optimaal monstervolume voor de opbrengst inclusief hemoflow om een zo laag mogelijke meetgrens te bereiken?
- Worden alle ColorSeeds ook groen gekleurd tijdens kleuringstap?
- Verliezen ColorSeeds de rode kleuring door de opwerkingsstappen?
- Kan opbrengst van laboratorium opwerking en analyse worden verbeterd?

4.2 Uitgevoerde experimenten opbrengst

KWR heeft experimenten uitgevoerd om bovenstaande vragen te beantwoorden. Hiervoor is Lekwater bemonsterd in verschillende volumes en op verschillende dagen. *Cryptosporidium* en *Giardia* stocks werden verkregen via Waterborne Inc. Hieruit werden verdunningen gemaakt en protozoa werden vervolgens geïnactiveerd met UV-licht. De geïnactiveerde protozoa werden bij de start van de monsterconcentratie gedoseerd aan het hemoflow recirculatievat in zodanige hoeveelheid dat circa 100 (oö)cysten aanwezig waren in het oorspronkelijke monster, de spike. Voor experimenten exclusief hemoflow werden de organismen in het hemoflow-concentraat gedoseerd. Eenzelfde hoeveelheid spike werd per experiment driemaal onderzocht om de gedoseerde aantallen te bepalen. Het gemiddelde aantal van alle spikes in alle experimenten is gebruikt om de opbrengst van UV-geïnactiveerde protozoa te bepalen. ColorSeeds werden gelijktijdig met de spike op hetzelfde punt toegevoegd in aantallen van 100, zoals gebruikelijk bij metingen van protozoa in de praktijk. De monsters werden geconcentreerd volgens de normale procedures, waarbij al het pellet is onderzocht op aantallen UV-geïnactiveerde protozoa en ColorSeeds. Eventueel in het Lekmonster aanwezige protozoa zijn daarbij geteld als UV-geïnactiveerde protozoa, aangezien bij de analyse geen onderscheid kan worden gemaakt tussen natuurlijke en UV-geïnactiveerde organismen.

Tabel 3 Data en inzetvolumes experimenten inclusief hemoflow opbrengst

Datum	Volume (l)	
	bemonsterd	ingezet
17-4-2023	64	64
2-5-2023	56	56
8-6-2023	63	63
18-7-2023	200	191
2-8-2023	200	197
23-8-2023	200	198
14-11-2023	991	980
28-11-2023	400	204
28-11-2023	393	199
30-11-2023	1000	98

Tabel 4 Data en inzetvolumes experimenten exclusief hemoflow opbrengst

Datum	Volume (l)	
	bemonsterd	ingezet
17-4-2023	64	64
2-5-2023	56	56
8-6-2023	64	64
18-7-2023	200	193
2-8-2023	200	197
23-8-2023	200	197
8-11-2023	847	527

Daarnaast is er tijdens de onderzoeksperiode aandacht geweest voor protozoa-analyses in de praktijk die door de drinkwaterbedrijven in het kader van de AMVD werden genomen. Dit betrof:

- Drinkwaterbedrijven en laboratoria werd verzocht om op het moment van monsternamen aanvullende waterkwaliteitsparameters te bepalen zoals troebelheid, zwevende stof en pH.
- Op deelmonsters van het pellet zijn analyseprocedures voor IMS aangepast volgens aanbevelingen van de leverancier

4.3 Resultaten experimenten opbrengst

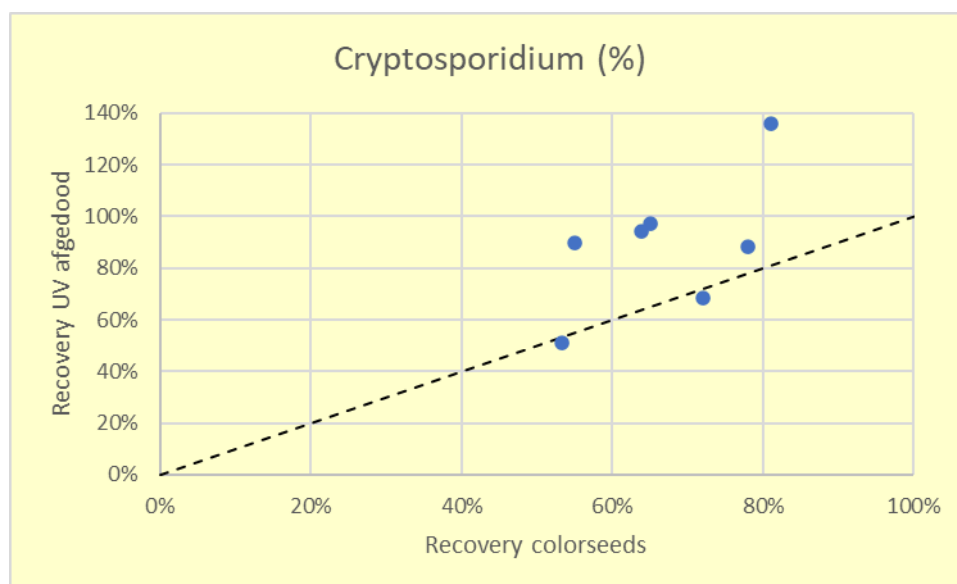
4.3.1 Relatie ColorSeeds en UV afgedode protozoa laboratoriumanalyse (exclusief hemoflow)

Gelijktijdig zijn aan een hemoflow geconcentreerd monster met Lekwater zowel UV afgedode als ColorSeed *Cryptosporidium* en *Giardia* toegevoegd en zijn de stappen voor laboratoriumanalyse doorlopen. Hiermee wordt onderzocht of de opbrengst van ColorSeeds representatief is voor de opbrengst van de pathogenen die geen

‘ColorSeed’ behandeling hebben ondergaan. Het Lekwater kan echter ook reeds *Cryptosporidium* en/of *Giardia* bevatten, een zogenaamde ‘achtergrondconcentratie’. Deze kunnen bij de analyse niet worden onderscheiden van de UV afgedode organismen, wat de interpretatie in de volgende paragrafen bemoeilijkt. Grafieken voor experimenten met ColorSeeds zijn geel gekleurd, om ze duidelijk te onderscheiden van grafieken inclusief hemoflow.

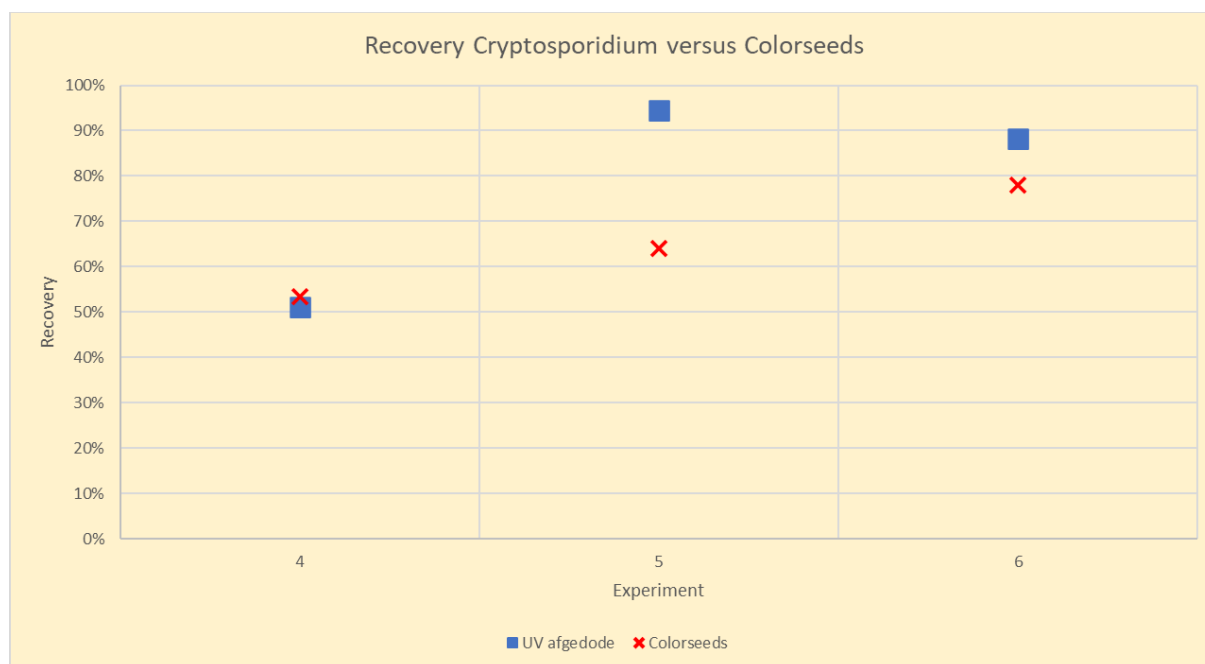
Cryptosporidium

Voor *Cryptosporidium* is in Figuur 24 de relatie tussen de opbrengst van UV af gedode *Cryptosporidium* en de ColorSeeds weergegeven. Daarbij valt op dat de opbrengst voor beiden hoog is (>50%) en een meting resulteert in meer dan 100% opbrengst van UV afgedode *Cryptosporidium*. Dit is mogelijk veroorzaakt doordat er in het Lekwater al *Cryptosporidium* aanwezig was. Voor 5 van de 7 metingen geldt dat de opbrengst van UV afgedode *Cryptosporidium* hoger is dan van ColorSeeds, de andere twee metingen komen goed overeen. Indien het Lekwater al *Cryptosporidium* bevatte, zou de werkelijke opbrengst van UV afgedode *Cryptosporidium* lager zijn, wat de afwijking tussen ColorSeeds en UV afgedode *Cryptosporidium* zou kunnen verklaren.



Figuur 24 Opbrengst van laboratoriumanalyse van UV afgedode *Cryptosporidium* versus ColorSeeds

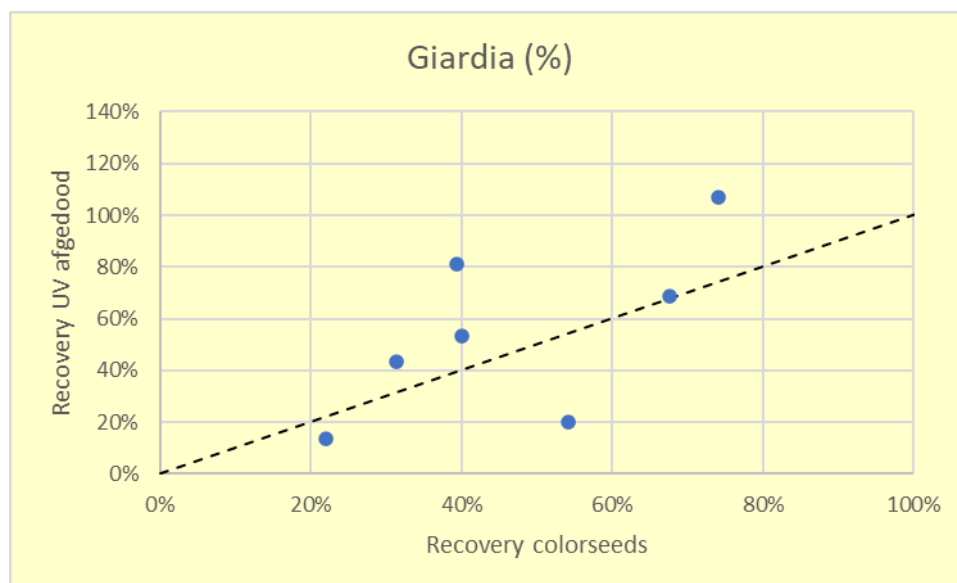
Aangezien er geen onderscheid kan worden gemaakt tussen UV afgedode *Cryptosporidium* en de reeds in het Lekwater aanwezige *Cryptosporidium* kan de opbrengst van UV afgedode *Cryptosporidium* worden overschat. Zeker bij grote volumes van meer dan 100 liter zouden meer natuurlijke dan UV afgedode oöcysten in het monster aanwezig kunnen zijn. Bij experimenten 4, 5 en 6 is de werkelijke achtergrondconcentratie in Lekwater bepaald en is daarvoor gecorrigeerd. Beide recoveries kunnen voor deze experimenten direct worden vergeleken. Bij experiment 4 en 6 komen beide recoveries vrijwel overeen, terwijl bij experiment 5 de opbrengst van ColorSeeds 30 procentpunt lager is.



Figuur 25 Recoveries van UV afgedode *Cryptosporidium* en ColorSeeds exclusief hemoflow concentratie gecorrigeerd voor achtergrondconcentratie in Lekwater

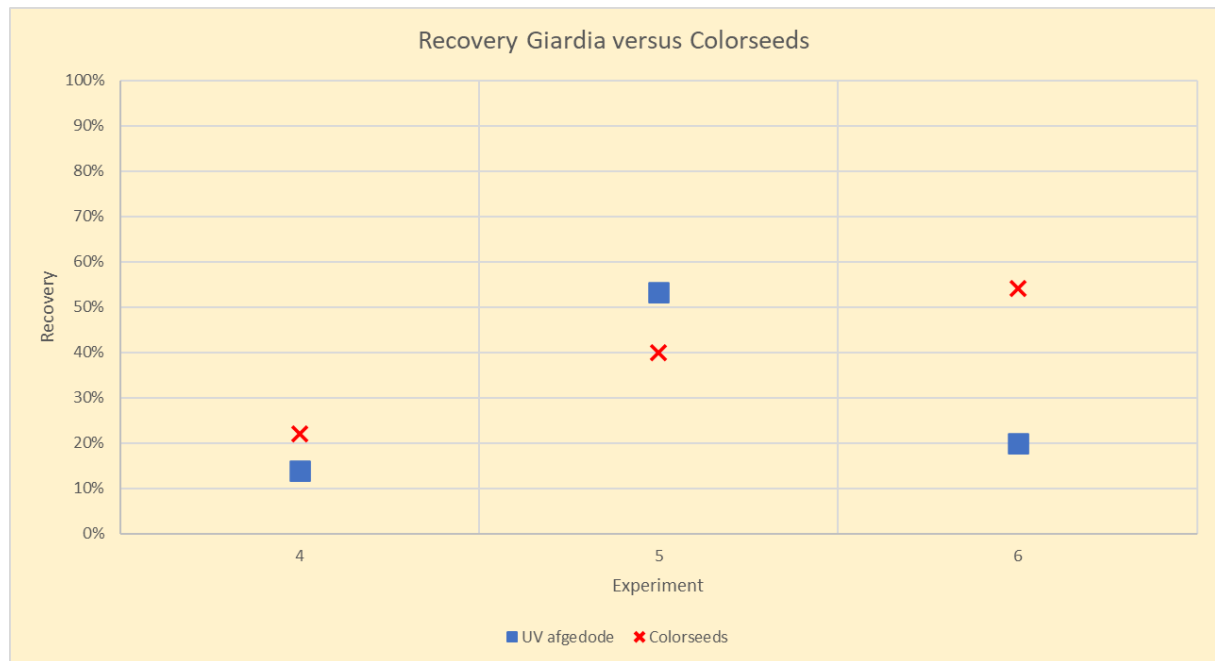
Giardia

In Figuur 26 is de relatie tussen opbrengst van UV afgedode *Giardia* en ColorSeeds weergegeven. De opbrengst lijkt sterker te variëren dan voor *Cryptosporidium*. Beide recoveries liggen bij vier experimenten dicht bij elkaar (stippellijn geeft 1:1 relatie recoveries weer), terwijl deze voor de drie andere experimenten 30 tot 40 procentpunt naar boven of beneden afwijkt. Er lijkt een redelijke trend dat hogere recoveries van ColorSeeds samenvallen met hogere recoveries van UV afgedode *Giardia*. Echter, aangezien er mogelijk een achtergrondconcentratie *Giardia* in het Lekwater aanwezig was kunnen niet alle monsters worden gebruikt voor deze vergelijking. Hieronder worden de analyses waarbij de achtergrondconcentratie is bepaald besproken.



Figuur 26 Opbrengst van laboratoriumanalyse van UV afgedode *Giardia* versus ColorSeeds

Bij experimenten 4, 5 en 6 is de werkelijke achtergrondconcentratie bepaald. Bij experiment 4 en 5 komen de recoveries redelijk overeen met respectievelijk 8 procentpunt hogere en 13 procentpunt lagere opbrengst van ColorSeeds. Bij experiment 6 was de opbrengst van UV afgedode *Giardia* 34 procentpunt lager dan van ColorSeeds.

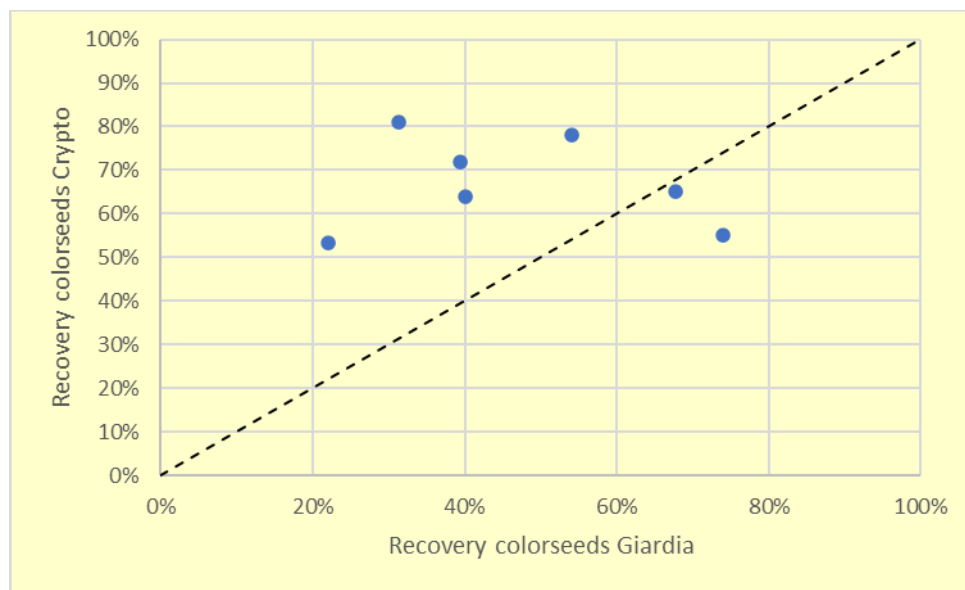


Figuur 27 Recoveries van UV afgedode *Giardia* en ColorSeeds exclusief hemoflow concentratie gecorrigeerd voor achtergrondconcentratie in Lekwater

Uit de resultaten blijkt dat de ColorSeeds zowel voor *Cryptosporidium* als voor *Giardia* een vrij goede indicatie van de opbrengst van UV afgedode protozoa kunnen geven bij de laboratoriumanalyse, maar dat er ook meer dan 30% procentpunt afwijking kan optreden.

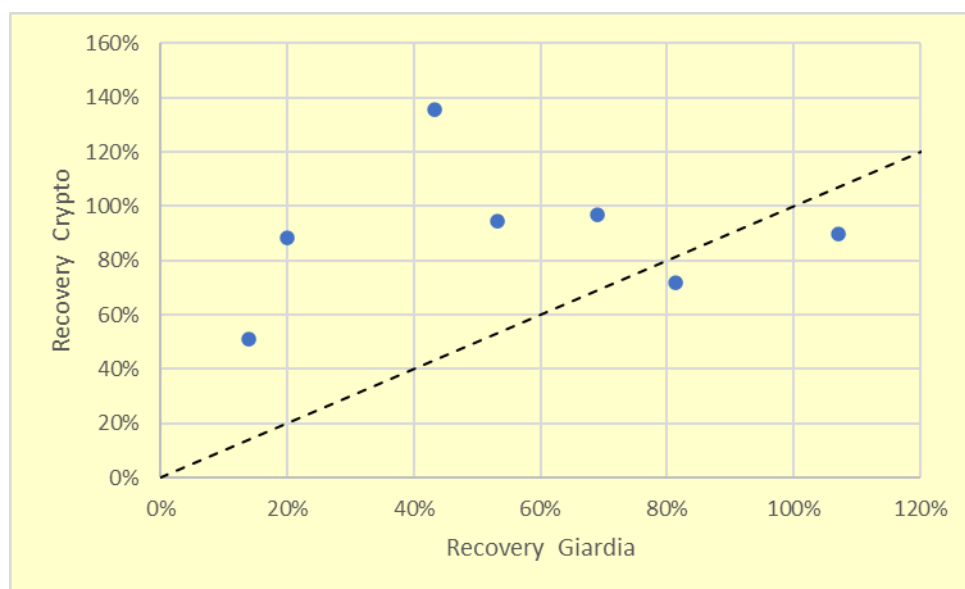
4.3.2 Opbrengst *Cryptosporidium* versus *Giardia* bij laboratoriumanalyse

De opbrengst van *Cryptosporidium* en *Giardia* is per experiment vergeleken in Figuur 28 en Figuur 29. Het is immers mogelijk dat beide analyses storing ondervinden van (geconcentreerde) stoffen in het monster. Voor de ColorSeeds in Figuur 28 blijkt er geen correlatie te zijn tussen beide recoveries. De opbrengst voor *Cryptosporidium*-ColorSeeds is relatief constant tussen 53% en 81% terwijl die voor *Giardia* sterker varieert van 22% tot 74%. Ook is er geen trend zichtbaar van lage naar hoge opbrengst voor beide analyses.



Figuur 28 Opbrengst van laboratoriumanalyse van *Cryptosporidium* ColorSeeds versus *Giardia* ColorSeeds

Ook voor de UV-afgedode protozoa is er geen duidelijk verband tussen de opbrengst van beide organismen. De opbrengst van *Cryptosporidium* is relatief stabiel en varieert tussen 50% en 100% met één uitzondering van 138%, terwijl de opbrengst van *Giardia* sterk varieert van 14% tot 107%. Er lijkt ook geen correlatie te zijn tussen beide recoveries. Er lijkt daarom geen sprake te zijn van storing van beide analyses door dezelfde stof(fen) of andere factoren. Hierbij moet worden bedacht dat een achtergrondconcentratie van protozoa in Lekwater de gevonden recoveries kan hebben beïnvloed.

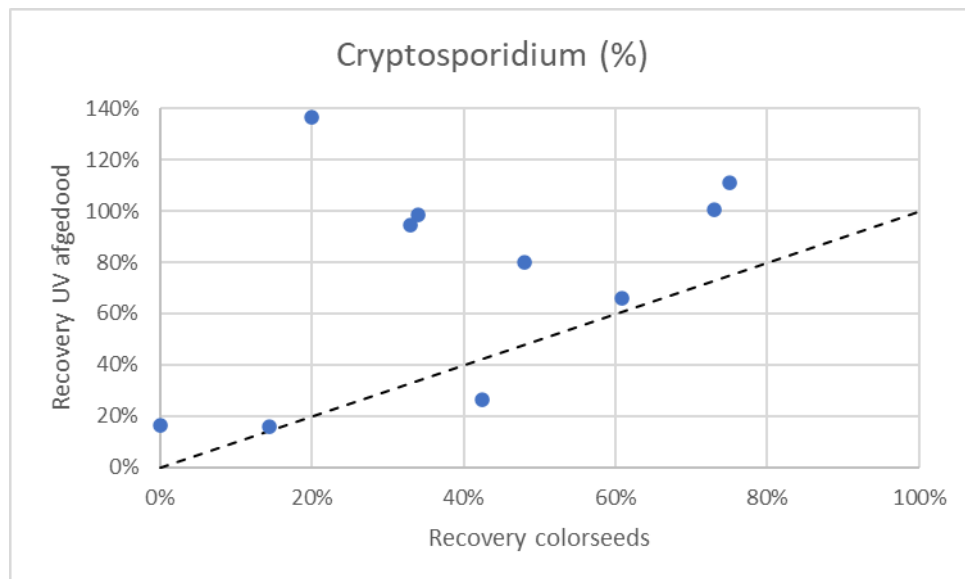


Figuur 29 Opbrengst van laboratoriumanalyse van UV afgedode *Cryptosporidium* versus UV afgedode *Giardia*

4.3.3 Relatie ColorSeeds en UV afgedode protozoa inclusief hemoflow

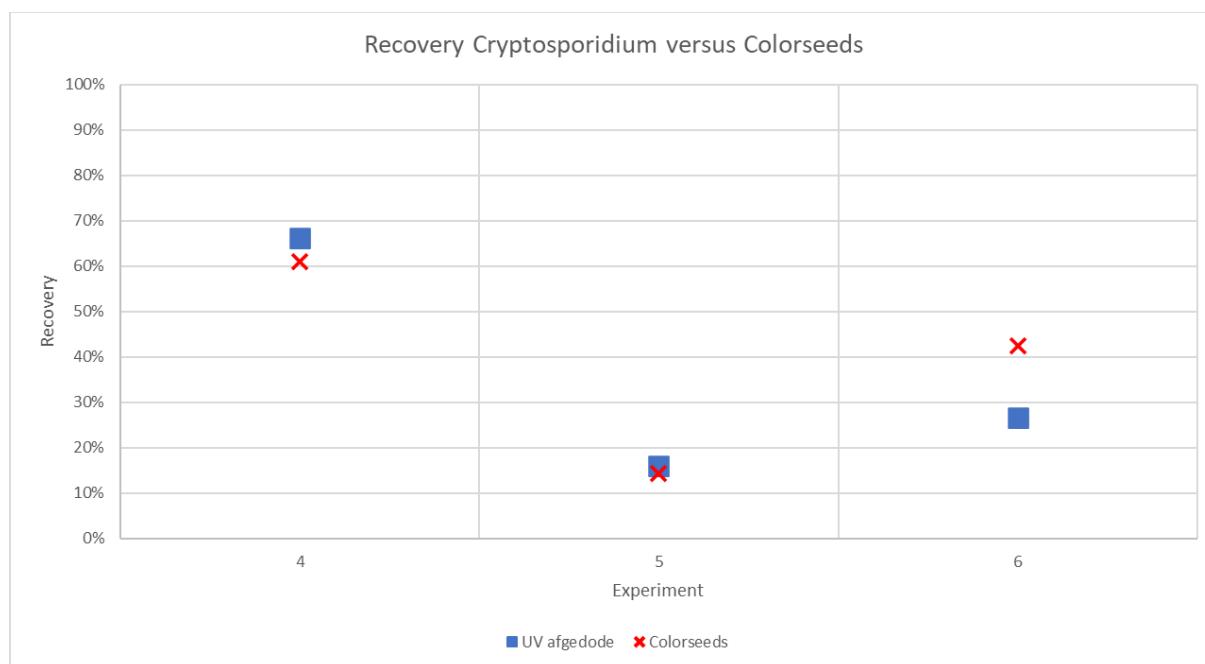
Cryptosporidium

In Figuur 30 is de opbrengst van UV afgedode *Cryptosporidium* afgezet tegen de opbrengst van ColorSeeds inclusief de concentratie van het monster met hemoflow. Daaruit blijkt dat de opbrengst van UV afgedode *Cryptosporidium* vaak aanzienlijk hoger was dan die van ColorSeeds. Mogelijke oorzaak hiervoor is een achtergrondconcentratie in het Lekwater monster. Dit kan ook hebben veroorzaakt dat bij 3 van de 10 experimenten meer dan 100% opbrengst van UV afgedode *Cryptosporidium* is waargenomen.



Figuur 30 Opbrengst inclusief hemoflow UV afgedode *Cryptosporidium* versus opbrengst ColorSeeds

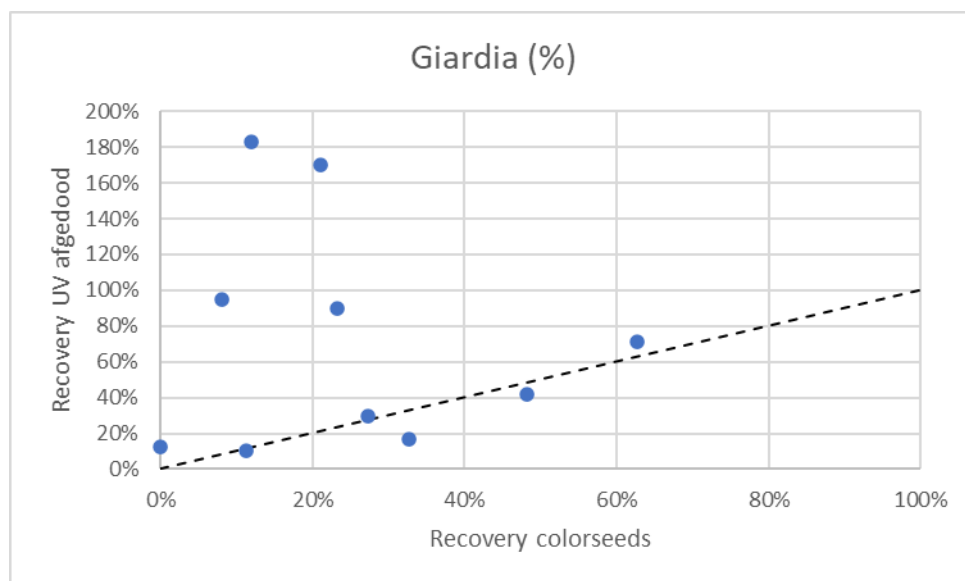
Bij experimenten 4, 5 en 6 is de werkelijke achtergrondconcentratie in Lekwater bepaald en daarvoor gecorrigeerd. Bij experiment 4 en 5 komen beide recoveries vrijwel overeen en bij experiment 6 is de opbrengst van ColorSeeds 15 procentpunt hoger.



Figuur 31 Mogelijke invloed van achtergrondconcentratie *Cryptosporidium* in Lekwater op de berekende recoveries van UV afgedode *Cryptosporidium* inclusief hemoflow concentratie

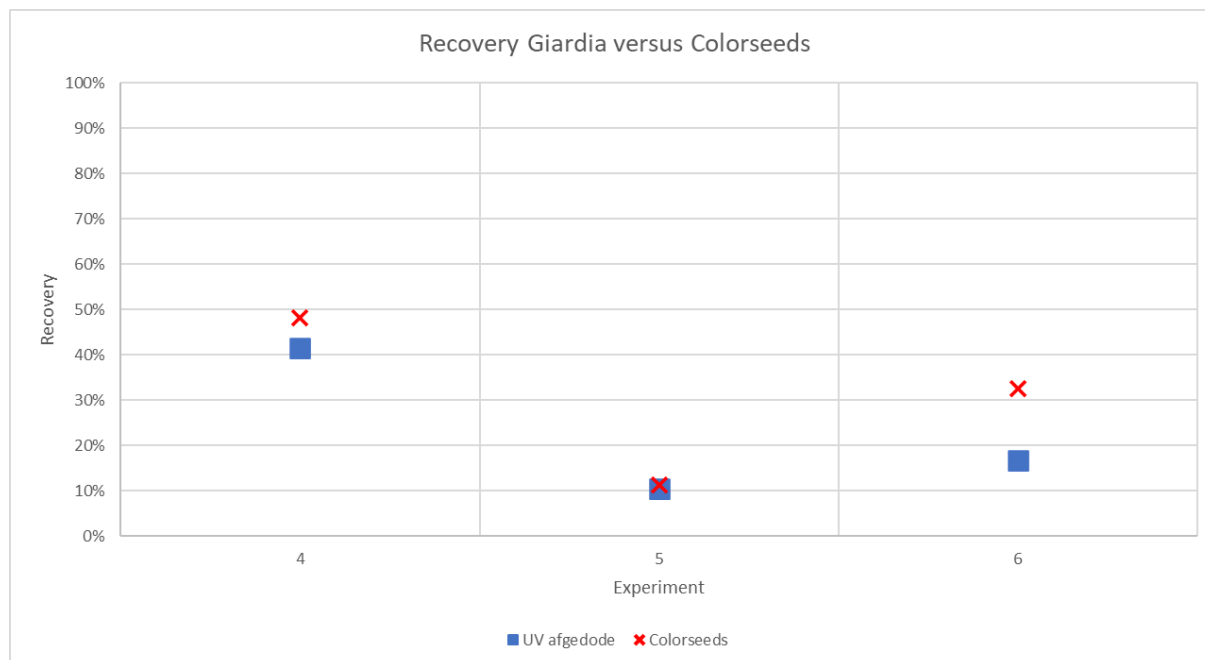
Giardia

In Figuur 32 is voor *Giardia* hetzelfde beeld te zien als voor *Cryptosporidium*. Bij zes experimenten komen de recoveries redelijk overeen met een maximale afwijking van 13 procentpunt naar boven of beneden. Vier keer is de opbrengst van UV afgedode *Giardia* meer dan 67 procentpunt hoger dan die van ColorSeeds. Daarnaast is bij 2 experimenten de opbrengst veel hoger dan 100%. Ook hier zou een achtergrondconcentratie in Lekwater dit kunnen verklaren.



Figuur 32 Opbrengst UV afgedode *Giardia* versus opbrengst ColorSeeds

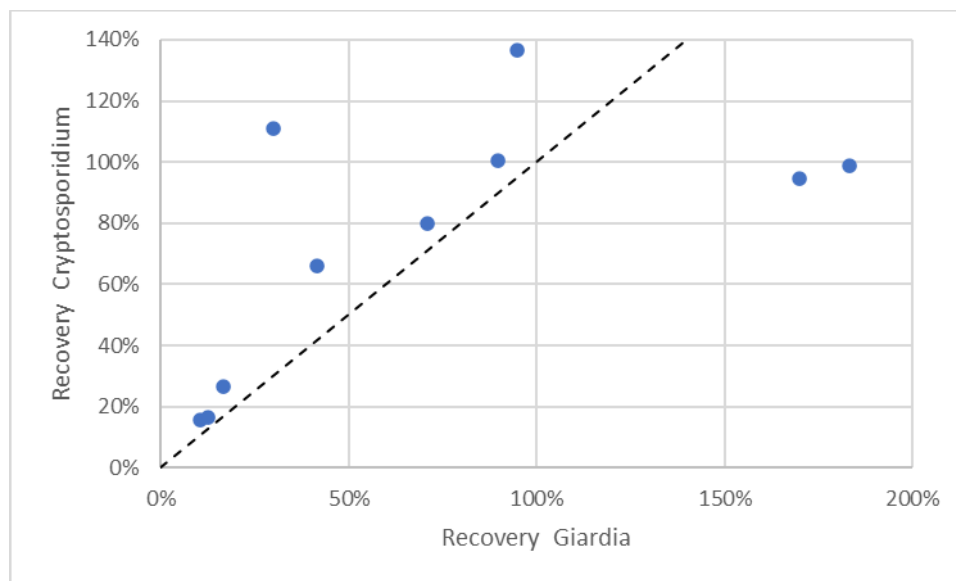
Bij experimenten 4, 5 en 6 is de werkelijke achtergrondconcentratie in Lekwater bepaald en daarvoor gecorrigeerd. Bij deze experimenten komen de recoveries redelijk overeen met maximaal 16 procentpunt hogere ColorSeed opbrengst bij experiment 6.



Figuur 33 Mogelijke invloed van achtergrondconcentratie *Giardia* in Lekwater op de berekende recoveries van UV afgedode *Giardia* inclusief hemoflow concentratie

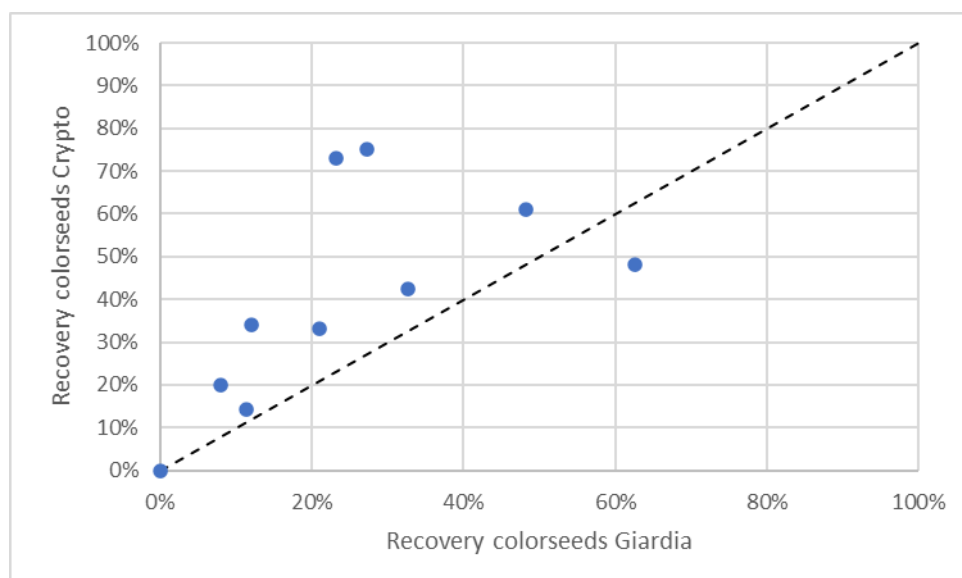
4.3.4 Opbrengst *Cryptosporidium* versus *Giardia* bij concentratie met hemoflow

In Figuur 34 is de opbrengst van UV afgedode *Giardia* versus *Cryptosporidium* weergegeven. Voor de zes experimenten waarbij de recoveries kleiner waren dan 100% komen de recoveries sterk overeen, waarbij de opbrengst voor *Cryptosporidium* iets hoger lijkt dan voor *Giardia*. Voor de vier experimenten waarbij de opbrengst van *Cryptosporidium* (2 keer) of *Giardia* (2 keer) groter was dan 100% wijken deze af. Zoals eerder besproken kan een opbrengst van meer dan 100% het gevolg zijn van een achtergrondconcentratie van de organismen in het Lekwater. Voor beide *Giardia* recoveries >100% geldt dat de opbrengst van *Cryptosporidium* ook heel hoog was, bijna 100%. Hetzelfde geldt voor één opbrengst van *Cryptosporidium* van >100%, bij het andere experiment was de opbrengst van *Giardia* slechts 30%. Deze resultaten suggereren dat er een correlatie is tussen de recoveries van beide organismen wanneer de concentratie met hemoflow plaatsvindt. Dit is opvallend omdat in paragraaf 4.3.2 bleek dat er geen correlatie is bij de laboratoriumanalyse. Blijkbaar leidt de variatie in opbrengst bij de laboratoriumanalyse niet tot een variatie wanneer de opbrengst inclusief de hemoflow concentratie wordt bepaald. Een andere verklaring kan een correlatie in achtergrondconcentratie in Lekwater tussen beide organismen zijn. Bij een verhoogde fecale belasting is het mogelijk dat beide organismen gelijktijdig in hogere concentraties voorkomen en daarmee ook tot een schijnbare hogere opbrengst van gedoseerde, UV-afgedode organismen leidt.



Figuur 34 Opbrengst van UV afgedode *Giardia* versus *Cryptosporidium* inclusief concentratie met hemoflow

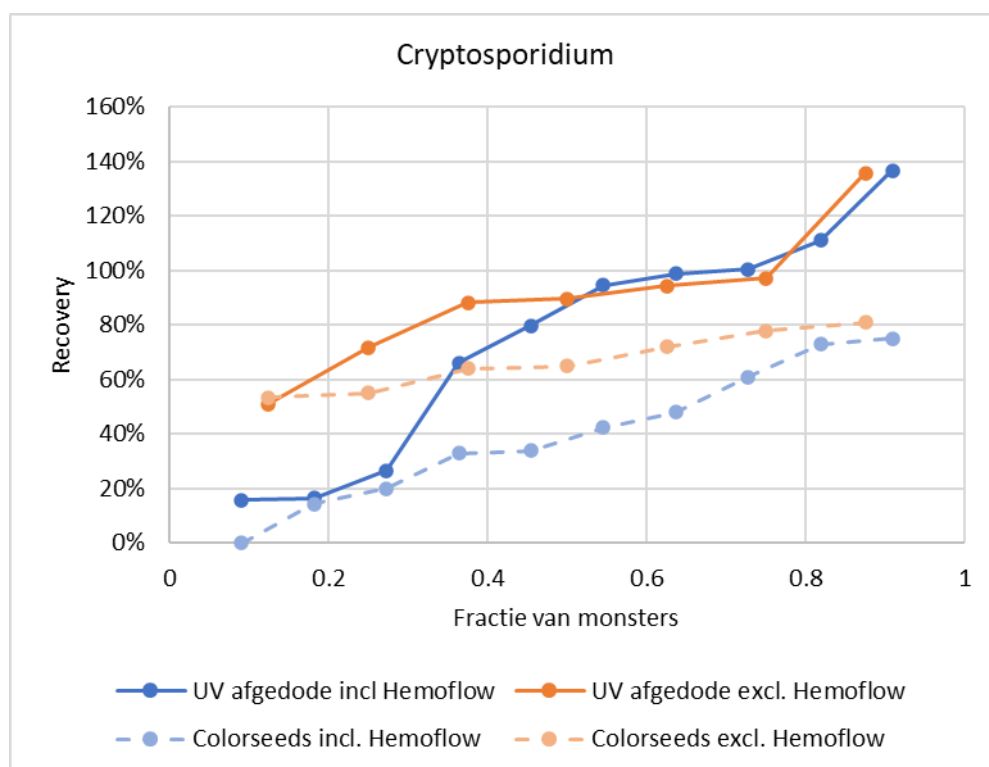
In Figuur 35 is de opbrengst van ColorSeeds voor *Cryptosporidium* versus *Giardia* inclusief hemoflow weergegeven. Er is een verband tussen de opbrengst van beide organismen, hoewel de variatie groter is dan bij de UV-afgedode organismen. De opbrengst van *Cryptosporidium* is bij twee experimenten veel hoger dan van *Giardia* en de opbrengst van *Giardia*-ColorSeeds is bij de andere experimenten ook doorgaans lager dan van *Cryptosporidium*-ColorSeeds. Dit effect lijkt groter dan bij UV-afgedode organismen in Figuur 34. Het verband suggereert dat dezelfde mechanismen invloed hebben op *Cryptosporidium* en *Giardia* ColorSeeds. Aangezien bij de laboratoriumanalyse in Figuur 28 geen verband werd gevonden tussen beide recoveries, zouden dit mechanismen zijn die bij de hemoflow concentratie optreden.



Figuur 35 Opbrengst van ColorSeeds voor *Giardia* versus *Cryptosporidium* inclusief concentratie met hemoflow

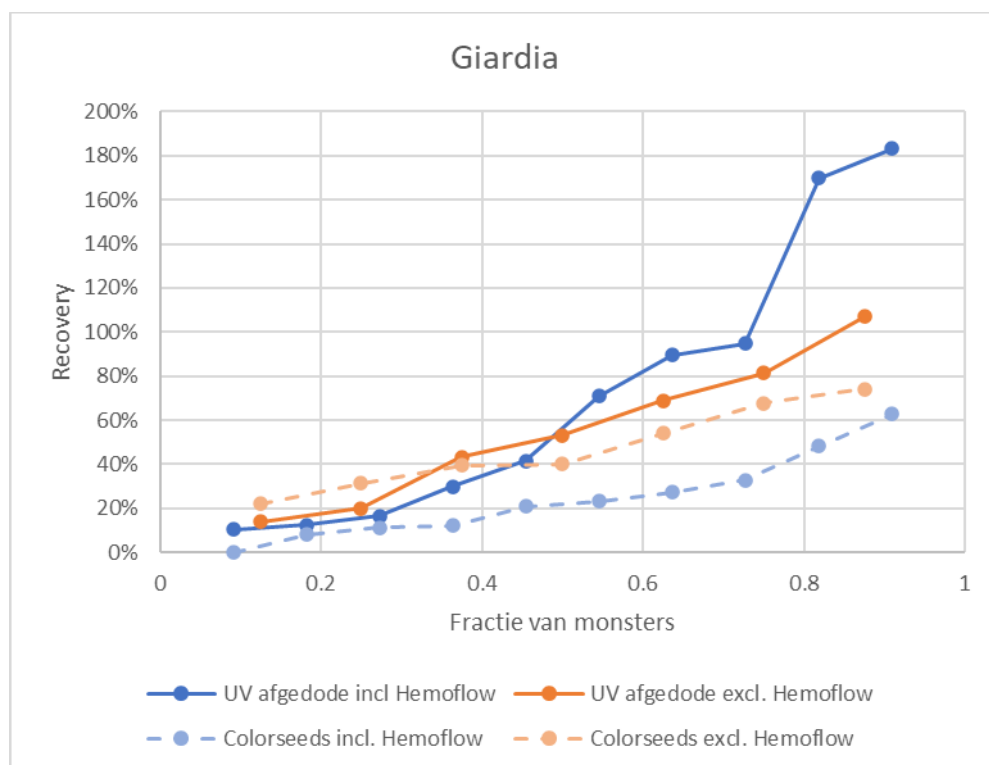
4.3.5 Opbrengst exclusief versus inclusief hemoflow

Zowel bij het concentreren van het monster met hemoflow als bij de verdere opwerking en analyse in het laboratorium worden niet alle organismen in het oorspronkelijke monster gedetecteerd. Bij de laboratoriumexperimenten is de opbrengst van natuurlijke protozoa en ColorSeeds zowel exclusief als inclusief hemoflow bepaald. Het was echter niet mogelijk om voor hetzelfde monster zowel inclusief als exclusief hemoflow de opbrengst te bepalen. Daarom zijn hieronder alle bepaalde recoveries weergegeven op rangorde van opbrengst. Zo ontstaat een beeld van het aandeel van hemoflow in de totale opbrengst in Figuur 36 en Figuur 37.



Figuur 36 Vergelijking opbrengst exclusief en inclusief hemoflow voor UV afgedode *Cryptosporidium* en ColorSeeds

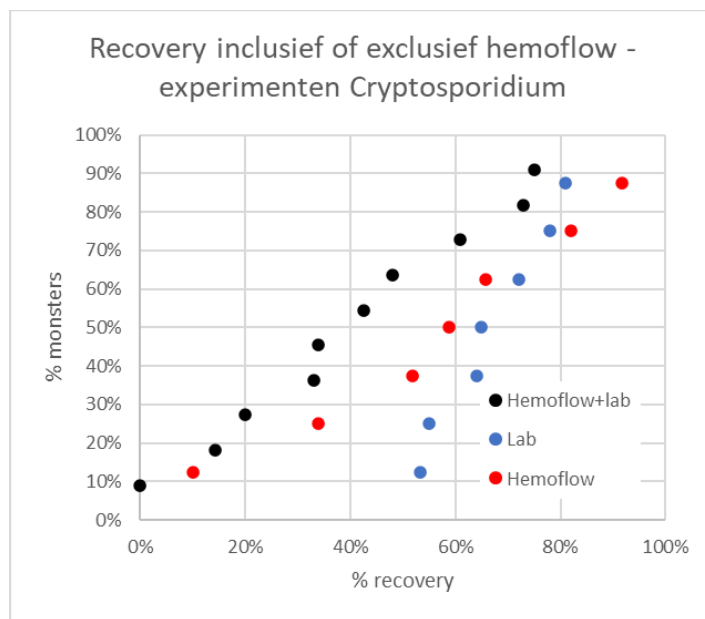
In Figuur 36 is te zien dat exclusief hemoflow de spreiding in opbrengst voor UV afgedode *Cryptosporidium* en ColorSeeds beperkt is, met een uitzonderlijk hoge opbrengst voor UV afgedode *Cryptosporidium*. Een achtergrondconcentratie van *Cryptosporidium* in Lekwater kan hebben geleid tot de schijnbaar hoge recoveries en recoveries van meer dan 100%. Dit speelt echter zowel voor de experimenten inclusief als exclusief hemoflow. De opbrengst van colorseeds is doorgaans circa 10 procentpunt lager dan die van UV afgedode. Ook dit verschil kan deels zijn veroorzaakt door een achtergrondconcentratie in Lekwater. Zie Paragraaf 4.3.3 voor directe vergelijking tussen ColorSeeds en UV afgedode *Cryptosporidium*. Let op hierbij dat boven elkaar liggende metingen niet noodzakelijk uit hetzelfde experiment volgen, aangezien beide op rangorde van opbrengst zijn weergegeven. De opbrengst van UV afgedode *Cryptosporidium* inclusief hemoflow laat een zeer grote spreiding zien, en overlapt deels met die zonder hemoflow. Dit zou betekenen dat de opbrengst van alleen hemoflow regelmatig vrijwel 100% is, wat tegenstrijdig is met de bevindingen op basis van historische data in Paragraaf 3.1.2. De spreiding van de opbrengst van ColorSeeds is kleiner, maar wel groter dan de spreiding zonder hemoflow.



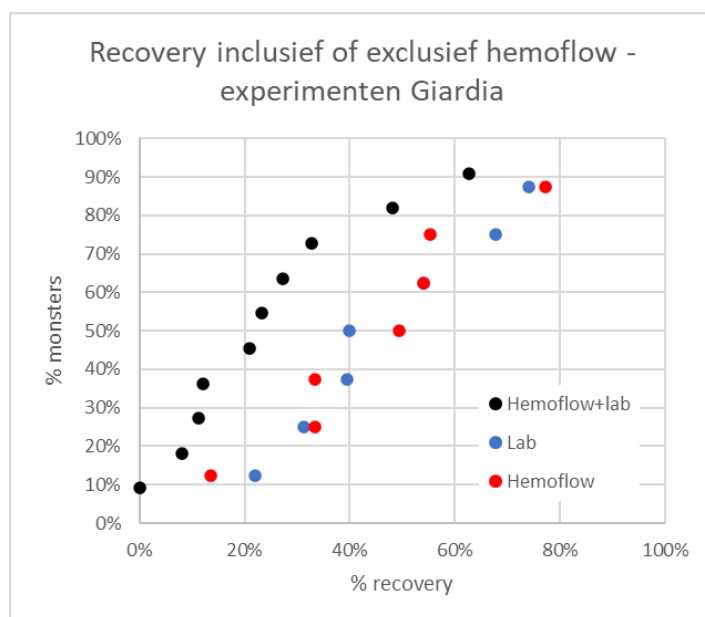
Figuur 37 Vergelijking opbrengst exclusief en inclusief hemoflow voor UV afgedode *Giardia* en ColorSeeds

Figuur 37 laat zien dat de spreiding van de opbrengst van *Giardia* groter is dan die van *Cryptosporidium* (Figuur 36) voor alle situaties. De opbrengst inclusief en exclusief hemoflow is vrijwel gelijk, met uitzondering van twee recoveries >100%. Dit suggereert dat de opbrengst van alleen hemoflow vrijwel 100% is, wat tegenstrijdig is met de bevindingen op basis van historische data in Paragraaf 3.1.2. De recoveries exclusief hemoflow liggen voor UV afgedode *Giardia* en ColorSeeds vrij dicht bij elkaar. Bij analyse inclusief hemoflow lopen deze echter sterk uiteen, met zeer hoge recoveries voor UV afgedode *Giardia* in twee monsters. Een mogelijke achtergrondconcentratie van *Giardia* in Lekwater maakt een directe vergelijking tussen ColorSeeds en UV afgedode *Giardia* echter onbetrouwbaar. Zie Paragraaf 4.3.3 voor de vergelijking bij experimenten waar wel de achtergrondconcentratie is bepaald.

Deze gegevens kunnen ook worden gebruikt om de opbrengst van de hemoflow stap te schatten. Hiervoor zijn in Figuur 38 en Figuur 39 de gerangschikte recoveries inclusief hemoflow gedeeld door de recoveries exclusief hemoflow in hetzelfde percentage monsters. De recoveries inclusief hemoflow zijn hiervoor geïnterpoleerd, aangezien hiervoor meer analyses zijn uitgevoerd. In Paragraaf 3.1.2 is dit op gelijke wijze gedaan voor historische opbrengst gegevens. In tegenstelling tot die historische gegevens blijkt uit de experimenten dat de opbrengst van de hemoflow stap en de opwerking en analyse op het laboratorium ongeveer gelijk zijn voor de meeste monsters.



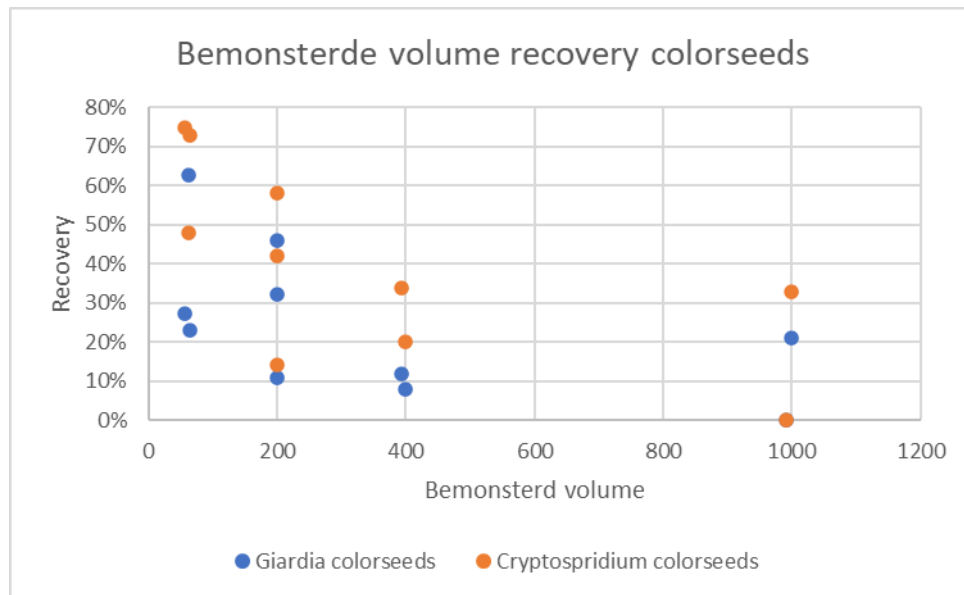
Figuur 38 Frequentie van voorkomen van *Cryptosporidium* ColorSeed recoveries met en zonder hemoflow concentratie en daaruit afgeleide opbrengst van alleen de hemoflow concentratie uit experimenten



Figuur 39 Frequentie van voorkomen van *Giardia* ColorSeed recoveries met en zonder hemoflow concentratie en daaruit afgeleide opbrengst van alleen de hemoflow concentratie uit experimenten

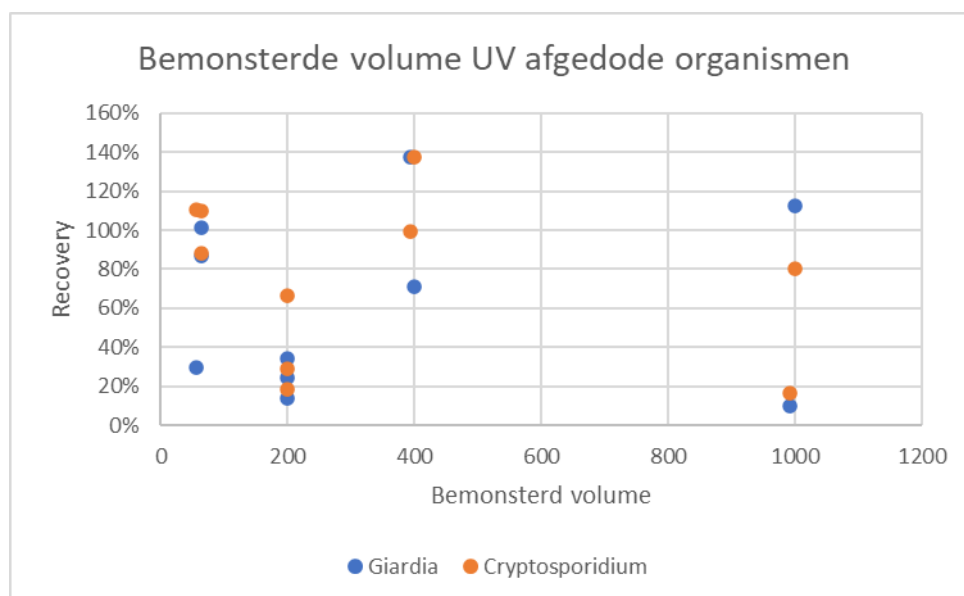
4.3.6 Relatie monstervolume en opbrengst inclusief hemoflow

Verwacht wordt dat een groter monstervolume leidt tot een lagere opbrengst wanneer deze inclusief hemoflow wordt bepaald. In deze analyse is het bemonsterde volume gebruikt en niet het inzetvolume, omdat een groter bemonsterd volume ook betekent dat het monster langer is rondgepompt in de hemoflow installatie. Nadelige effecten van langer rondpompen zouden kunnen leiden tot een lagere opbrengst. In Figuur 40 en Figuur 41 is de opbrengst inclusief hemoflow weergegeven bij verschillende monstervolumes voor respectievelijk ColorSeeds en UV afgedode protozoa.



Figuur 40 Opbrengst van ColorSeeds inclusief hemoflow versus bemonsterd volume

Uit Figuur 40 blijkt een duidelijk verband tussen de opbrengst van ColorSeeds en het monstervolume. Hoewel bij ieder monstervolume een aanzienlijke spreiding van opbrengst van 30 tot 50 procentpunt te zien is, is een duidelijke trend zichtbaar van lagere recoveries bij groter monstervolume.



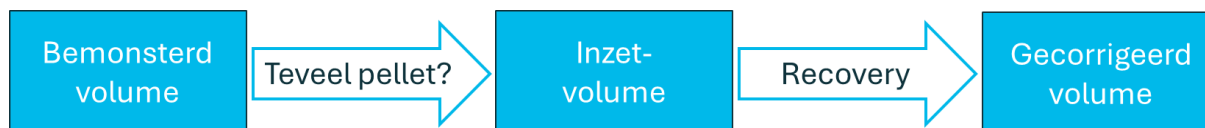
Figuur 41 Opbrengst van UV afgedode Cryptosporidium en Giardia inclusief hemoflow versus bemonsterd volume

In Figuur 41 is deze trend niet zichtbaar voor UV afgedode protozoa. Zelfs bij het grootste bemonsterde volume is nog een opbrengst van meer dan 100% gevonden. Een groter bemonsterd volume betekent ook een grotere invloed van een mogelijke achtergrondconcentratie in Lekwater. Het aantal natuurlijke protozoa (achtergrondconcentratie) is dan immers hoger, terwijl het aantal gedoseerde UV afgedode protozoa hetzelfde is

als in kleinere volumes. De opbrengst lijkt dan hoger dan hij in werkelijkheid is. Daarom kan geen uitspraak worden gedaan over de relatie tussen monstervolume en de opbrengst van UV afgedode protozoa.

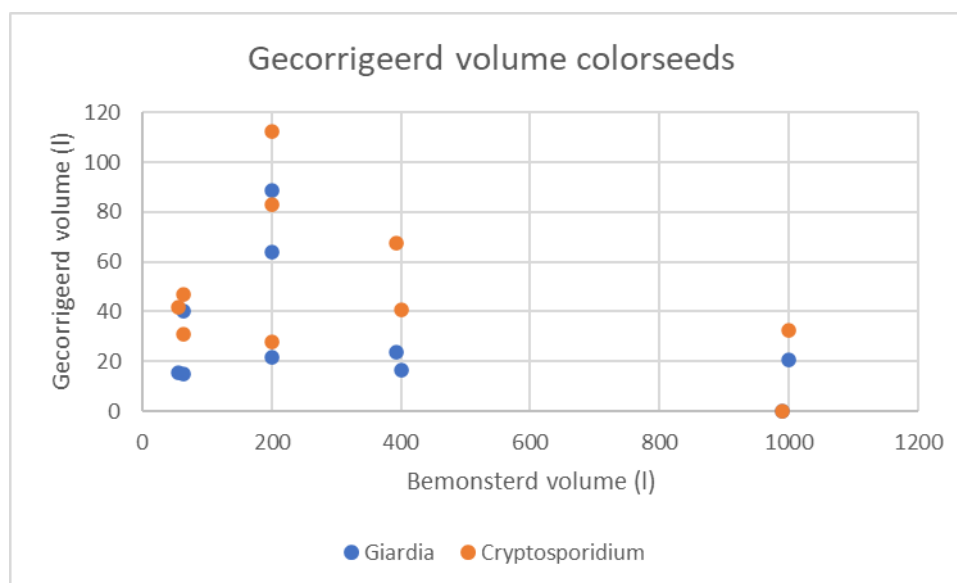
4.3.7 Optimaal monstervolume voor opbrengst ColorSeeds inclusief hemoflow

Voor ColorSeeds is waargenomen dat de opbrengst lager is bij grotere monstervolumes. Uit figuur 40 kan worden geconcludeerd dat voor een hoge opbrengst volumes van minder dan 100 liter genomen zouden moeten worden. Dit is ook de praktijk in andere landen waar beide protozoa in oppervlaktewater worden gemeten. Uit de data kan een optimaal monstervolume worden afgeleid waarbij de meetgrens zo laag mogelijk is. Hierbij wordt de meetgrens uitgedrukt als gecorrigeerd volume, dat zo groot mogelijk moet zijn. Het gecorrigeerd volume volgt uit het bemonsterde volume, het aandeel onderzocht pellet en de opbrengst van de concentratie, opwerking en analyse. Bij te veel pellet wordt maar een deel van het pellet onderzocht, waardoor het gerapporteerde inzetvolume kleiner is dan het bemonsterde volume. Het inzetvolume wordt daarom gecorrigeerd voor de gerapporteerde opbrengst, waarin de correctie voor het inzetvolume als is verwerkt. Dit geeft het gecorrigeerde volume als maat voor de meetgrens van de analyse. Dit is schematisch weergegeven in Figuur 42.



Figuur 42 Stappen van bemonsterd volume naar gecorrigeerd volume

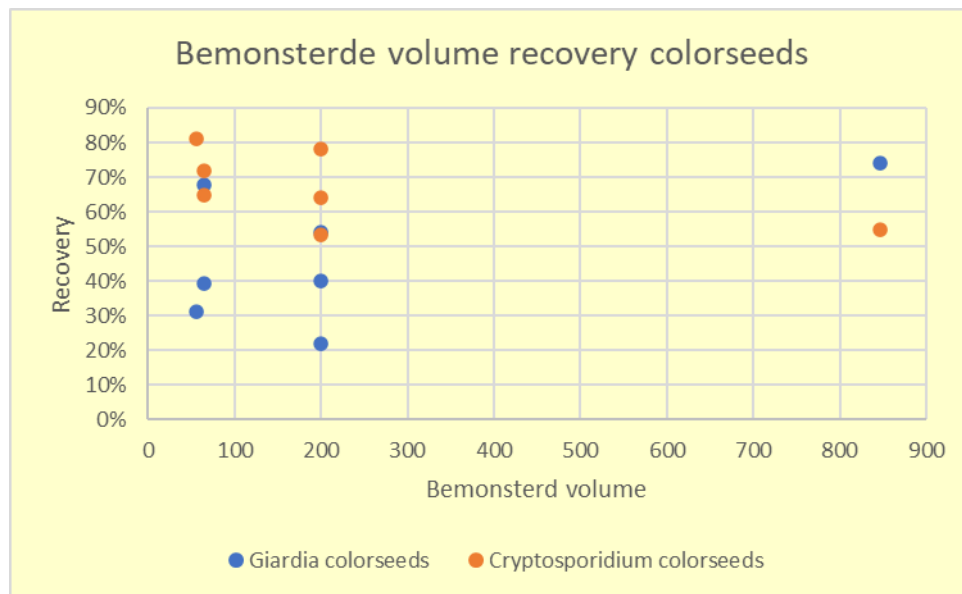
In Figuur 43 zijn de gecorrigeerde volumes voor de ColorSeeds inclusief hemoflow (Figuur 40) weergegeven. Hoewel er grote spreiding is bij ieder bemonsterd volume, lijkt er een optimum rond een bemonsterd volume van 200 liter te zijn. Uit details van de analyse blijkt dat ook bij 200 liter monsters soms maar een deel van het pellet kan worden onderzocht, wat tot een kleiner inzetvolume leidt. Daarom kan men bij veel zwevende stof tijdens monsternamen toch beslissen een kleiner volume te bemonsteren. Daarbij levert een kleiner volume een hogere opbrengst en daarmee betrouwbaarder resultaat.



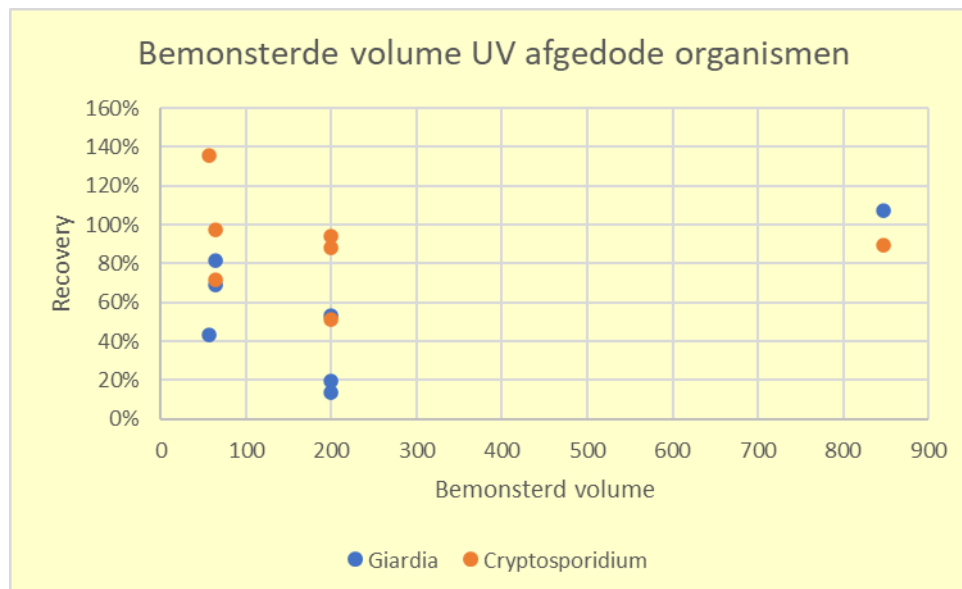
Figuur 43 Gecorrigeerd volume versus bemonsterd volume voor Cryptosporidium en Giardia ColorSeed

4.3.8 Relatie monstervolume en opbrengst exclusief hemoflow

In Figuur 44 en Figuur 45 is de opbrengst exclusief hemoflow weergegeven bij verschillende monstervolumes voor respectievelijk ColorSeeds en UV afgedode protozoa. Er zijn drie volumes onderzocht, waarbij de spreiding in opbrengst voor ieder volume groot was. Een duidelijke relatie tussen volume en opbrengst blijkt niet uit deze resultaten.



Figuur 44 Opbrengst van ColorSeeds exclusief hemoflow versus bemonsterd volume

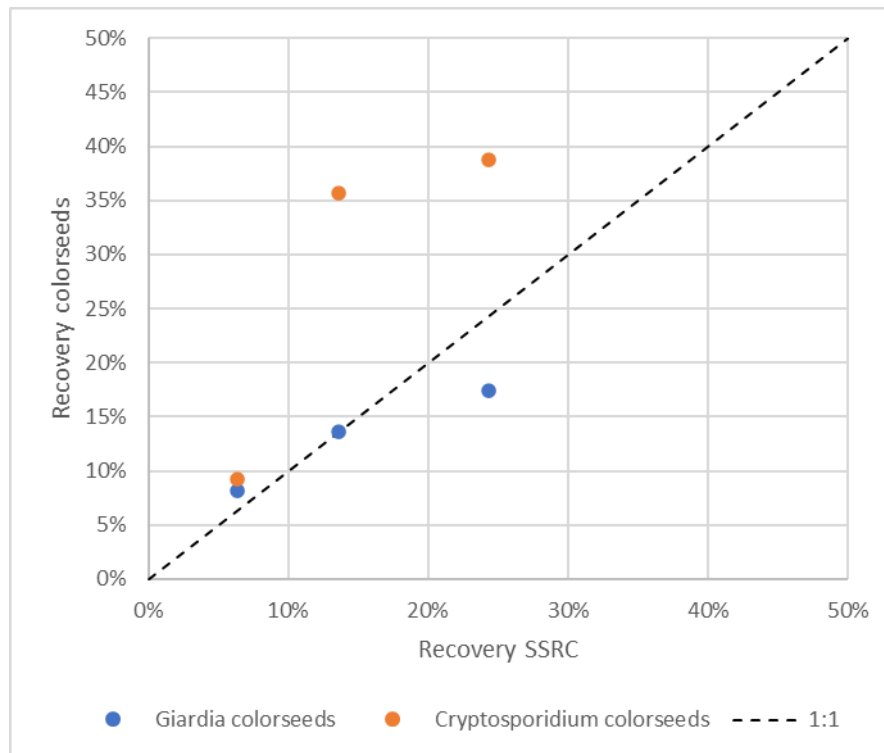


Figuur 45 Opbrengst van UV afgedode Cryptosporidium en Giardia exclusief hemoflow versus bemonsterd volume

4.3.9 Vergelijking SSRC opbrengst

In een drietal experimenten is de opbrengst van SSRC bepaald door zowel de concentratie in het ruwe monster als in het hemoflowconcentraat te bepalen. Wanneer de opbrengst van SSRC door dezelfde factoren wordt beïnvloed

bij hemoflow als protozoa, zou SSRC opbrengst kunnen worden toegepast voor opbrengst van protozoa. In deze experimenten is alleen de opbrengst van ColorSeeds bepaald voor protozoa. In Figuur 46 is te zien dat opbrengst van *Giardia*-ColorSeeds aardig overeen komt met die van SSRC, terwijl dit voor *Cryptosporidium*-ColorSeeds niet het geval is. Hierbij moet worden bedacht dat de ColorSeeds verdere opwerking in het laboratorium hebben ondergaan die de opbrengst ook beïnvloedt. Meer experimenten zijn nodig om te bepalen of SSRC een alternatief kan bieden.



Figuur 46 Opbrengst van SSRC bij hemoflow versus opbrengst van ColorSeeds inclusief hemoflow

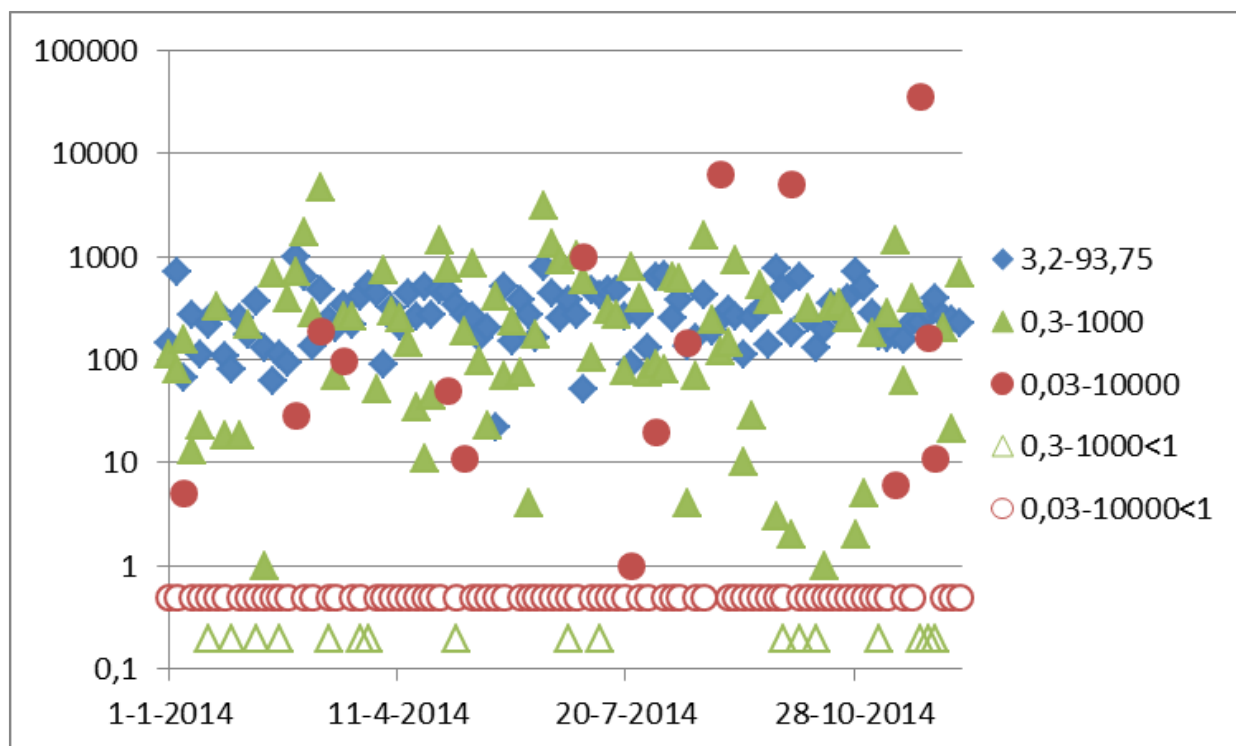
5 Invloed opbrengst op AMVD berekeningen

5.1 Variatie van concentraties pathogenen in oppervlaktewater en bemonstering

De mate van fecale verontreiniging van het water, de hoeveelheid pathogenen die daarbij in het water komt en de variatie daarin is uniek voor iedere locatie. Een goed meetprogramma draagt bij aan het nauwkeurig karakteriseren van een locatie. Hoe vaker pathogenen worden gemeten, hoe beter de werkelijke concentratie(variatie) kan worden gekwantificeerd. Monsternamen en analyse op pathogene micro-organismen is echter kostbaar. Daarom wordt een meetprogramma zo ontworpen dat naar verwachting voldoende zekerheid wordt verkregen over die concentratie. Dit is efficiënter dan een vaste monsterfrequentie waarbij mogelijk meer monsters worden genomen dan noodzakelijk.

De concentratie pathogenen op een innamepunt (laatste open water) van een drinkwaterproductiebedrijf varieert in meer of mindere mate. Voor het uitvoeren van een AMVD monitoren drinkwaterbedrijven pathogeenconcentraties in het innamewater. Wegens de hoge kosten voor analyse van de indexpathogenen enterovirussen, *Cryptosporidium* en *Giardia* blijft het aantal te nemen monsters beperkt tot maximaal enkele tientallen. Op basis van de resultaten wordt de variatie van concentraties bepaald, waarbij de extrapolatie naar hogere concentraties sterk beïnvloed kan worden door de resultaten. Dit gebeurt door een stochastische verdeling (doorgaans een gammaverdeling) te fitten op de meetresultaten. Hieruit volgt de meest waarschijnlijke verdeling van pathogeenconcentraties (maximum likelihood estimate of MLE). Hoe groter het aantal positieve monsters, hoe meer zekerheid (zie Paragraaf 5.3). Bij sterk variërende pathogeenconcentraties zijn concentraties een groot deel van de tijd echter laag, onder de meetgrens, met enkele 'pieken'. Dit is geïllustreerd in Figuur 47 met een gesimuleerde gemiddelde pathogeenconcentratie van 300 organismen per liter bij verschillende mate van variatie (vormparameter r van de gammaverdeling) die in de praktijk is gevonden bij opbrengst gecorrigeerde metingen voor de AMVD. Pathogeenconcentraties zijn gesimuleerd met een gammaverdeling met de weergegeven parameterwaarden voor r en l , respectievelijk de vorm- en schaalparameter van de gammaverdeling. Een kleinere waarde van r komt overeen met meer variatie. De gebruikte waarden zijn gebaseerd op uitgevoerde AMVDs. Bij een detectiegrens van 1 organisme per liter leidt bij weinig variatie (blauw) iedere monsternamen op een willekeurige dag tot een positief analyseresultaat. Bij meer variatie (groen) is er een beperkte kans op een negatief monster, maar wanneer de gemiddelde concentratie lager is (wat voor de genoemde pathogenen het geval is) zullen er meer monsters negatief zijn. Bij grote variatie (rood) is de kans op een negatief monster groot, en is de kans op een positief monster bij deze simulatie kleiner dan 5%.

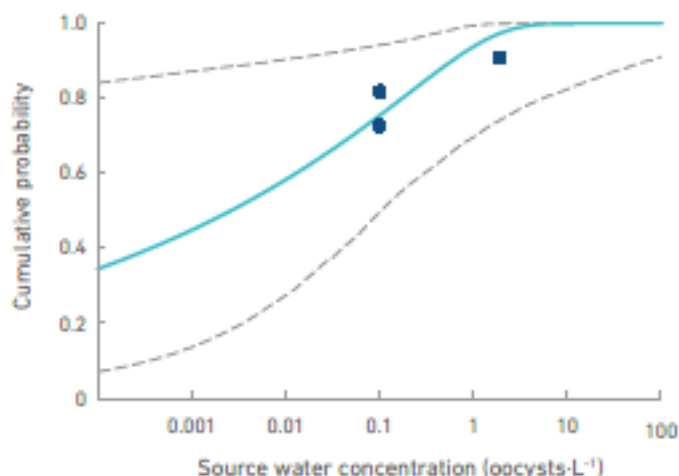
De meetgrens van de analysemethode bepaalt dus in combinatie met de variatie en de gemiddelde concentratie de kans op een positief monster. Door grotere monsters te nemen daalt de meetgrens en wordt de kans op positieve monsters groter. Echter, de opbrengst voor de genoemde pathogenen kan lager worden door verstoring bij de concentratie en analyse van grote monstervolumes. Daarnaast kan mogelijk maar een deel van het geconcentreerde monster worden onderzocht, vanwege de hoeveelheid materiaal in het opgewerkte monster (pellet). In dat geval is het onderzochte volume dus maar een deel van het monstervolume en heeft de concentratiestap mogelijk tot onnodige verlaging van de opbrengst geleid. In dit hoofdstuk wordt onderzocht hoe de opbrengst de meetgrens en daarmee het aantal positieve monster en daarmee de zekerheid over de pathogeenconcentraties beïnvloed. Dit heeft direct invloed op de zekerheid van de risicoanalyse.



Figuur 47 Gesimuleerde concentraties pathogenen bij een gemiddelde concentratie van 300 organismen per liter en verschillende mate van variatie weergegeven door de parameters r en l van de Gamma verdeling, $r * l$ is gemiddelde concentratie van 300 organismen per liter

5.2 Variatie en onzekerheid in QMRA

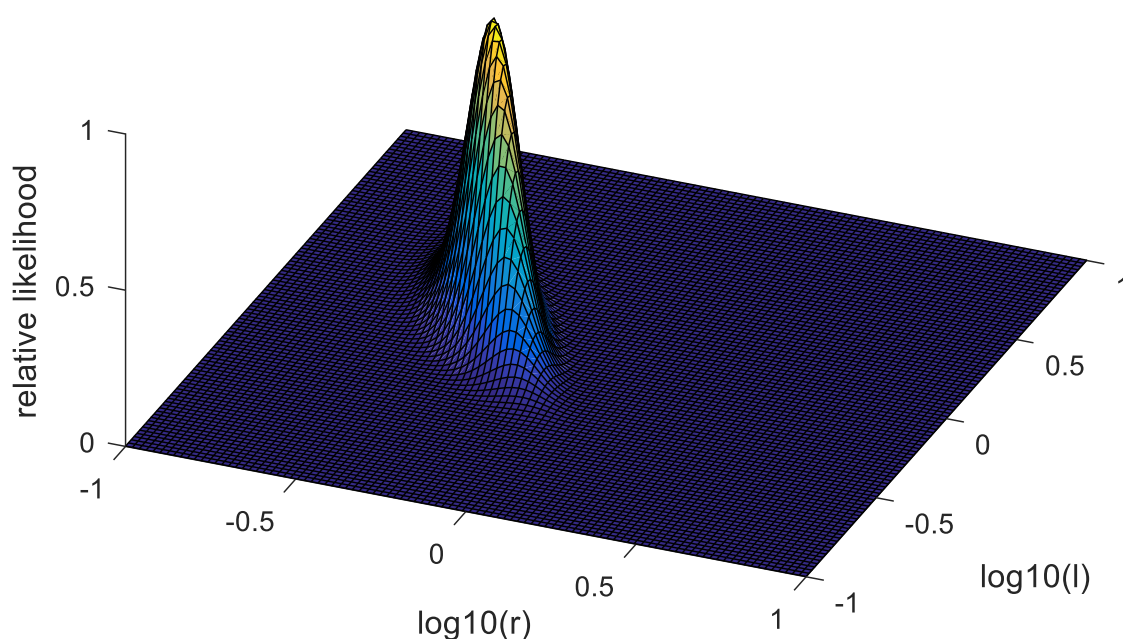
De stochastische benadering in de AMVD kan worden gebruikt om de mate van zekerheid over de concentratie pathogenen uit de meetgegevens af te leiden. Hiertoe kan een zogenaamde 'Markov Chain' worden gecreëerd voor de parameters van de verdeling die de variatie van de concentratie pathogenen beschrijft. De methodiek is beschreven in WHO (2016). De methode resulteert in een set van mogelijke parameter-paren die representatief zijn voor de onzekerheid over de werkelijke verdeling van pathogenen. Figuur 48 geeft hiervan een voorbeeld met een cumulatieve verdeling voor een meetserie waarbij drie van de tien monsters positief waren. De blauwe lijn geeft de meest waarschijnlijke verdeling weer, die ook in QMRAspot wordt bepaald. De stippellijnen geven het 90% waarschijnlijkheidsinterval aan waarbinnen een Gammaverdeling ligt die tot deze monsterresultaten leidt. Het is 90% zeker dat de werkelijke verdeling tussen deze grenzen ligt. Uit de figuur blijkt de grote mate van onzekerheid over de verdeling van concentraties *Cryptosporidium*, die zelf ook varieert.



Figuur 48 Geschatte verdeling van *Cryptosporidium* concentraties in water en de onzekerheid over die verdeling op basis van Markov Chain analyse (figuur B.6 uit WHO 2016).

De mate van onzekerheid kan worden verkleind door meer metingen uit te voeren, de stippellijnen in de figuur komen dan dichter bij elkaar te liggen. De mate van variatie van de concentraties verandert niet door meer metingen, dus de vorm van de grafiek blijft ergens tussen de twee lijnen liggen. De mate van onzekerheid kan worden uitgedrukt als de mate van onzekerheid over de gemiddelde concentratie. Hiervoor wordt vaak het 90% waarschijnlijkheidsinterval gebruikt, er is dan 5% kans dat het werkelijke gemiddelde kleiner is dan de ondergrens, respectievelijk 5% kans dat deze hoger is dan de bovengrens.

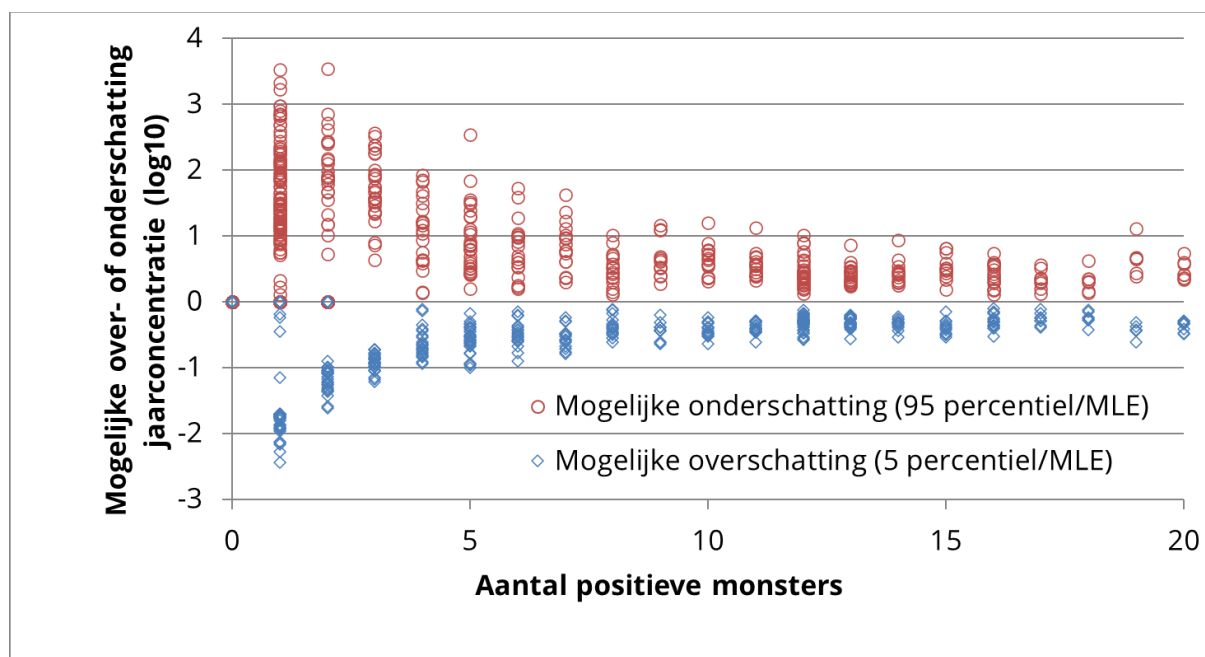
De mate van zekerheid over de concentratieverdeling kan worden gevisualiseerd door de waarschijnlijkheid van waarden van de twee parameters (r en l) van de gammaverdeling waarmee deze wordt beschreven in een grafiek te plaatsen. Figuur 49 geeft hiervan een voorbeeld voor een dataset met veel positieve monsters. De hoogte van de grafiek geeft aan hoe waarschijnlijk de meetresultaten zijn, wanneer de werkelijke concentratie een gammaverdeling volgt met het betreffende parameterpaar. Het hoogste punt is het meest waarschijnlijke parameterpaar en wordt aangeduid als 'maximum likelihood estimate' (MLE). Op dit moment worden in de AMVD alleen de MLE parameters gebruikt. Figuur 49 laat een 'steile berg' zien, dus afwijkende parameterparen die tot een sterk afwijkende gemiddelde concentratie zouden leiden, zijn veel minder waarschijnlijk. Voor deze dataset is de zekerheid over het gemiddelde daarom groot. Bij weinig positieve monsters wordt een 'vlakke heuvel' gevonden over een groter gebied dan de berg in het voorbeeld. Parameterparen die een veel hogere of lagere concentratie beschrijven zijn dan bijna even waarschijnlijk als het MLE parameterpaar. De werkelijke gemiddelde concentratie is dan erg onzeker.



Figuur 49 Waarschijnlijkheid van parametercombinaties van de Gamma verdeling die de concentratieverdeling in een dataset beschrijft.

5.3 Aantal monsters in relatie tot zekerheid over concentratieverdeling

De relatie tussen meetresultaten en zekerheid over de verdeling van concentraties is onderzocht door ruim 700 datasets van pathogenen en indicatororganismen te analyseren. De datasets zijn geselecteerd uit Pathobase (KWR 2025), waarin monsters van diverse watersoorten zijn opgenomen zoals oppervlaktewater, ruw en gezuiverd afvalwater en verschillende stadia in de drinkwaterzuivering. Alleen datasets met drie of meer metingen op een meetlocatie op verschillende momenten over een periode van dagen tot jaren zijn gebruikt in de analyse. Met behulp van Markov Chains is voor iedere dataset de potentiële onderschatting (5-percentiel) of overschatting (95-percentiel) van de gemiddelde concentratie bepaald. Daaruit bleek dat niet het totaal aantal monsters, maar alleen het aantal positieve monsters in een dataset de mate van onzekerheid bepaalt. De onzekerheid over de gemiddelde concentratie is berekend voor het 90% betrouwbaarheidsinterval. Hiervoor is het 5-percentiel van de gemiddelde concentratie (op basis van mogelijke parameters r en l van de gammaverdeling) gedeeld door de meest waarschijnlijke gemiddelde concentratie (MLE van r en l) en is vervolgens hiervan de log10 waarde genomen. Dit resulteert in een negatief getal dat de mogelijke overschatting van de gemiddelde concentratie door de MLE weergeeft in log10. Op dezelfde wijze is het 95-percentiel van de mogelijke gemiddelde concentraties gedeeld door de MLE concentratie, wat de mogelijke onderschatting van de gemiddelde concentratie weergeeft. In Figuur 50 is de potentiële over- of onderschatting van de gemiddelde concentratie weergegeven versus het aantal positieve monsters in de dataset. Alleen de datasets met maximaal 20 positieve monsters zijn weergegeven, aangezien de AMVD monsterprogramma's voor pathogenen doorgaans een beperkt aantal monsters omvat. Datasets met grotere aantallen positieve monsters resulteerden in minder onzekerheid (niet weergegeven). Daaruit blijkt een sterke relatie tussen het aantal positieve monsters en de zekerheid over de gemiddelde concentratie. De mate van zekerheid is ook afhankelijk van de concentraties in de positieve monsters. Wanneer deze een verdeling volgen (een continue lijn vormen in een cumulatieve verdeling), is de zekerheid groter?? dan bij meer verspreide monsters of een trendbreuk in de grafiek.



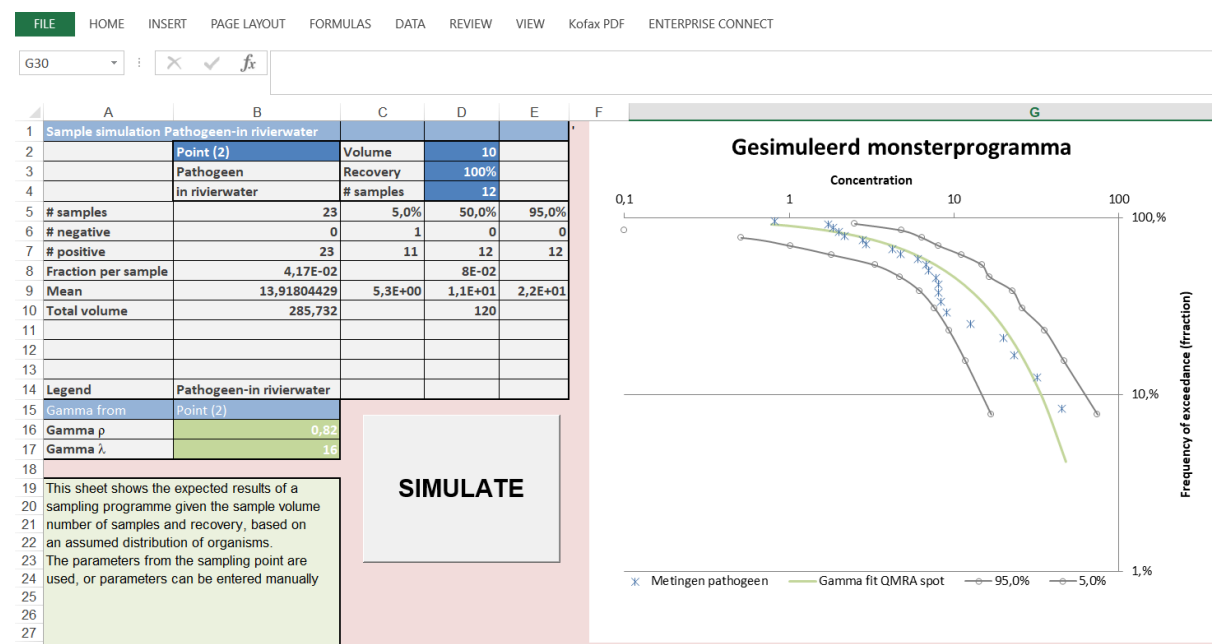
Figuur 50 De onzekerheid over de gemiddelde concentratie op basis van meetresultaten. Ieder rood punt staat voor het verschil tussen het 95 percentiel van het waarschijnlijkheidsinterval versus de meest waarschijnlijke schatting (Smeets, 2017)

Bij slechts enkele positieve meetresultaten kan er sprake zijn van meerdere logeenheden onderschatting van de werkelijke concentratie (de rode punten in Figuur 50). Naarmate het aantal positieve metingen toeneemt, neemt de mogelijke onzekerheid af. Bij 8 of meer positieve monsters is de onzekerheid zelden groter dan 1 logeenheid. Dit past bij de orde grote van onzekerheid in de gehele risicoanalyse. Bij meer monsters neemt de onzekerheid weliswaar af, maar pas bij 32 positieve monsters is de onzekerheid vrijwel altijd kleiner dan 0,5 logeenheden. Er is dus vier keer meer meetinspanning nodig om 0,5 log meer zekerheid te verkrijgen. Gezien de kosten van de metingen, en de onzekerheden bij andere elementen van de risicoberekening, wordt voor de AMVD een onzekerheid van 1 logeenheid geaccepteerd.

Bij Figuur 50 moet worden bedacht dat een meetreeks met 2 positieve metingen ook honderden negatieve metingen kan bevatten. Hoewel die metingen wel de geschatte concentratie beïnvloeden, hebben ze geen invloed op de zekerheid van die schatting. Men kan dit vergelijken met het trekken van een lijn door punten. Zolang er 1 of enkele punten zijn kan de richting van de lijn niet nauwkeurig worden geschat. Daarnaast blijkt uit Figuur 50 dat de zekerheid bij weinig monsters ook groter kan zijn. Dat is afhankelijk van de exacte analyseresultaten. Wanneer die erg verspreid liggen, is er meer onzekerheid.

5.4 Meetprogramma optimaliseren

Aanbevolen wordt een meetprogramma zo te ontwikkelen dat 8 positieve monsters worden verwacht. Daarbij spelen de aanwezige concentraties, het monstervolume en de opbrengst een rol. In het BTO is de QMRAidit tool ontwikkeld om de verwachte resultaten van een monsterprogramma te voorspellen op basis van eerdere resultaten (Smeets and Medema 2013). Op basis van analyse van eerdere meetresultaten kan een gammaverdeling worden geschat die de variatie voor deze locatie beschrijft. De parameters van deze gammaverdeling voert men in, samen met het geplande aantal monsters, het monstervolume en de verwachte opbrengst. QMRAidit voert daarmee een Monte Carlo simulatie uit om het aantal positieve monsters te voorspellen, inclusief de onder- en bovengrens daarvan. De tool gaat er dus vanuit dat de situatie in de tussentijd niet is veranderd. Figuur 51 geeft een voorbeeld van QMRAidit



Figuur S1 Screenshot van QMRAidit Gemeten concentratie, gefitte Gamma verdeling en het verwachte interval waar nieuwe meetresultaten bij 12 monsters van 10 liter bij 100% opbrengst binnen zullen vallen

Door te variëren met het aantal monsters en monstervolume kan men het optimale meetprogramma ontwerpen waarbij het waarschijnlijk is dat minstens 8 positieve monsters worden verkregen. Wanneer de concentraties pathogenen erg laag zijn, zal het aantal benodigde monsters of grootte van het monstervolume onrealistisch worden, terwijl het risico relatief laag is. Het monsterprogramma zal dan worden beperkt door de beschikbare middelen hiervoor.

5.5 Simulatie effect verbeterde opbrengst op onzekerheid

De opbrengst heeft direct invloed op de meetgrens van de analyse, deze wordt lager bij een hogere opbrengst. Daarmee heeft dit ook invloed op het aantal positieve resultaten van een monsterprogramma, en daarmee op de onzekerheid over de variatie van concentraties bij het fitten van een gammaverdeling over de meetresultaten. Op basis van eerdere onderzoeken (Paragraaf 2.8) is aangenomen dat een zeer groot monstervolume leidt tot een lagere opbrengst. Het is dan van belang een optimaal monstervolume te bepalen, waarbij de meetgrens zo laag mogelijk is, en daarmee de onzekerheid te minimaliseren. Hoewel uit het onderzoek in Hoofdstuk 3 geen verband volgt tussen opbrengst en monstervolume, werd dit wel gevonden bij de experimenten in Hoofdstuk 4. Hieruit is een optimaal monstervolume van circa 200 liter afgeleid. Voor de simulaties in dit hoofdstuk, die zijn uitgevoerd voordat dit volume bekend was, is uitgegaan van een optimaal monstervolume van 300 liter. Een andere mogelijkheid is het verbeteren van de opbrengst door aanpassing van de monsteropwerking en analysemethode, hoewel dat in dit onderzoek niet is gelukt. Een aantal simulaties is uitgevoerd om meer inzicht te krijgen in de invloed van de opbrengst op deze onzekerheid over pathogeenconcentraties in de kwantitatieve risicoanalyse. Hiervoor zijn drie situaties onderzocht:

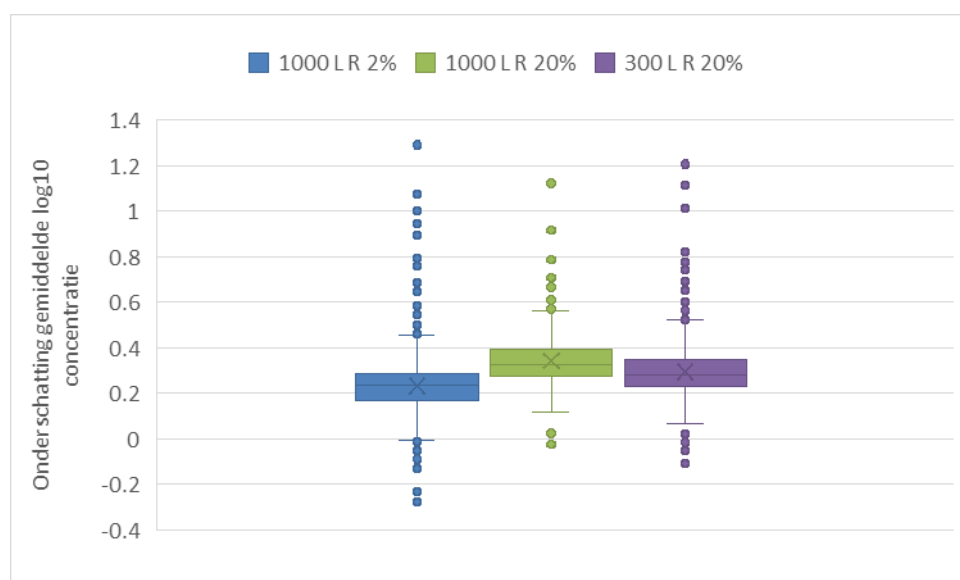
- Huidige situatie: 1000 liter monster met een lage opbrengst van 2%
- Verbeterde opbrengst: 1000 liter monster met een hogere opbrengst van 20%
- Kleiner monstervolume met hogere opbrengst: 300 liter monster met een opbrengst van 20%

Voor de simulaties zijn realistische parameters van de gammaverdeling gekozen op basis van *Cryptosporidium*-metingen in de praktijk. De vormparameter r is gesteld op 0,1, wat overeenkomt met de hoge variatie die in het Richtsnoer AMVD wordt aangenomen wanneer er geen positieve resultaten zijn gevonden. De schaalparameter l is gesteld op 0,05, waarmee de gemiddelde concentratie 0,005 oöcysten/l bedraagt, wat overeenkomt met lage concentraties die in de praktijk in het laatste open water zijn gemeten. Bij deze instellingen worden bij een monsterprogramma van 24 monsters slechts enkele positieve monsters verwacht. Onder deze condities wordt de grootste invloed van de meetgrens op de onzekerheid verwacht. Met deze parameters zijn 24 monsterresultaten (tellingen en monstervolumes) gesimuleerd. Op deze monsterresultaten is vervolgens met MCMC een gammaverdeling gefit, waarbij ook de onzekerheid over de gemiddelde concentratie is bepaald, zoals beschreven in Paragraaf 5.2. Hierbij zijn weer het 5- en 95-percentiel van mogelijke over- of onderschatting berekend, net als in Figuur 50. Deze simulaties zijn 1.000 maal herhaald om steeds verschillende monsterresultaten te genereren. De berekende onzekerheid is weergegeven als boxplot, waarbij de drie situaties in één figuur zijn weergegeven ter vergelijking.

In Tabel 5 zijn de instellingen voor de simulaties en het resulterende aantal positieve monsters samengevat. Voor simulaties waarbij geen positieve monsterresultaten waren is in analogie met de analyse van praktijkdatasets één getelde oocyst in één van de monsters aangenomen om wel een gammaverdeling te kunnen fitten.

Tabel 5 Overzicht gesimuleerde condities en samenvatting gesimuleerde resultaten

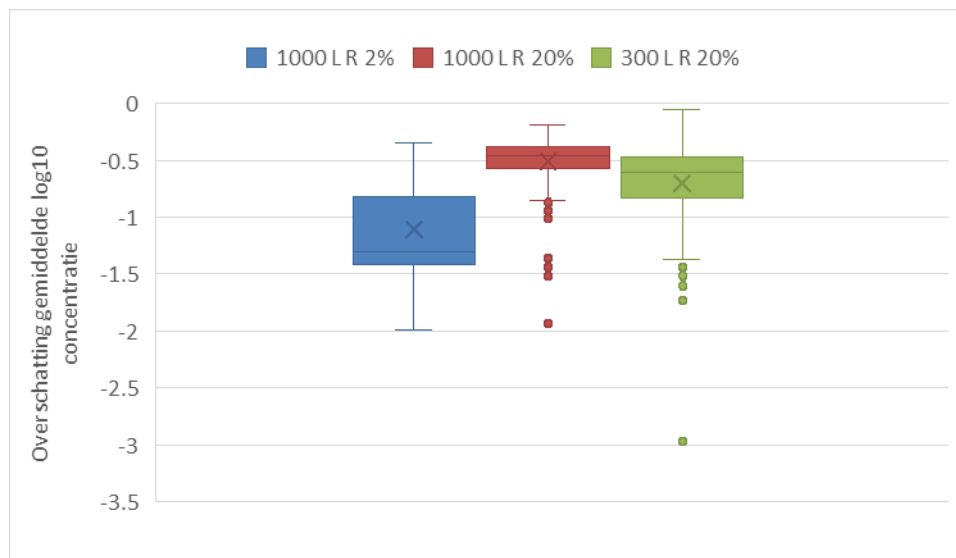
V (l)	1000	1000	300
R	2%	20%	20%
V gecorrigeerd (l)	20	200	60
C (oöcysten/l)	0.005	0.005	0.005
N monsters	24	24	24
N positief (gem)	1.6	5.4	3.2



Figuur 52 Gesimuleerde mogelijke onderschatting van de gemiddelde concentratie *Cryptosporidium* bij verschillende monstervolumes en recoveries (aanname $r=0.1$ $l=0.05$)

Uit Figuur 52 blijkt dat de onderschatting van de gemiddelde concentratie niet veel verschilt voor de drie verschillende monstervolume- en opbrengst scenario's. Opvallend is dat bij het grootste volume met de hoogste

opbrengst de resulterende onderschatting juist iets hoger lijkt, terwijl daarbij de meetgrens het laagst is en het aantal positieve monsters het hoogst (Tabel 5). Theoretisch lijkt de mate van onderschatting beperkt, ondanks het kleine aantal positieve resultaten. Ook in vergelijking met de mogelijke onderschatting op basis van praktijkmetingen (Figuur 50) lijkt de mate van onderschatting gering bij de simulaties. Mogelijk wordt dit veroorzaakt doordat bij de simulaties daadwerkelijk concentraties uit de gammaverdeling worden getrokken, terwijl in de praktijk de concentraties mogelijk niet werkelijk een gammaverdeling volgen. Ook speelt mogelijk het wisselende monstervolume en de variërende recovery bij praktijkmonsters een rol. Bovendien kunnen diverse factoren invloed hebben op de concentraties in de praktijk zoals weer, exacte monsterlocatie en aanwezigheid van dieren op het moment van monstername.



Figuur 53 Gesimuleerde mogelijke overschatting van de gemiddelde concentratie *Cryptosporidium* bij verschillende monstervolumes en recoveries (aannme $r=0.1$ $I=0.05$)

Uit Figuur 53 blijkt dat de statistische onzekerheid potentieel tot meer overschatting dan onderschatting (Figuur 52) van de gemiddelde concentratie leidt. Opvallend is dat dit tegengesteld is aan de resultaten bij praktijkmonsters in Figuur 50. Hiervoor is nog geen verklaring gevonden. Bij de 'huidige' situatie met groot monstervolume en lage opbrengst (1000 liter en 2% opbrengst) is er 5% kans dat de werkelijke concentratie 0,5 tot 2 logeenheden lager is dan de MLE concentratie die op dit moment gebruikt wordt in de AMVD. Wanneer bij hetzelfde monstervolume de opbrengst kan worden verbeterd tot 20% leidt dit tot minder overschatting, van 0,2 tot 0,8 logeenheden (eerste en derde kwartiel), hoewel incidenteel wel meer onzekerheid over overschatting bestaat. Wanneer een opbrengst van 20% alleen mogelijk is bij een kleiner monstervolume (300 liter 20% opbrengst), wordt de onzekerheid over onderschatting met 0 tot 1,4 logeenheden ook kleiner dan in de 'huidige' situatie.

Voor deze simulaties is uitgegaan van een specifieke situatie wat betreft de concentratieverdeling van *Cryptosporidium* in oppervlaktewater. Dit geeft een voorbeeld hoe MCMC kan worden gebruikt om meer inzicht te krijgen in de zekerheid van meetresultaten en de statistische interpretatie daarvan. Andere relevante situaties kunnen op dezelfde wijze worden gesimuleerd. Voor de drie situaties geldt dat de 'huidige' situatie niet overal en op ieder moment hetzelfde is en dat concentratie, volume en opbrengst voor ieder monster kunnen verschillen. Voor het huidige doeleinde zijn deze condities hetzelfde gehouden voor ieder monster, om resultaten beter te kunnen vergelijken. De verbeterde situatie met consistent 1.000 liter monster en 20% opbrengst, inclusief opwerking met hemoflow, is binnen dit onderzoek niet bereikt. Vraag is of dit haalbaar is door aanpassingen in monstername-, opwerking en analyseprocedures. De derde optie met een kleiner monstervolume en hogere opbrengst is meer realistisch, wat blijkt uit het geoptimaliseerde monstervolume in Paragraaf 4.3.7.

5.6 Invloed opbrengst op de AMVD

Uit de simulaties blijkt dat een verbeterde opbrengst leidt tot minder onzekerheid over de gemiddelde pathogeenconcentratie, met name tot minder kans op overschatting van de concentratie met de MLE parameters van de gammaverdeling. Op dit moment wordt deze onzekerheid niet meegenomen in de AMVD en wordt alleen de MLE gebruikt in de berekeningen. Bij de huidige monstervolumes en recoveries lijkt dit op basis van de simulaties met name tot een grotere kans op overschatting van de concentratie te leiden, en daarmee tot overschatting van het risico met enkele logeenheden. Anderzijds lijkt uit de praktijkresultaten juist een grotere kans op onderschatting van de concentratie te leiden, en daarmee onderschatting van het risico. Hierbij moet worden bedacht dat dit onzekerheid in de stochastische interpretatie van monsterresultaten betreft, niet de onzekerheid van de analyseresultaten zelf.

Optimalisatie van de opbrengst, onder andere door het voorkomen van concentreren van volumes die tot te veel pellet leiden, kan daarmee bijdragen aan meer zekerheid in de AMVD. Dit kan tot enkele logeenheden invloed hebben op de zekerheid.

6 Conclusies en aanbevelingen

6.1 Conclusies

Historische data

- Uit historische data blijkt dat een groter monstervolume door lage recoveries niet altijd leidt tot een lagere meetgrens voor *Cryptosporidium* of *Giardia*.
- De concentratie met hemoflow is de grootste oorzaak van lage opbrengst van ColorSeeds in de praktijk. Deze lijkt belangrijker dan de opbrengst bij opwerking en analyse in het laboratorium.
- Er blijkt geen duidelijk verband tussen monstervolume en opbrengst van ColorSeeds in de praktijk.
- Hogere troebelheid en gesuspendeerde stoffen leiden tot een lagere opbrengst van ColorSeeds bij de opwerking en analyse in het laboratorium, maar dit verband verklaart de opbrengst niet volledig.
- Het type materiaal (bijvoorbeeld zand, klei, algen) heeft waarschijnlijk invloed op de opbrengst. Zo lijkt een verhoogde concentratie Cryptomonaden-pigment (type algen) te leiden tot een lagere opbrengst. Door de beperkte hoeveelheid data kon in dit onderzoek geen nadere relatie tussen type gesuspendeerd materiaal en opbrengst worden gemaakt.
- Onderzoek naar invloed van andere waterkwaliteitsparameters werd beperkt doordat er weinig metingen worden uitgevoerd gelijktijdig met monsternamen voor *Cryptosporidium* en *Giardia* analyse. Hoewel er geen sterke verbanden zijn gevonden voor de gemeten parameters, sluit dit eventuele verbanden niet uit.
- Er zijn geen sterke verbanden gevonden tussen weer-omstandigheden en de opbrengst.

Experimenten

- Een hoge dosering van UV afgedode organismen was niet mogelijk, omdat telling van gedoseerde ColorSeeds dan onbetrouwbaar zou worden. Bij de analyse kan geen onderscheid worden gemaakt tussen gedoseerde, UV afgedode organismen en organismen die al in het Lekwater aanwezig waren. Alleen voor drie experimenten waarbij deze achtergrondconcentratie in Lekwater is bepaald kon de opbrengst van ColorSeeds worden vergeleken met die van UV afgedode organismen.
- De opbrengst van ColorSeeds kwam, bij experimenten waarbij de achtergrondconcentratie bekend was en daarvoor is gecorrigeerd, zowel bij dosering voor als na hemoflow in twee van de drie metingen goed overeen met de opbrengst van UV-afgedode organismen. Bij een van de drie metingen werd 15 (inclusief hemoflow) tot 30 (exclusief hemoflow) procentpunt afwijking gevonden.
- Bij de experimenten was de opbrengst van ColorSeeds van alleen de hemoflow concentratie ongeveer gelijk aan die van de opwerking en analyse in het laboratorium. Het is niet duidelijk waarom dit afwijkt van de bevindingen uit historische gegevens.
- De opbrengst van opwerking en analyse van UV afgedode organismen en ColorSeeds in het laboratorium lijkt hoger voor *Cryptosporidium* (40->100%) dan voor *Giardia* (14->100%). Deze bevindingen zijn mogelijk

beïnvloed door een achtergrondconcentratie in het bemonsterde Lekwater. Het is niet duidelijk welke factoren deze opbrengst beïnvloeden. Waterkwaliteitsparameters zijn niet bepaald bij deze experimenten.

- Een groter monstervolume lijkt een negatieve invloed te hebben op de opbrengst van ColorSeeds inclusief hemoflow. Uit de experimenten bleek bij volumes < 100 liter een hoge opbrengst te worden bereikt. Er werd een optimaal monstervolume van 200 liter afgeleid waarbij het grootste gecorrigeerde volume bereikt werd. Ook bij dit volume is een aantal maal slechts een deel van het pellet onderzocht vanwege de grote hoeveelheid pellet. Wanneer bij monsternamen wordt geconstateerd dat er veel zwevende stof in het water zit kan men overwegen een kleiner volume te concentreren. Deze bevindingen betreffen een monsterlocaties, mogelijk kan het optimale monstervolume voor andere locaties afwijken door andere waterkwaliteit.
- Er is een verband tussen opbrengst van *Cryptosporidium* en *Giardia* ColorSeeds, wat aangeeft dat beide analyses door dezelfde factoren worden beïnvloed.
- De opbrengst van ColorSeeds neemt af bij grotere monstervolumes wanneer deze wordt bepaald inclusief hemoflow.
- Er is bij de experimenten geen relatie gevonden tussen monstervolume en opbrengst van ColorSeeds exclusief hemoflow.
- Bij de standaardprocedure wordt bij het aantreffen van een groen gekleurde protozoa gecontroleerd of deze ook rood gekleurd is en dus een ColorSeed is. Bij een aantal analyses is het gehele monster onderzocht op rode ColorSeeds. Het komt zelden voor dat een ColorSeed niet groen is. Data hierover zijn niet vastgelegd.
- Met de uitgevoerde experimenten kon niet worden bepaald of ColorSeeds de rode kleuring verliezen door de opwerkingsstappen.
- Bij de experimenten zijn enkele aanpassingen in de analyseprocedure, met name IMS, getest om de opbrengst te verbeteren. Geen van de aanbevelingen van de leverancier leidde tot een hogere opbrengst. Data hierover is niet vastgelegd.

Opbrengst en AMVD

- De zekerheid over de concentratieverdeling van organismen in ingenomen water wordt sterk bepaald door het aantal positieve monsters. Bij 8 of meer positieve monsters wordt minder dan 1 log onzekerheid verwacht.
- Het totaal aantal monsters wordt beperkt door beschikbare middelen en kosten. De meetgrens dient zo laag mogelijk te zijn, om zoveel mogelijk positieve monsters te verkrijgen. De meetgrens wordt bepaald door het monstervolume en de opbrengst. Aangezien een groter meetvolume tot een lagere opbrengst kan leiden, dient het monstervolume zorgvuldig te worden gekozen. De waterkwaliteit, met name de hoeveelheid en type gesuspenderde stof, heeft een belangrijke invloed op de opbrengst en kan per locatie en moment verschillen. Het optimale monstervolume kan daarom ook per locatie en moment verschillen.

6.2 Aanbevelingen

- Indien voor een locatie de ervaring is dat bij een monstervolume groter dan 200 liter voldoende recovery wordt bereikt, kan het huidige monstervolume worden aangehouden. Indien de recovery regelmatig te laag is (<10 ColorSeeds geteld), of er geen eerder analyses zijn uitgevoerd wordt aanbevolen een monstervolume van 200 liter aan te houden. Aanbevolen wordt de ervaringen hiermee per locatie goed te monitoren en zo nodig het monstervolume in de toekomst verder te optimaliseren voor een zo laag mogelijke meetgrens.
- Voorkom teveel pellet in het monster, omdat dan slechts een deelmonster kan worden onderzocht terwijl de opbrengst wel wordt gereduceerd. Aanbevolen wordt nader te onderzoeken of troebelheidsmeting (of andere metingen) in de praktijk de hoeveelheid pellet kan voorspellen ten tijde van monsternamens. Kennis van de locatie kan ook bijdragen om de hoeveelheid pellet te voorspellen.
- Er zijn indicaties dat algen de opbrengst negatief beïnvloeden. Bedrijven kunnen onderzoeken of het aandeel algen in een monster kan worden geminimaliseerd door de monsterlocatie of het monsternamemoment aan te passen.
- Onderzocht kan worden of een monsterpunt bovenstrooms van het laatste open water kan worden gekozen voor de AMVD metingen. Bij hogere concentraties pathogenen kan dan een kleiner monstervolume voldoen en zijn hogere recoveries waarschijnlijk, waardoor de concentratie *Cryptosporidium* en *Giardia* in de grondstof zo betrouwbaar mogelijk bepaald kan worden. Dit is relevant, omdat dit het uitgangspunt is van de AMVD. Hierbij dient wel rekening te worden gehouden met verwijdering of inactivatie tussen het meetpunt en het laatste open water. Als er in het laatste open water significante herbesmetting op kan treden door bronnen die humaanpathogene *Cryptosporidium* of *Giardia* kunnen herbergen, zoals afstromend water van landbouw in een bekken, is dit geen goede optie.
- Onderzocht kan worden of een andere analysemethode (bijvoorbeeld moleculair) kan worden gebruikt voor de AMVD zonder dat dit leidt tot serieuze/significante overschatting van het risico door het meten van niet-infectieuze organismen. De mate waarin dit relevant is, is ook afhankelijk van de aanwezige zuiveringsstappen. Moleculaire methoden kunnen ook voordelen bieden door specifiek menspathogene soorten te bepalen. Vergaande concentratie blijft echter nodig, waardoor ook DNA-extractie kan worden gestoord.
- Andere hemoflow condities of andere concentratiemethoden kunnen worden onderzocht of ontwikkeld die een hogere opbrengst geven. Huidig onderzoek biedt echter weinig aanknopingspunten voor verbetering.

7 Referenties

BioPoint (2019) Tips on improving *Cryptosporidium* & *Giardia* recoveries. Issue: 1, October 2019 © BioPoint Pty Ltd. 2019

Bukhari, Z., et al. (1998). ""Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* parvum from source water samples of various turbidities."" *Appl Environ Microbiol* 64(11): 4495-4499.

Campbell, A. and H. Smith (1997). Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from water samples: round robin comparison of techniques. *Water Science and Technology* 35(11-12): 397-401.

DiGiorgio, C. L., et al. (2002). *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using environmental protection agency method 1623. *Appl Environ Microbiol* 68(12): 5952-5955.

Fradette, M. S., Culley, A. I., & Charette, S. J. (2022). Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in environmental water samples: a journey into the past and new perspectives. *Microorganisms*, 10(6), 1175.

Francy, D. S., et al. (2004). "Effects of seeding procedures and water quality on recovery of *Cryptosporidium* oocysts from stream water by using US Environmental Protection Agency Method 1623." *Appl Environ Microbiol* 70(7): 4118-4128.

Hu, J.; Feng, Y.; Ong, S.L.; Ng, W.J.; Song, L.; Tan, X.; Chu, X. Improvement of Recoveries for the Determination of Protozoa *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water Using Method 1623. *J. Microbiol. Methods* 2004, 58, 321–325.

Kim, K.J.; Jung, H.H.; Lee, K. Evaluation of Cyst Loss in Standard Procedural Steps for Detecting of *Giardia* Lamblia and *Cryptosporidium* Parvum in Water. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2006, 11, 368–371.

Kothavade, R.J. Potential Molecular Tools for Assessing the Public Health Risk Associated with Waterborne *Cryptosporidium* Oocysts. *J. Med. Microbiol.* 2012, 61, 1039–1051.

Kuhn, R. C. and K. H. Oshima (2002). Hollow-fiber ultrafiltration of *Cryptosporidium* parvum oocysts from a wide variety of 10-L surface water samples. *Can J Microbiol* 48(6): 542-549.

Kuhn, R. C., et al. (2002). Effects of pH and magnetic material on immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from concentrated water samples. *Appl Environ Microbiol* 68(4): 2066-2070.

KWR (2025) Pathobase, pathogen monitoring data base. KWR Nieuwegein
MDDELCC Bilan de La Qualité de l'Eau Potable Au Québec: 2010–2014. Available online:
<http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/potable/bilans/bilan-qualite2010-2014.pdf> (accessed on 6 June 2017).

MDDELCC Bilan de La Qualité de l'Eau Potable Au Québec: 2010–2014. Available online:
<http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/potable/bilans/bilan-qualite2010-2014.pdf> (accessed on 6 June 2017).

Moore, A., et al. (1998). "Viable *Cryptosporidium* parvum oocysts exposed to chlorine or other oxidising conditions may lack identifying epitopes." *International journal for parasitology* 28(8): 1205-1212.

Rodgers, M.R.; Flanigan, D.J.; Jakubowski, W. Identification of Algae Which Interfere with the Detection of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts and a Method for Alleviating This Interference. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61, 3759–3763.

Sammarro Silva, Kamila Jessie, and Lyda Patricia Sabogal-Paz. "Giardia spp. cysts and Cryptosporidium spp. oocysts in drinking water treatment residues: comparison of recovery methods for quantity assessment." Environmental Technology 42.20 (2021): 3144-3153.

Simmons III, O. D., et al. (2001). Evaluation of USEPA method 1622 for detection of *Cryptosporidium* oocysts in stream waters. Journal-American Water Works Association 93(1): 78-87.

Smeets, P. W. M. H. and G. J. Medema (2013). Methods to interpret QMRA outcomes. 17th International on Health-Related Water Microbiology Symposium Water Micro, Florianópolis, Brazil

Smeets, P. W. M. H. (2017, 15-19 May). Separating Uncertainty from Variability in QMRA to Support Management Decisions. Paper presented at the The 19th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, North Carolina, Chapel Hill, USA.

USEPA "U. S. Environmental Protection Agency. 2003. Source water monitoring guidance manual for public water systems for the Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule (LT2 Rule). U.S. Environmental Protection Agency publication no. 815/D-03-005. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C."

USEPA "U.S. Environmental Protection Agency. 2001. Implementation and results of the information collection rule supplemental surveys. U.S. Environmental Protection Agency publication no. 815-R-01-003. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C."

Veenendaal H.R. en Brouwer-Hanzens A.J. 2007 Een methode voor het concentreren van grote volumes water. BTO 2007.051

Warnecke, M., C. Weir, and G. Vesey. "Evaluation of an internal positive control for *Cryptosporidium* and *Giardia* testing in water samples." *Letters in applied microbiology* 37.3 (2003): 244-248.

Werner, J. (2022) Incorporating recovery of large volume samples in risk-based monitoring strategies. Master's Thesis - Water Science and Management. Utrecht University, the Netherlands

WHO. (2016). Quantitative microbial risk assessment: application for water safety management. Geneva.

I BIJLAGE HISTORISCHE DATA

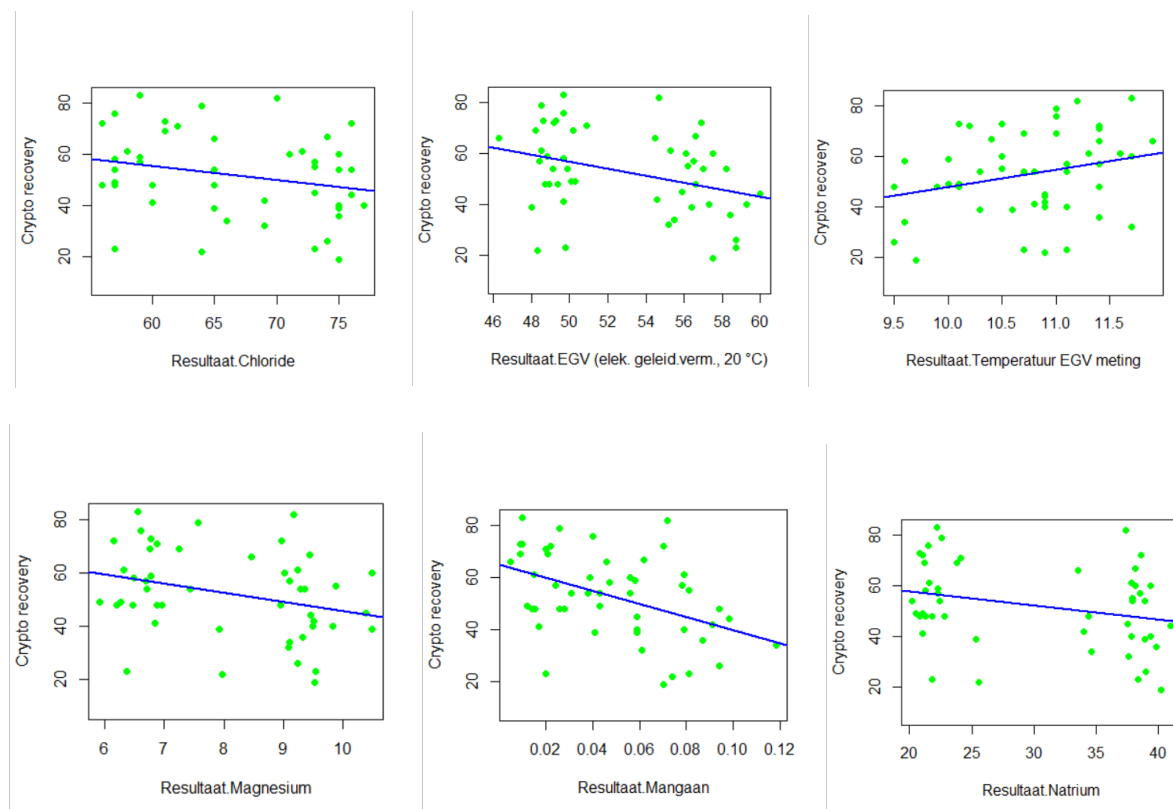
Inleiding

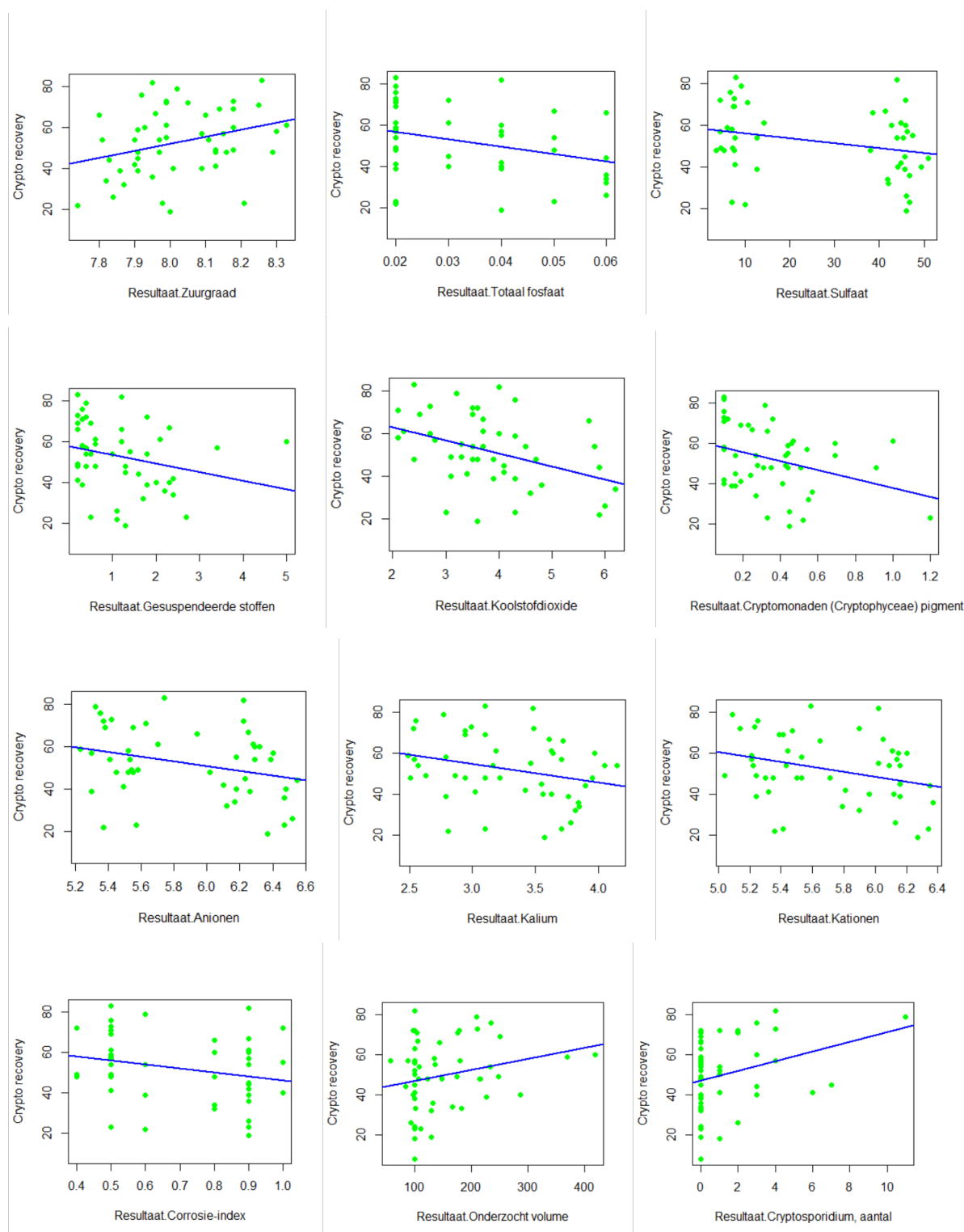
In deze bijlage staat beschreven welke data is verkregen en hoe deze is samengevoegd en eventuele andere opmerkingen. Dit kan behulpzaam zijn bij toekomstige onderzoeken waarbij data van verschillende laboratoria wordt gecombineerd. Daarnaast zijn alle resultaten van de statistische analyses opgenomen en opmerkingen bij de data en bevindingen.

Het waterlaboratorium (HWL)

Dit lab doet zelf de analyses exclusief hemoflow.

- Data staat in losse files per locatie, deze zijn aan elkaar verbonden. De data is omgezet naar 'wide' formaat met in rijen samples ('Monsternummer'), in kolommen variabelen ('Componenten').
- De opbrengst is toegevoegd door de berekening: 'Crypto_Opbrengst' <- ('Cryptosporidium, CS geteld' / 'Cryptosporidium, CS toegevoegd') * 100.
- Het blijkt dat de 'Cryptosporidium, CS geteld' toch al de opbrengst is, en de 'Cryptosporidium, CS toegevoegd' is altijd op 100 gezet door HWL.
- Statistieken: originele data bevat 2997 samples met 305 gemeten variabelen. In 82 samples kon de opbrengst voor *Cryptosporidium* berekend worden. In deze samples zijn er 137 variabelen die in meer dan 10 samples een gerapporteerde waarde hebben (dus niet leeg). Hiermee is de analyse gedaan.
- Alle samples waarvoor de Opbrengst kon worden uitgerekend, vielen NA 1 jan 2020 en zijn dus allemaal NA hemoflow.
- Alleen plots waar de regressie licht significant is ($P < 0.1$) zijn getoond.



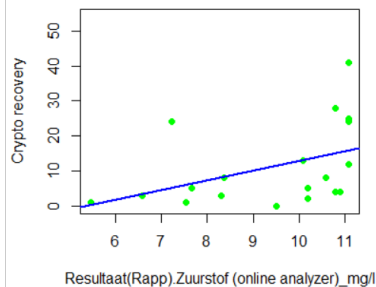
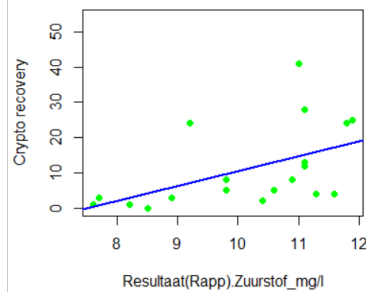
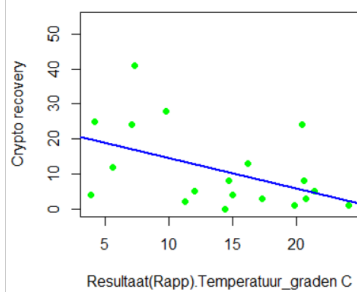


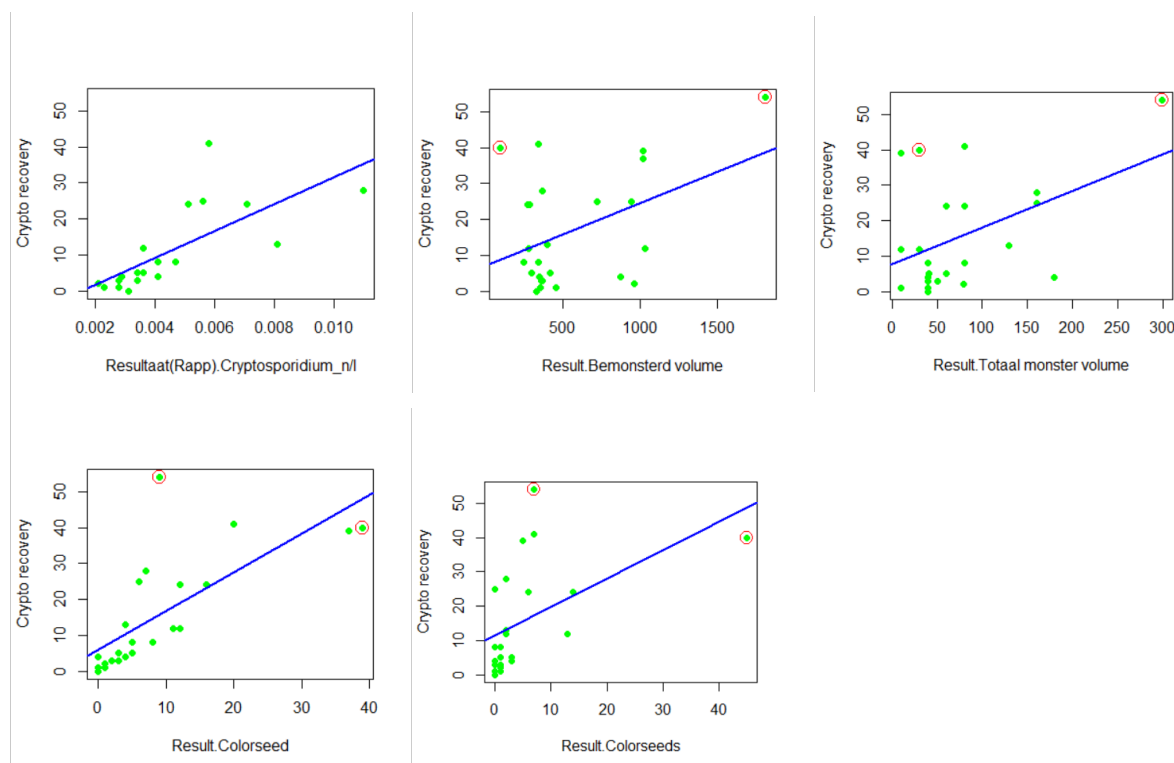
Waterlaboratorium Noord (WLN)

Voor WLN is de data die op verzoek verkregen is van WLN gekoppeld aan de analyses die gedaan zijn door KWR.

- Voor beide files is de data omgezet naar 'wide' formaat met in rijen samples ('Monsternummer'), in kolommen variabelen ('Componenten').
- De WLN data bevat 316 samples 'Monster' met 359 gerapporteerde variabelen.
- De KWR data (geselecteerd op WLN relevantie) bevat slechts 27 samples die opbrengst bevatten. Dat is al weinig om mee te beginnen. Maar 19 daarvan zijn ook in de WLN data aanwezig.

- De KWR data bevatten variabelen 'ColorSeed' en 'ColorSeeds' welke beiden in samples zitten, verschillende benaming voor dezelfde parameter.
- Als de data gematcht wordt op samplenummer 'Sample.ID' (KWR) en 'Monster' (WLN) dan zijn er maar 23 variabelen in de 19 samples die meer dan 10 keer gemeten zijn. Dat zijn er maar 5 meer dan de KWR data zelf.
- Er zijn veel samples in de WLN data die rond dezelfde tijd zijn genomen 'Monsterdatum' als ze zijn ontvangen door KWR 'Sample.Receive'. Daarom is een andere matching gedaan, op plek-weekjaar.
- Bij het op datum matchen, blijven er nu 68 variabelen die meer dan 10 keer gerapporteerd zijn in 25 samples. Hiermee is de analyse gedaan.
- Twee van de samples zijn van na 1 jan 2020, dus NA hemoflow. Deze worden aangegeven met een rode kring, als deze samples in het plot zijn gekomen. Alleen plots waar de regressie licht significant is ($P < 0.1$) zijn getoond.
- De regressie is berekend met alle datapunten, inclusief na hemoflow

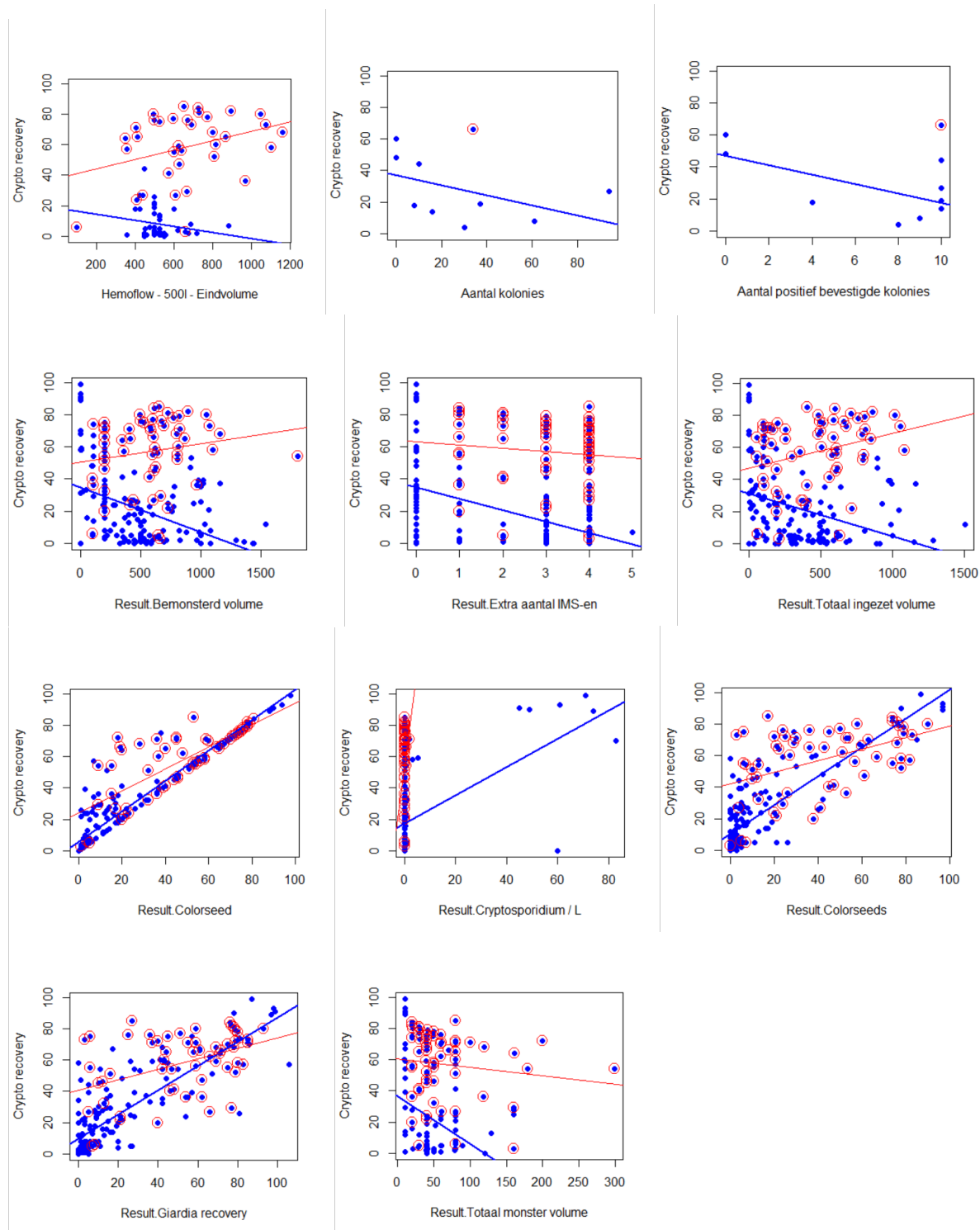




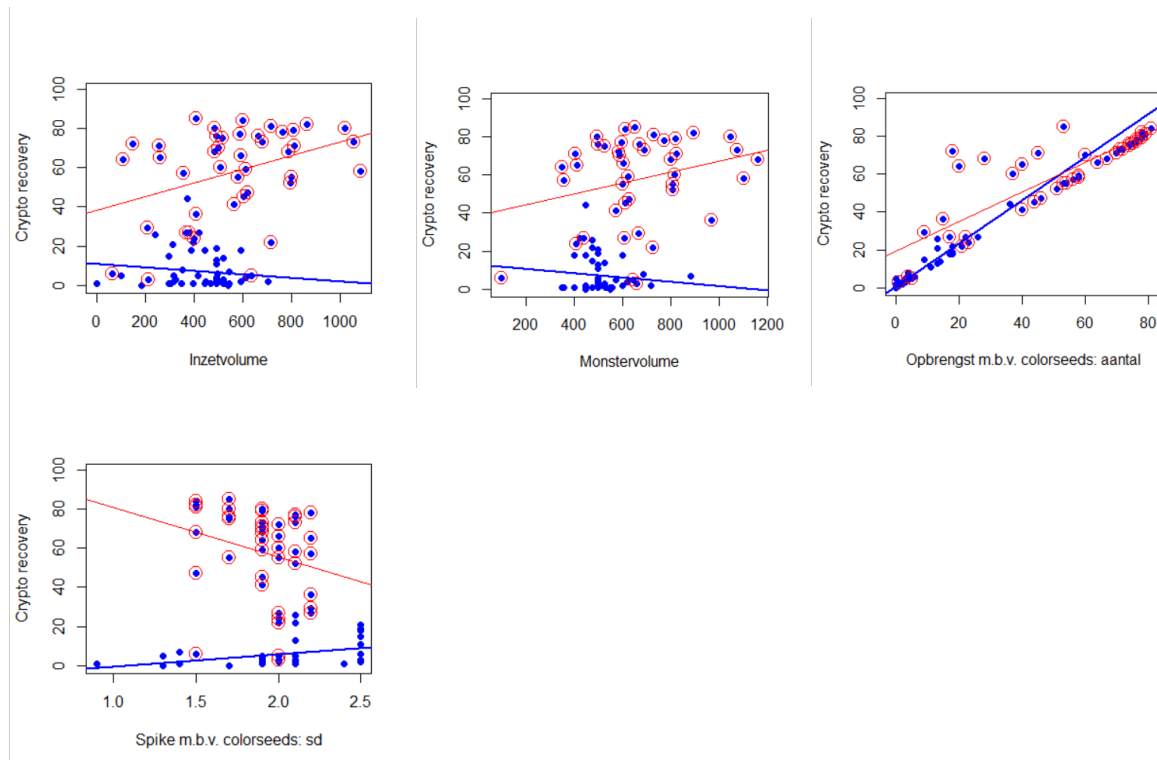
Aqualab Zuid (AQZ)

Voor AQZ is de data die op verzoek verkregen is van AQZ gekoppeld aan de analyses die gedaan zijn door KWR. Er zijn twee bestanden verkregen, een op basis van samplenummer en een waarbij ook andere variabelen in de periode zijn gemeten. Eerst is het samplenummer bestand geanalyseerd.

- De gebruikte KWR data is nu alle KWR data rond *Giardia* en *Cryptosporidium*, en bestaat uit 226 unieke samples van 68 locaties. Er zijn 19 variabelen. Sommige samples zijn te matchen met AQZ.
- Voor beide files is de data is omgezet naar 'wide' formaat met in rijen samples ('Monsternummer'), in kolommen variabelen ('Componenten').
- De AQZ data heeft 128 samples. Van 24 locaties. Er zijn 600 gerapporteerde variabelen. Naast een 'MO_Monsternummer.-AQZ' ID heeft het ook een KWR-ID voor de samples: 'Sample.ID.KWR'. Deze wordt gebruikt voor het samenvoegen.
- In de AQZ data zijn er maar 18 variabelen die meer dan 10 keer worden gerapporteerd in de 128 samples. Elk sample heeft dus relatief 'eigen' gerapporteerde variabelen. Het gaat vooral om chemische componenten. Het gaat niet om schrijffouten (een enkele daargelaten).
- De KWR en AQZ data samen hebben 223 samples met 35 variabelen met meer dan 10 rapportages. De helft is na 1 jan 2020 (exclusief hemoflow) en de andere helft van voor deze datum. Dosering van ColorSeeds na hemoflow is aangegeven met een rode kring in de plots.
- De plots zijn getoond als EEN van beide regressies (voor of na hemoflow) licht significant is ($P < 0.1$).



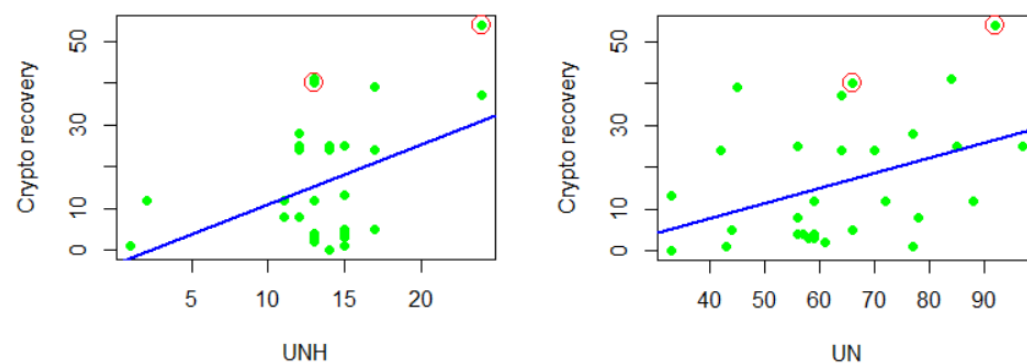
- In de 'extra' aangeleverde data van AQZ zitten 647 sample-ID's. Met 20 variabelen.
- Deze matchen we met de KWR data op basis van week en 'klantcode' wat voor de locatie lijkt te staan.
- Er zijn 27 variabelen die meer dan 10 waarden hebben gerapporteerd. Deels komen die weer uit de KWR data zelf. Dit levert dus ook niet veel nieuwe variabelen op om te vergelijken met opbrengst. De 'nieuwe' variabelen tov de eerste AQZ data staan hieronder weergegeven.

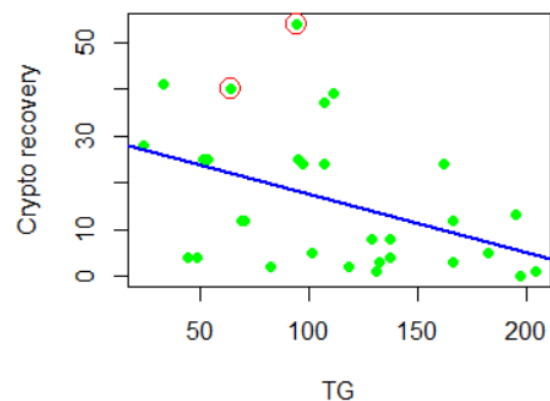
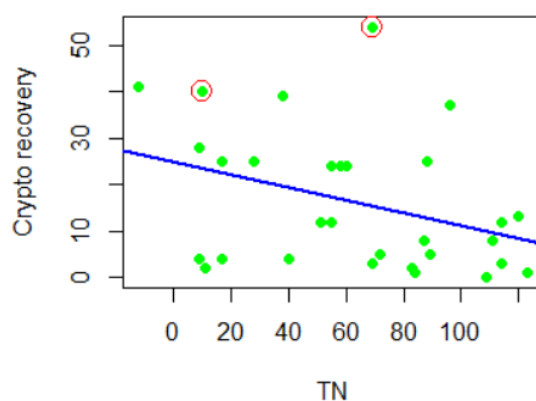
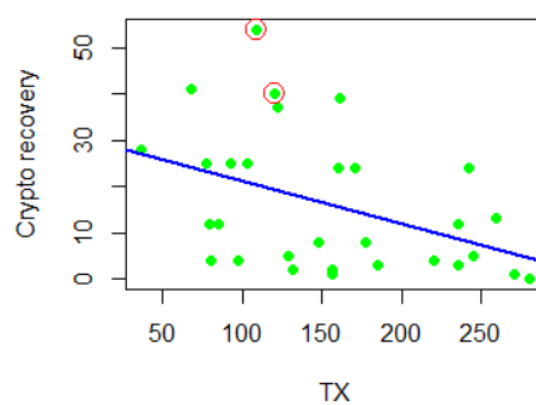
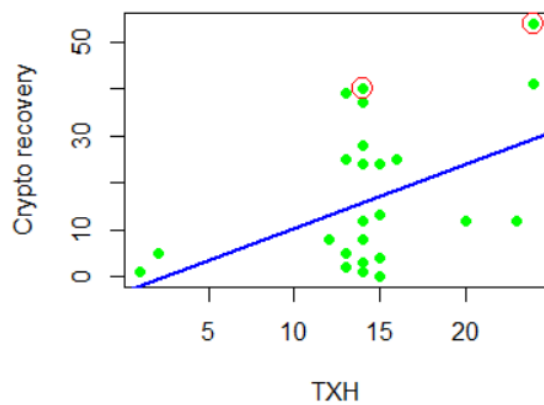
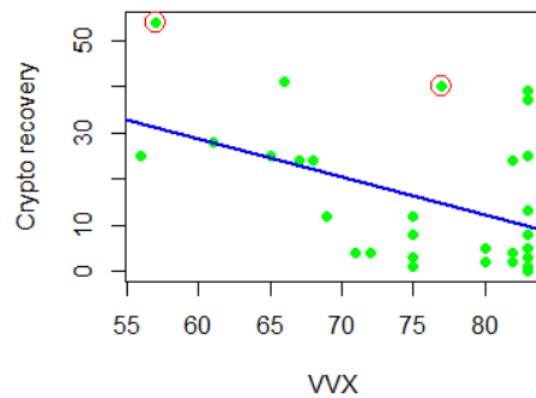
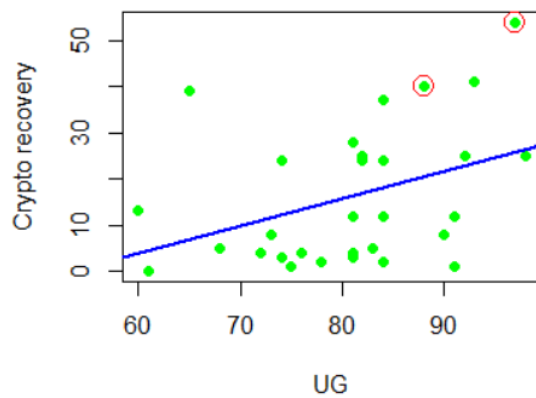


WLN met weerdata KNMI: weerstation Eelde

Weerdata van het KNMI is gekoppeld aan WLN data. De weerdata is gekoppeld met WLN data op basis van de datum van het sample dat genomen is in de WLN data, niet de KWR ontvangen data. De opbrengst lijkt te correleren met temperatuur en luchtvochtigheid. Bij *Giardia* (plots onder de variabelen omschrijving) is ook windsnelheid, verdamping (gewas) en zicht gecorreleerd, dit kan met luchtvochtigheid te maken hebben. De correlatie met het uur waarin de weersparameter is gemeten is niet logisch, 0 is hetzelfde als 24. De lage/hoge waarden van opbrengst in deze plots / regressie zijn ook maar enkele punten en dus niet betrouwbaar. De metingen na hemoflow zijn aangegeven met rode cirkels.

- De regressie is berekend met alle datapunten, ook na hemoflow.





Verklaring weersvariabelen:

- TG = Etmaalgemiddelde temperatuur (in 0.1 graden Celsius) / Daily mean temperature (in 0.1 degrees Celsius)
- TN = Minimum temperatuur (in 0.1 graden Celsius) / Minimum temperature (in 0.1 degrees Celsius)
- TX = Maximum temperatuur (in 0.1 graden Celsius) / Maximum temperature (in 0.1 degrees Celsius)
- TXH = Uurvak waarin TX is gemeten / Hourly division in which TX was measured

VVX = Maximum opgetreden zicht / Maximum visibility; 0: <100 m, 1:100-200 m, 2:200-300 m,..., 49:4900-5000 m, 50:5-6 km, 56:6-7 km, 57:7-8 km,..., 79:29-30 km, 80:30-35 km, 81:35-40 km,..., 89: >70 km)

UG = Etmaalgemiddelde relatieve vochtigheid (in procenten) / Daily mean relative atmospheric humidity (in percents)

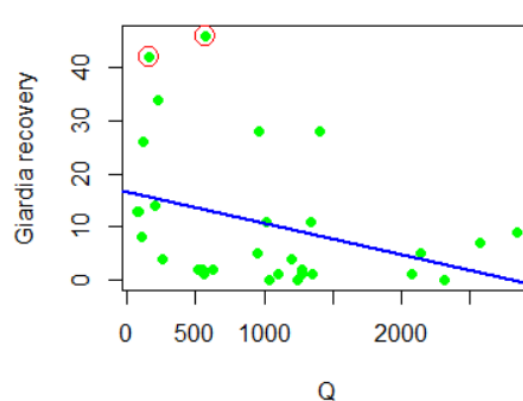
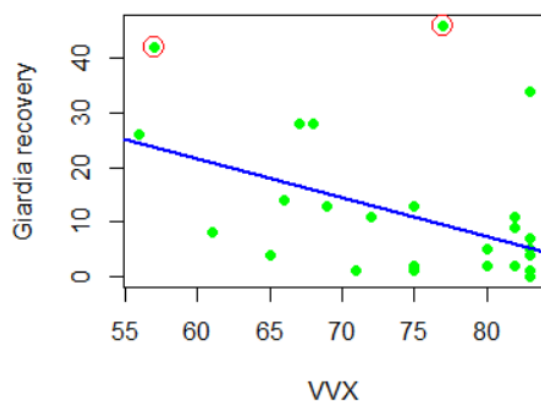
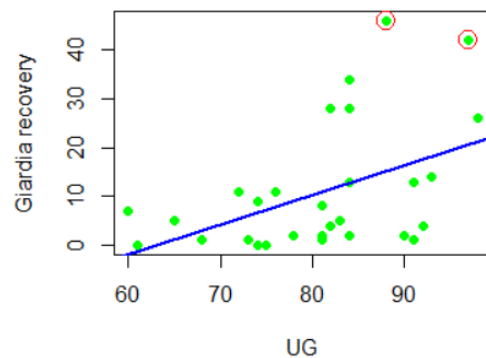
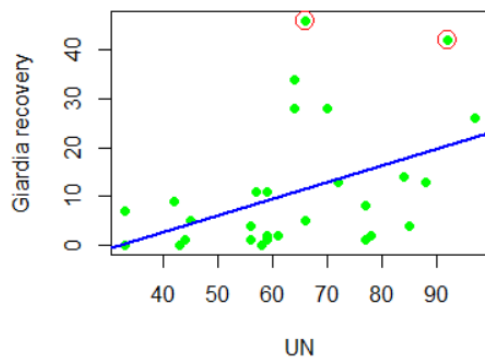
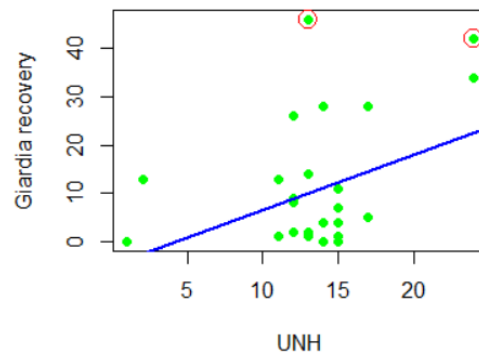
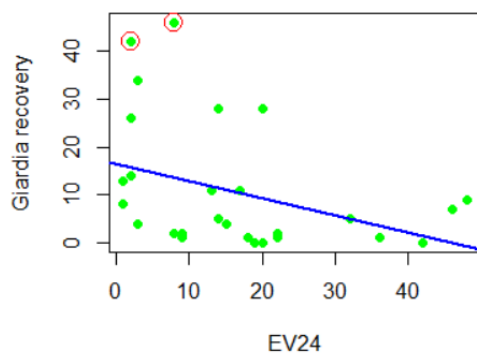
UN = Minimale relatieve vochtigheid (in procenten) / Minimum relative atmospheric humidity (in percents)

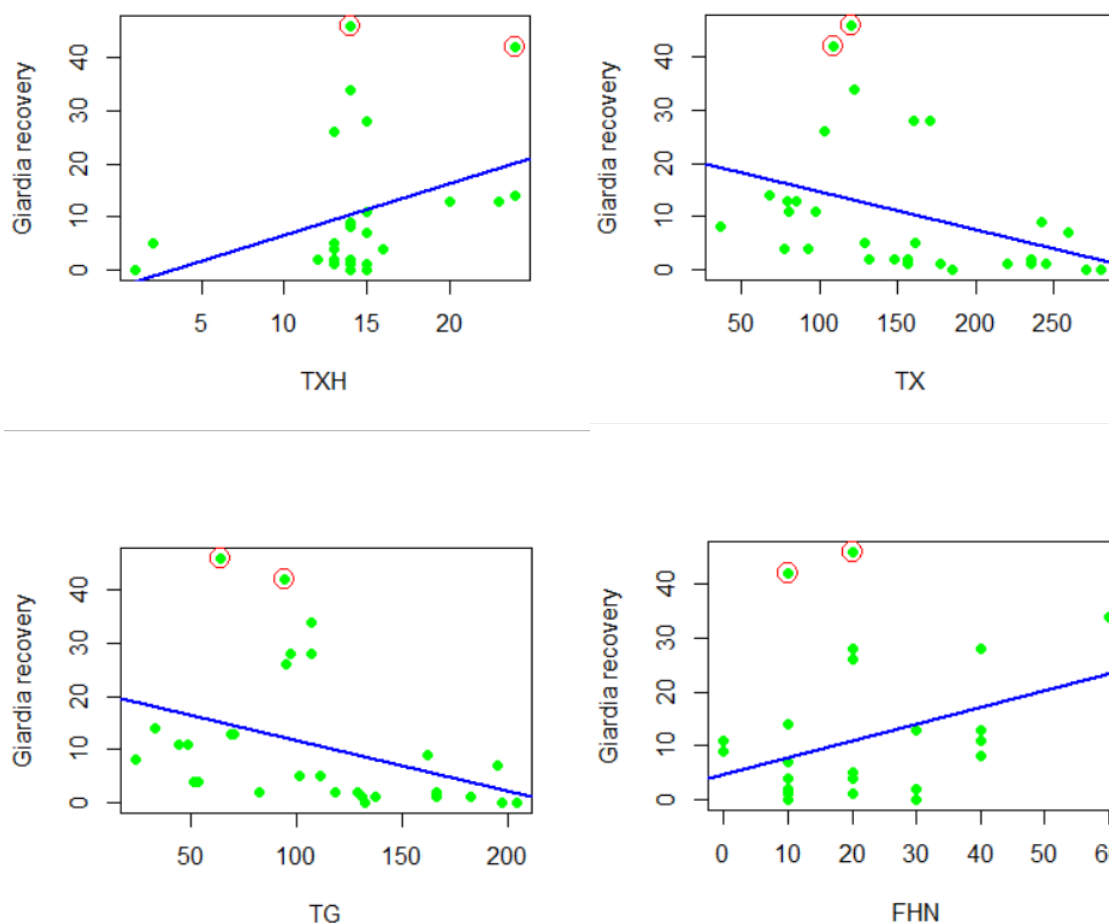
UNH = Uurvak waarin UN is gemeten / Hourly division in which UN was measured

Q = Globale straling (in J/cm²) / Global radiation (in J/cm²)

EV24 = Referentiegewasverdamping (Makkink) (in 0.1 mm) / Potential evapotranspiration (Makkink) (in 0.1 mm)

FHN = Laagste uurgemiddelde windsnelheid (in 0.1 m/s) / Minimum hourly mean windspeed (in 0.1 m/s)





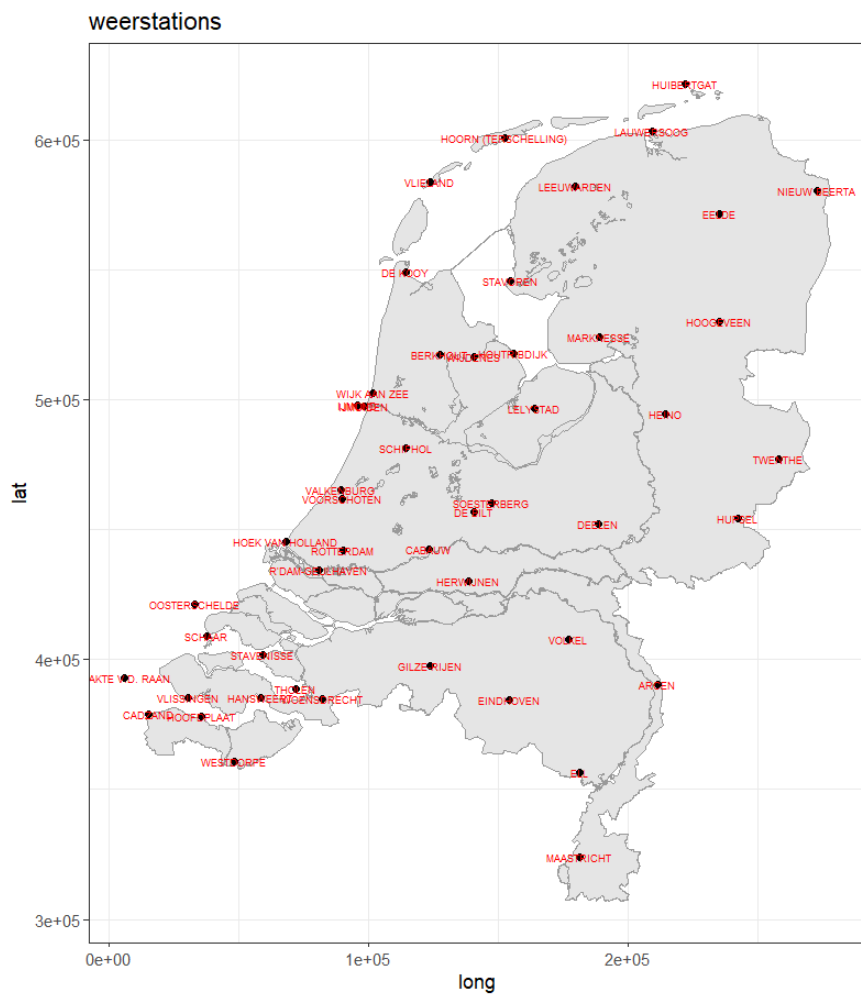
In Bijlage 1A en Bijlage 1B worden de variabelen en hun verhouding ten opzichte van elkaar gevisualiseerd. In Bijlage A is dit in de vorm van een hiërarchische clustering. In Bijlage B is het een correlatienetwerk, gecorreleerde variabelen (>0.6 of <-0.6) zijn hier verbonden met elkaar. Gecorreleerde variabelen die niet rechtstreeks verbonden zijn met de *Giardia* of *Cryptosporidium* opbrengst, zijn weggelaten.

Opmerkingen

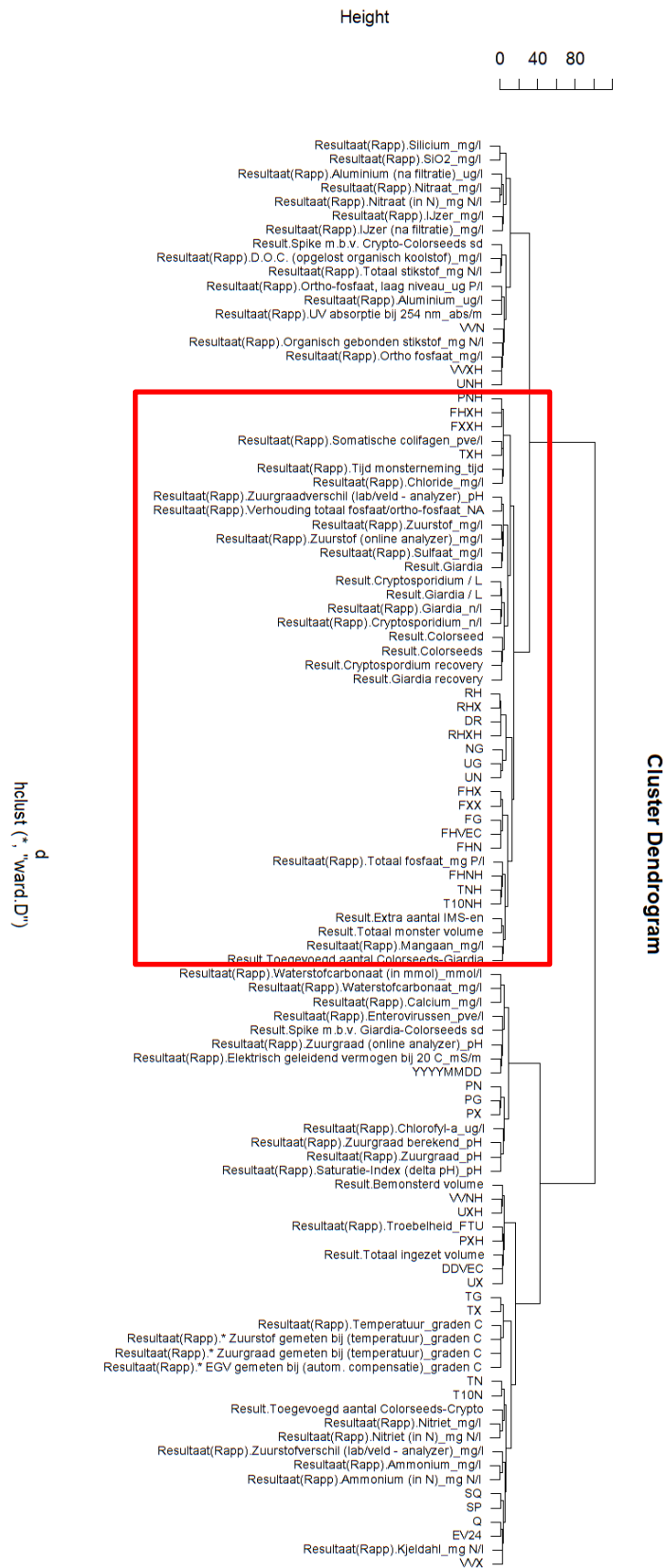
De resultaten zijn betrouwbaar als dezelfde variabele in verschillende datasets invloed hebben op de opbrengst. Dat geldt mogelijk ook voor *Cryptosporidium* en *Giardia* opbrengst, het is goed voor de betrouwbaarheid als dezelfde variabelen daar invloed op opbrengst hebben.

De data hebben een aantal tekortkomingen. De HWL data laten correlaties zien tussen opbrengst en een aantal andere parameters gemeten in water, bijvoorbeeld metalen en zuurgraad, troebelingsgraad. Deze parameters zijn niet geleverd in de data van AQZ en HWL. Bij WLN komen zuurstof en temperatuur naar voren, deze zijn wederom niet geleverd in de andere labs. Bij AQZ is er geen koppeling te maken met parameters omdat deze niet vaak genoeg gerapporteerd zijn in de geleverde data. Er is in de data van AQZ te zien dat de analyse voor en na hemoflow anders kan correleren met variabelen. WLN heeft bijna alleen voor hemoflow. HWL heeft uitsluitend na hemoflow.

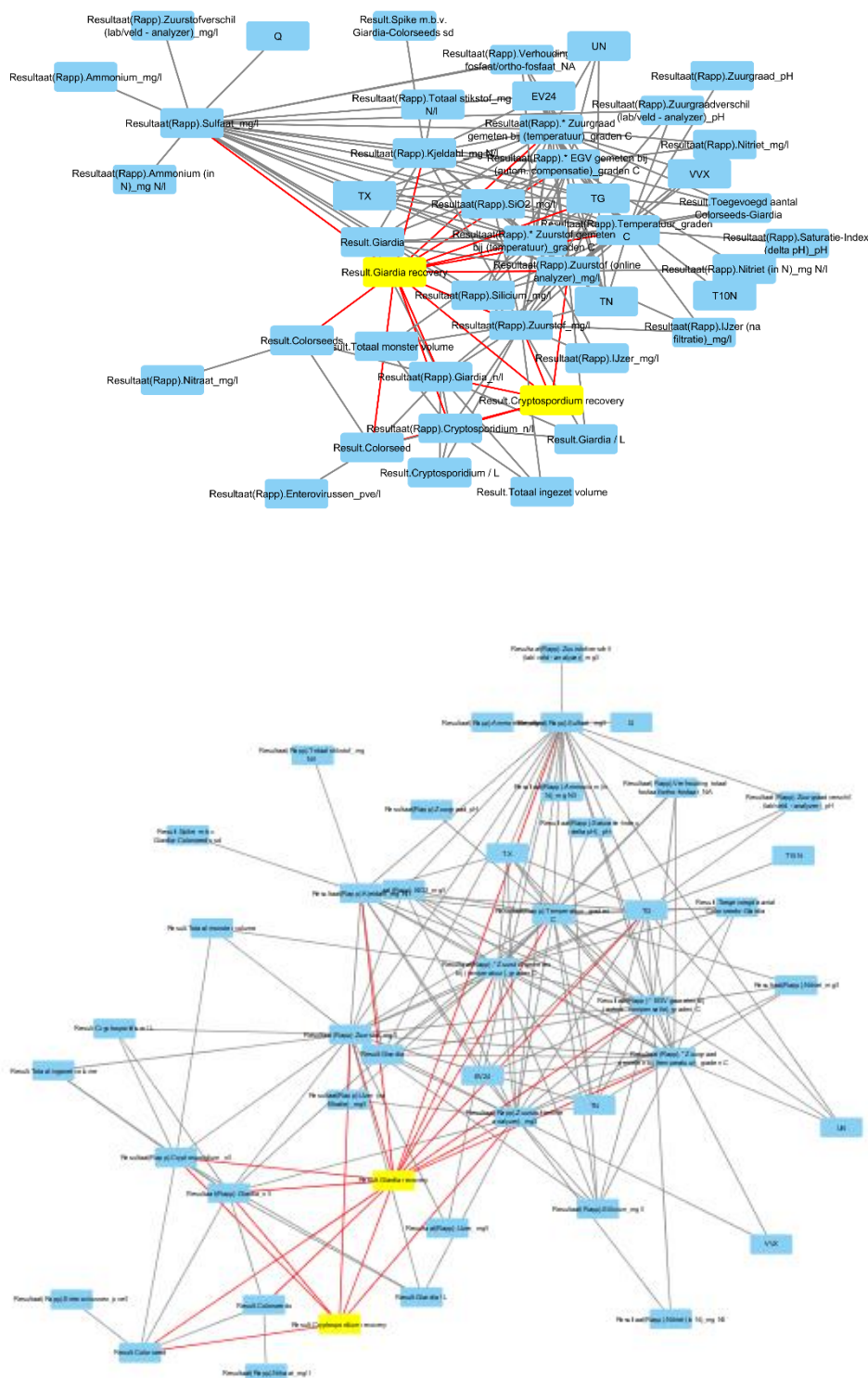
Een kaart met de coördinaten van de weerstations staat hieronder.



Bijlage 1A. WLN clustering van parameters gebaseerd op correlatie (Pearson) van parameters ten opzichte van elkaar.



Bijlage 1B. Correlatie netwerk rond *Cryptosporidium* en *Giardia* opbrengst (in geel). Tweede visualisatie: zelfde netwerk, andere layout.



Bijlage 1C. Variabelen die zijn beoordeeld per bedrijf. Alleen licht significante ($p < 0.1$) zijn in de figuren gezet.

AQZ gematcht met KWR op sample-ID, variabelen die in >10 samples voorkomen:

- [1] "Sample.ID.KWR"
- [2] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Datum"
- [3] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Extra IMS meting, 3 maal"
- [4] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.hemoflow - 500l - Beginvolume"
- [5] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.hemoflow - 500l - Eindvolume"
- [6] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.hemoflow - 500l - Gefiltreerd volume"
- [7] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Tijdstip monsterneming"
- [8] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Aantal kolonies"
- [9] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Aantal positief bevestigde kolonies"
- [10] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Extra IMS meting, 1 maal"
- [11] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.hemoflow"
- [12] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Tappen 40 litervat"
- [13] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Extra IMS meting, 4 maal"
- [14] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.hemoflow - 1500l - Beginvolume"
- [15] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.hemoflow - 1500l - Eindvolume"
- [16] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.hemoflow - 1500l - Gefiltreerd volume"
- [17] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Centricon na hemoflow"
- [18] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Somatische colifagen"
- [19] "Result.Bemonsterd volume"
- [20] "Result.Extra aantal IMS-en"
- [21] "Result.Totaal ingezet volume"
- [22] "Result.Toegevoegd aantal ColorSeeds-Crypto"
- [23] "Result.Cryptosporidium"
- [24] "Result.ColorSeed"
- [25] "Result.Cryptosporidium / L"
- [26] "Result.Cryptosporidium opbrengst"
- [27] "Result.Toegevoegd aantal ColorSeeds-Giardia"
- [28] "Result.Giardia"
- [29] "Result.ColorSeeds"
- [30] "Result.Giardia / L"
- [31] "Result.Giardia opbrengst"
- [32] "Result.Totaal monster volume"
- [33] "Result.Spike m.b.v. Crypto-ColorSeeds sd"
- [34] "Result.Spike m.b.v. Giardia-ColorSeeds sd"
- [35] "Result.ColorSeeds toegevoegd"

AQZ gematcht met KWR op datum (per week op dezelfde plek) >10 samples voorkomen

- [1] "datum_punt"
- [2] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Aantal"
- [3] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Cryptosporidium"
- [4] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Inzetvolume"
- [5] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Monstervolume"
- [6] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Opbrengst m.b.v. ColorSeeds: aantal"
- [7] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Rendement"
- [8] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Spike m.b.v. ColorSeeds: aantal"

- [9] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.Spike m.b.v. ColorSeeds: sd"
- [10] "CO_Gerapporteerd_Resultaat.*Giardia*"
- [11] "Result.Bemonsterd volume"
- [12] "Result.Extra aantal IMS-en"
- [13] "Result.Totaal ingezet volume"
- [14] "Result.Toegevoegd aantal ColorSeeds-Crypto"
- [15] "Result.*Cryptosporidium*"
- [16] "Result.ColorSeed"
- [17] "Result.*Cryptosporidium* / L"
- [18] "Result.Cryptosporidium opbrengst"
- [19] "Result.Toegevoegd aantal ColorSeeds-*Giardia*"
- [20] "Result.*Giardia*"
- [21] "Result.ColorSeeds"
- [22] "Result.*Giardia* / L"
- [23] "Result.*Giardia* opbrengst"
- [24] "Result.Totaal monster volume"
- [25] "Result.Spike m.b.v. Crypto-ColorSeeds sd"
- [26] "Result.Spike m.b.v. *Giardia*-ColorSeeds sd"
- [27] "Result.ColorSeeds toegevoegd"

HWL variabelen (geen KWR nodig) die meer dan 10 samples voorkomen:

- [1] "Monsternummer"
- [2] "Resultaat.Aluminium gefiltreerd"
- [3] "Resultaat.Arseen"
- [4] "Resultaat.Bromaat"
- [5] "Resultaat.Calcium"
- [6] "Resultaat.Campylobacter (onbevestigd) in gef. vol."
- [7] "Resultaat.Campylobacter (onbevestigd)"
- [8] "Resultaat.Chloride"
- [9] "Resultaat.Sporen van sulfiet-reducerende clostridia"
- [10] "Resultaat.Bacteriën van de coligroep (37 °C, onbevestigd)"
- [11] "Resultaat.Clostridium perfringens (onbevestigd)"
- [12] "Resultaat.Clostridium perfringens (bevestigd)"
- [13] "Resultaat.Escherichia coli (bevestigd)"
- [14] "Resultaat.EGV (elek. geleid.verm., 20 °C)"
- [15] "Resultaat.Temperatuur EGV meting"
- [16] "Resultaat.Enterococcen (onbevestigd)"
- [17] "Resultaat.Enterococcen (bevestigd)"
- [18] "Resultaat.Enterovirussen"
- [19] "Resultaat.Enterovirussen meting"
- [20] "Resultaat.IJzer"
- [21] "Resultaat.Troebelingsgraad"
- [22] "Resultaat.Waterstofcarbonaat"
- [23] "Resultaat.Totale hardheid"
- [24] "Resultaat.Kleurintens., Pt/Co-schaal"
- [25] "Resultaat.Magnesium"
- [26] "Resultaat.Mangaan"
- [27] "Resultaat.Tijdstip monsterneming"
- [28] "Resultaat.Natrium"

- [29] "Resultaat.Ammonium"
- [30] "Resultaat.Stikstof, Kjeldahl"
- [31] "Resultaat.Nitriet"
- [32] "Resultaat.Nitraat"
- [33] "Resultaat.Organisch gebonden stikstof"
- [34] "Resultaat.Stikstof, totaal"
- [35] "Resultaat.Zuurstof, opgelost"
- [36] "Resultaat.Zuurgraad"
- [37] "Resultaat.Temperatuur pH meting"
- [38] "Resultaat.Zuurgraad, berekend naar de actuele temperatuur"
- [39] "Resultaat.Orthofosfaat"
- [40] "Resultaat.Totaal fosfaat"
- [41] "Resultaat.Sulfaat"
- [42] "Resultaat.Gesuspendeerde stoffen"
- [43] "Resultaat.Temperatuur"
- [44] "Resultaat.Totaal organisch koolstof (TOC)"
- [45] "Resultaat.Carbonaat"
- [46] "Resultaat.Koolstofdioxide"
- [47] "Resultaat.Campylobacter (bevestigd)"
- [48] "Resultaat.Opbrengst Somatische colifagen"
- [49] "Resultaat.Concentratiefactor"
- [50] "Resultaat.Somatische colifagen per analysevolume"
- [51] "Resultaat.Analysevolume"
- [52] "Resultaat.Somatische colifagen"
- [53] "Resultaat.Somatische colifagen per anal.vol. (NC)"
- [54] "Resultaat.Analysevolume (NC)"
- [55] "Resultaat.Somatische colifagen na concentratie"
- [56] "Resultaat.Volume"
- [57] "Resultaat.Groenalgen (Chlorophyceae) pigment"
- [58] "Resultaat.Cyanobacteriën (Cyanophyceae) pigment"
- [59] "Resultaat.Cryptomonaden (Cryptophyceae) pigment"
- [60] "Resultaat.Totaal chlorofyl"
- [61] "Resultaat.Kiezelalgen (Khakista)"
- [62] "Resultaat.Dierlijke organismen, totaal"
- [63] "Resultaat.Dominante soort"
- [64] "Resultaat.Schaalamoeben (Testacea)"
- [65] "Resultaat.Beerderen (Tardigrada)"
- [66] "Resultaat.Raderdieren (Rotifera)"
- [67] "Resultaat.Wimperdieren (Ciliata)"
- [68] "Resultaat.Mosselkreeften (Ostracoda)"
- [69] "Resultaat.Watervlooien (Cladocera)"
- [70] "Resultaat.Harpacticoïda (roeipootkreeft)"
- [71] "Resultaat.Cyclopoïda (roeipootkreeft)"
- [72] "Resultaat.Naupliuslarven"
- [73] "Resultaat.Buikharigen (Gastrotricha)"
- [74] "Resultaat.Borstelwormen (Oligochaeta)"
- [75] "Resultaat.Draadwormen (Nematoda)"
- [76] "Resultaat.Platwormen (Turbellaria)"
- [77] "Resultaat.Muggelarven (Chironomidae)"

- [78] "Resultaat.Watermijten (Hydrachnellae)"
- [79] "Resultaat.Mossellarven (Dreissena)"
- [80] "Resultaat.Larven van watermijten (Hydrachnellae)"
- [81] "Resultaat.Dierlijke organismen, diversen"
- [82] "Resultaat.Zonnediertjes (Actinopoda)"
- [83] "Resultaat.Calanoida (roeipootkreeft)"
- [84] "Resultaat.*Cryptosporidium*, dode cellen"
- [85] "Resultaat.*Cryptosporidium*, levende cellen"
- [86] "Resultaat.*Giardia*, dode cellen"
- [87] "Resultaat.*Giardia*, levende cellen"
- [88] "Resultaat.Anionen"
- [89] "Resultaat.Ionenbalans"
- [90] "Resultaat.Kalium"
- [91] "Resultaat.Kationen"
- [92] "Resultaat.Silicaat"
- [93] "Resultaat.Strontium"
- [94] "Resultaat.Vanadium"
- [95] "Resultaat.Zilver"
- [96] "Resultaat.Campylobacter volume"
- [97] "Resultaat.Bacteriën van de coligroep (37°C, bevestigd)"
- [98] "Resultaat.Bemonsterd volume, totaal"
- [99] "Resultaat.*Cryptosporidium*, CS geteld"
- [100] "Resultaat.*Cryptosporidium*, CS toegevoegd"
- [101] "Resultaat.*Cryptosporidium*, totaal REWAB"
- [102] "Resultaat.Deel volume, met IC (CS)"
- [103] "Resultaat.Deelvolumen, dood/levend"
- [104] "Resultaat.*Giardia*, CS geteld"
- [105] "Resultaat.*Giardia*, CS toegevoegd"
- [106] "Resultaat.*Giardia*, totaal REWAB"
- [107] "Resultaat.Onderzocht volume, dood/levend"
- [108] "Resultaat.Onderzocht volume, met IC (CS)"
- [109] "Resultaat.Bemonsterd volume"
- [110] "Resultaat.Onderzocht volume"
- [111] "Resultaat.trifluorazijnzuur"
- [112] "Resultaat.TAC"
- [113] "Resultaat.Fytoplankton, totaal"
- [114] "Resultaat.Groenalgen (Chlorophyceae)"
- [115] "Resultaat.Goudalgen (Chrysophyceae)"
- [116] "Resultaat.Oogflagellaten (Euglenophyceae)"
- [117] "Resultaat.Pantseralgen (Dinophyceae)"
- [118] "Resultaat.Cryptomonaden (Cryptophyceae)"
- [119] "Resultaat.Cyanobacteriën (Cyanophyceae)"
- [120] "Resultaat.Geelgroene-algen (Xanthophyceae)"
- [121] "Resultaat.Fytoplankton, diversen"
- [122] "Resultaat.Amoeben (Rhizopoda)"
- [123] "Resultaat.Kiezelwieren (Bacillariophyceae) pigment"
- [124] "Resultaat.Corrosie-index"
- [125] "Resultaat.*Cryptosporidium*, aantal"
- [126] "Resultaat.*Giardia*, aantal"

[127] "Resultaat.Gefiltreerd volume 30 µm zeef"
[128] "Resultaat.monsternemingssnelheid"
[129] "Resultaat.Molybdeen"
[130] "Resultaat.Tin"
[131] "Resultaat.Nummer zeefje"
[132] "Resultaat.Rapportnummer"
[133] "Resultaat.Naaktamoeben (Gymnamoebias)"
[134] "Resultaat.Protozoa kleiner dan 30 µm"
[135] "Hemeflow"
[136] "Crypto_Opbrengst"
[137] "Giardia_Opbrengst"

WLN gekoppeld met KWR data, op Sample ID. Variabelen die >10 samples voorkomen.

[1] "Monster"
[2] "Resultaat(Rapp).Tijd monsterneming_tijd"
[3] "Resultaat(Rapp).Somatische colifagen_pve/l"
[4] "Resultaat(Rapp).Enterovirussen_pve/l"
[5] "Resultaat(Rapp).Giardia_n/l"
[6] "Resultaat(Rapp).Cryptosporidium_n/l"
[7] "Result.Bemonsterd volume"
[8] "Result.Extra aantal IMS-en"
[9] "Result.Totaal ingezet volume"
[10] "Result.Cryptosporidium / L"
[11] "Result.Cryptosporidium opbrengst"
[12] "Result.Giardia / L"
[13] "Result.Giardia opbrengst"
[14] "Result.Totaal monster volume"
[15] "Result.Toegevoegd aantal ColorSeeds-Crypto"
[16] "Result.Spike m.b.v. Crypto-ColorSeeds sd"
[17] "Result.Cryptosporidium"
[18] "Result.ColorSeed"
[19] "Result.Toegevoegd aantal ColorSeeds-Giardia"
[20] "Result.Spike m.b.v. Giardia-ColorSeeds sd"
[21] "Result.Giardia"
[22] "Result.ColorSeeds"

WLN gekoppeld met KWR op basis van datum (zelfde week) en er zijn twee plekken (mengbekken, pompstation).

Variabelen die in >10 samples voorkomen

[1] "datum_punt"
[2] "Resultaat(Rapp).Tijd monsterneming_tijd"
[3] "Resultaat(Rapp).Temperatuur_graden C"
[4] "Resultaat(Rapp).Zuurstof_mg/l"
[5] "Resultaat(Rapp).* Zuurstof gemeten bij (temperatuur)_graden C"
[6] "Resultaat(Rapp).Zuurstof (online analyzer)_mg/l"
[7] "Resultaat(Rapp).Zuurstofverschil (lab/veld - analyzer)_mg/l"
[8] "Resultaat(Rapp).Troebelheid_FTU"
[9] "Resultaat(Rapp).Zuurgraad (online analyzer)_pH"
[10] "Resultaat(Rapp).Zuurgraadverschil (lab/veld - analyzer)_pH"
[11] "Resultaat(Rapp).Zuurgraad_pH"

- [12] "Resultaat(Rapp).* Zuurgraad gemeten bij (temperatuur)_graden C"
- [13] "Resultaat(Rapp).Saturatie-Index (delta pH)_pH"
- [14] "Resultaat(Rapp).Elektrisch geleidend vermogen bij 20 C_mS/m"
- [15] "Resultaat(Rapp).* EGV gemeten bij (autom. compensatie)_graden C"
- [16] "Resultaat(Rapp).Waterstofcarbonaat_mg/l"
- [17] "Resultaat(Rapp).Waterstofcarbonaat (in mmol)_mmol/l"
- [18] "Resultaat(Rapp).Ammonium_mg/l"
- [19] "Resultaat(Rapp).Ammonium (in N)_mg N/l"
- [20] "Resultaat(Rapp).Nitriet_mg/l"
- [21] "Resultaat(Rapp).Nitriet (in N)_mg N/l"
- [22] "Resultaat(Rapp).Ortho fosfaat_mg/l"
- [23] "Resultaat(Rapp).Ortho-fosfaat, laag niveau_ug P/l"
- [24] "Resultaat(Rapp).Opwerking tbv ICP-MS_j/n"
- [25] "Resultaat(Rapp).Aluminium_ug/l"
- [26] "Resultaat(Rapp).Calcium_mg/l"
- [27] "Resultaat(Rapp).Mangaan_mg/l"
- [28] "Resultaat(Rapp).IJzer_mg/l"
- [29] "Resultaat(Rapp).UV absorptie bij 254 nm_abs/m"
- [30] "Resultaat(Rapp).Chlorofyl-a_ug/l"
- [31] "Resultaat(Rapp).Somatische colifagen_pve/l"
- [32] "Resultaat(Rapp).Silicium_mg/l"
- [33] "Resultaat(Rapp).Zuurgraad berekend_pH"
- [34] "Resultaat(Rapp).Opwerking tbv ionchromatograaf_j/n"
- [35] "Resultaat(Rapp).D.O.C. (opgelost organisch koolstof)_mg/l"
- [36] "Resultaat(Rapp).SiO2_mg/l"
- [37] "Resultaat(Rapp).Enterovirussen_pve/l"
- [38] "Resultaat(Rapp).Giardia_n/l"
- [39] "Resultaat(Rapp).Cryptosporidium_n/l"
- [40] "Resultaat(Rapp).Filtratie tbv opgelost metalen_1=ja/0=nee"
- [41] "Resultaat(Rapp).Chloride_mg/l"
- [42] "Resultaat(Rapp).Sulfaat_mg/l"
- [43] "Resultaat(Rapp).Kjeldahl_mg N/l"
- [44] "Resultaat(Rapp).Organisch gebonden stikstof_mg N/l"
- [45] "Resultaat(Rapp).Nitraat_mg/l"
- [46] "Resultaat(Rapp).Nitraat (in N)_mg N/l"
- [47] "Resultaat(Rapp).Totaal stikstof_mg N/l"
- [48] "Resultaat(Rapp).Ortho-fosfaat (in P)_mg P/l"
- [49] "Resultaat(Rapp).Totaal fosfaat_mg P/l"
- [50] "Resultaat(Rapp).Verhouding totaal fosfaat/ortho-fosfaat_NA"
- [51] "Resultaat(Rapp).Aluminium (na filtratie)_ug/l"
- [52] "Resultaat(Rapp).IJzer (na filtratie)_mg/l"
- [53] "Result.Bemonsterd volume"
- [54] "Result.Extra aantal IMS-en"
- [55] "Result.Totaal ingezet volume"
- [56] "Result.Cryptosporidium / L"
- [57] "Result.Cryptosporidium opbrengst"
- [58] "Result.Giardia / L"
- [59] "Result.Giardia opbrengst"
- [60] "Result.Totaal monster volume"

- [61] "Result.Toegevoegd aantal ColorSeeds-Crypto"
- [62] "Result.Spike m.b.v. Crypto-ColorSeeds sd"
- [63] "Result.*Cryptosporidium*"
- [64] "Result.ColorSeed"
- [65] "Result.Toegevoegd aantal ColorSeeds-*Giardia*"
- [66] "Result.Spike m.b.v. *Giardia*-ColorSeeds sd"
- [67] "Result.*Giardia*"
- [68] "Result.ColorSeeds"