



Waterschap NOORDERZIJLVEST



KWR

PCR bronopsporing:

Aanwezigheid van rioolwater in oppervlaktewateren



WON

Waterketen Onderzoek Noord

PCR bronopsporing:

Aanwezigheid van rioolwater in oppervlaktewateren

Projectnaam:	PCR bronopsporing: Rioolwater besmettingen in oppervlaktewateren
Projectnummer WLN:	844400
Datum:	28 november 2022
Status:	Definitief
Auteurs:	Rik de Vries, Diede Wübbels, Peer Timmers en Marloes Albers
Documentnaam:	PCR bronopsporing: aanwezigheid van rioolwater in oppervlaktewateren
Vrijgave:	November 2022
Goedgekeurd door:	Peter van der Maas
Opdrachtgever:	WON



Het kwaliteitsmanagementsysteem van WLN B.V. is gecertificeerd volgens ISO 9001 en is van toepassing op het op projectmatige basis adviseren op het gebied van watertechnologie.

Ondanks alle zorg die aan de samenstelling van deze uitgave is besteed, kan noch de auteur, noch WLN B.V., noch WLN Business B.V. aansprakelijkheid aanvaarden voor schade die het gevolg is van enige fout in deze uitgave.

© WLN Niets uit dit bestek/drukwerk mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook zonder voorafgaande toestemming van WLN B.V., noch mag het zonder een dergelijke toestemming worden gebruikt voor enig ander werk dan waarvoor het is vervaardigd.

Samenvatting

Vervuilde waterstromen worden in Nederland behandeld doormiddel van het riool en rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) om ze geschikt te maken voor afvoer op oppervlaktewateren. Maar indien de hydraulische aanvoer de afvoercapaciteit van een RWZI overstijgt, tijdens bijvoorbeeld zware neerslag, vindt hinderlijke lozing van rioolwater op oppervlaktewater plaats via overstorten. Doelstelling van het onderstaande onderzoek was de ontwikkeling van een DNA-methode (via de polymerase chain reaction; PCR) om rioolwaterbesmettingen in oppervlaktewater op te kunnen sporen. Dit is een logisch vervolg op KWR-onderzoek, waarin werd aangetoond dat de bacterie *Arcobacter cryaerophilus* uniform aanwezig is in rioolwateren en effluenten van verschillende RWZI's. In het onderstaande onderzoek wordt *A. cryaerophilus* gedetecteerd als doelorganisme om de aanwezigheid van rioolwater en RWZI-effluent in oppervlaktewater snel te kunnen achterhalen.

Om te beoordelen of de ontwikkelde methode bruikbaar is, is deze toegepast op de rioolwateren en de effluenten van de RWZI's Leeuwarden en Sneek. In overeenkomst met het KWR-onderzoek tonen de PCR-uitkomsten aan dat *A. cryaerophilus* vele malen meer aanwezig is in rioolwater dan in oppervlaktewater en RWZI-effluent. Vergelijking van het rioolwater van de RWZI Leeuwarden en RWZI Sneek toont dat de hoeveelheden *A. cryaerophilus* gelijkwaardig zijn in de verschillende rioolwateren. Tevens toont de analyse van de effluenten van de RWZI Leeuwarden en RWZI Sneek dat *A. cryaerophilus* in gelijkwaardige hoeveelheden aanwezig is in de verschillende RWZI-effluenten. Het onderzoek komt tot de volgende bevindingen:

1. *A. cryaerophilus* is aantoonbaar in rioolwater, RWZI-effluent en oppervlaktewater;
2. *A. cryaerophilus* is in rioolwater in grotere hoeveelheden aanwezig dan in oppervlaktewater en RWZI-effluent;
3. De gebruikte DNA-extractie en amplificatie methode zijn efficiënt en robuust.

Op basis van de bovenstaande bevinden kan geconcludeerd worden dat de ontwikkelde DNA-methode de mogelijkheid biedt om bij aanwijzingen van fecale besmettingen uitsluitel te geven of rioolwater de besmettingsbron is. Door klimaatverandering en droogte zal de concentratie van verontreinigen in oppervlaktewateren in de nabije toekomst mogelijk toenemen en kan dit mogelijk een groter probleem worden. Toch verwachten mensen een hoge kwaliteit van zwemlocaties in open water. Om de menselijke gezondheid proactief te beschermen zijn snelle detectiesystemen voor oppervlaktewateren, zoals de in dit onderzoek ontwikkelde PCR methode, vereist.

Inhoudsopgave

INLEIDING	1
1 OPZET VAN HET ONDERZOEK	2
1.1 MATERIAAL EN METHODEN.....	2
1.1.1 PRIMER EN PROBE SEQUENTIES	2
1.1.2 MONSTERVERBEREIDING EN DNA-EXTRACTIE	2
1.1.3 DNA AMPLIFICATIE EN DETECTIE	3
1.1.4 MONSTERS EN SYNTHETISCH DNA.....	3
1.1.5 BEPALEN UNIFORME PCR DREMPELWAARDE.....	4
2 RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK.....	5
2.1 PCR DETECTIE <i>A. CRYAEROPHILUS</i> MET SYBR GREEN EN PROBES	5
2.2 BEOORDELING OPERATIONELE PERFORMANCE DNA EXTRACTIE.....	5
2.3 BEOORDELING OPERATIONELE PERFORMANCE DNA AMPLIFICATIE.....	6
2.4 PCR DETECTIE <i>A. CRYAEROPHILUS</i> IN OPPERVLAKTEWATER EN RWZI MONSTERS.....	8
3 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN	10
3.1 TOEPASBAARHEID	10
3.2 OPERATIONELE PERFORMANCE	10
4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN.....	11
4.1 CONCLUSIES	11
4.2 AANBEVELINGEN	11
REFERENTIES	13

Inleiding

Vervuilde waterstromen worden in Nederland behandeld doormiddel van het riool en rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) om ze geschikt te maken voor afvoer op oppervlaktewateren. Maar indien de hydraulische aanvoer de afvoercapaciteit van een RWZI overstijgt, tijdens bijvoorbeeld zware neerslag, vindt hinderlijke lozing van rioolwater op oppervlaktewater plaats via overstorten. Het rioolwater is als onbehandeld rioolwater rijk aan fecaal afval en fecale pathogene micro-organismen. Overstorten kunnen dus voor risicovolle situaties zorgen, doordat ze in recreatiezwemwateren mensen in contact kunnen brengen met pathogene micro-organismen.

In een TKI (Topconsortia voor Kennis en Innovatie) project Watertechnologie (opdrachtnummer 401925) is onderzocht hoe geavanceerde DNA-fingerprinting technieken microbiologische vraagstukken gerelateerd aan afvalwaterzuiveringen¹ kunnen beantwoorden. Zoals de vraag of de bacteriële gemeenschapsamenstelling kan dienen als een fingerprint van oppervlaktewateren, RWZI-effluenten en rioolwateren. Zodoende zou de herkomst van een water(stroom) bepaald kunnen worden door analyse van de bacteriële gemeenschapsamenstelling. Doormiddel van next generation sequencing (NGS) is aangetoond dat een bepaalde bacteriële soort (i.e. *Arcobacter cryaerophilus*) uniform aanwezig is in RWZI-influent en vaak aanwezig is in RWZI-effluent ¹. Deze bacterie werd ook in de meeste oppervlaktewateren gevonden, maar in lagere hoeveelheden.

In vergelijking met NGS is een polymerase chain reaction (PCR) meting sneller en goedkoper. In een PCR-reactie wordt een mix van primers (korte stukken DNA), polymerase (enzym die het DNA amplificeert) en nucleotiden (DNA-bouwstenen) tijdens verschillende cycli verwarmd en gekoeld om DNA te amplificeren. De toename van het aantal DNA-kopieën kan in een PCR-reactie gevolgd worden door SYBR green toe te voegen, zodat het nieuwe DNA gekleurd wordt. Een andere manier om het aantal DNA-kopieën vast te stellen is het toevoegen van een probe (fluorescent stuk DNA). Via een kalibratiecurve kunnen de DNA-kopieën worden gekwantificeerd.

De mogelijkheid om een PCR-assay in te zetten voor bronopsporing hangt samen met het onderscheidend vermogen dat met het doelorganisme behaald kan worden, en dus met de aanwezigheid van het doelorganisme in de verschillende watertypen. De doelstelling van de hieronder beschreven methodeontwikkeling is de detectie van *A. cryaerophilus* in oppervlaktewater, rioolwater en RWZI-effluent, om zodoende te bepalen of dit doelorganisme genoeg onderscheidend vermogen heeft om rioolwaterbesmettingen in oppervlaktewater te kunnen detecteren. Van twee verschillende zuiveringen zijn het rioolwater en RWZI-effluent als een verdunningsreeks geanalyseerd. De operationele performance van de DNA-extractie en DNA-amplificatie zijn onderzocht.

1 Opzet van het onderzoek

1.1 Materiaal en methoden

1.1.1 Primer en probe sequenties

Om de kans op een succesvolle amplificatie en detectie te vergroten, is het goed om verschillende primerparen te ontwikkelen voor hetzelfde doelorganisme. Daarom zijn zes verschillende primerparen, met probes, ontwikkeld voor de specifieke detectie van *A. cryaerophilus*. De primer en probe combinaties zijn ontwikkeld om een deel van het 16S rRNA gen te amplificeren. Van de zes verschillende primerparen vertoonden twee combinaties een theoretisch kleine kans op een efficiënte amplificatie en zijn daarom niet experimenteel getest. Op basis van een vergelijking met 16S rRNA gen sequenties uit een gevalideerde database blijkt dat sommige combinaties ook andere bacteriën detecteren met één baseparen mismatch. Maar omdat de groep bacteriën van aspecifieke detectie klein is, is de kans op vals positieve reacties met elk van de vier primercombinaties klein. De vier specifieke primerparen (besteld bij Biolegio) genereren een amplicon dat in lengte varieert van 79 tot 164 bp (Tabel 1). Alle probes (besteld bij Biolegio) zijn gelabeld met Cy5, gelinkt aan de 5' en bevatten een BBQ quencher label op de 3'.

Tabel 1. Overzicht per combinatie van de primer en probe sequenties en hun amplicon lengte.

Combi	Oligo	Sequentie (5' - 3')	Lengte amplicon
1	Forward primer Probe Reverse primer	GGACTTGACATAGTAAGAACTTTCT AGATTGGTGTCTGCTTGCAG CAGCCGAACTGTTAGCAACT	159 bp
2	Forward primer Probe-1 Probe-2 Reverse primer	TCTTGACAGTAATGCAGTTAACAC CAAAGGAATAGACGGGGACC GCATGTGGTTTAATTCGACG GAAAGTTCTTACTATGTCAAGTCC	164 bp
4	Forward primer Probe-1 Probe-2 Reverse primer-1 Reverse primer-2	GAGATTAGCCTGTATTGTATCAG ACACGGTCCAGACTCCTACG GCCATTACCCACCAACTAA TTGTGCAATATCCCCACTG GTGCAATATCCCCACTGCT	148 bp
6	Forward primer Probe-1 Probe-2 Reverse primer	AGAGATTAGCCTGTATTGTATCAG GCCATTACCCACCAACTAA GGGGTAATGGCYTACCAAGA CCTCTCAAACCAGTTATGTGT	79 bp

1.1.2 Monstervoorbereiding en DNA-extractie

Het genomische DNA is geïsoleerd middels de DNeasy PowerBiofilm Kit volgens de aanwijzingen van de leverancier (Qiagen). Voor de rioolwater- en effluentmonsters is respectievelijk een totaal monstervolume van 7,5 en 2,5 mL gefiltreerd over een 0,22 µm membraanfilter. Voor de oppervlaktewatermonsters is een totaal monstervolume van 50 mL gefiltreerd. Bij sommige monsters

is tijdens de DNA-extractie, na de toevoeging van de FB oplossing, een stuk synthetisch DNA toegevoegd aan de PowerBioFilm Bead Tube. Het DNA is geëluëerd in 50 µl elutie buffer.

1.1.3 DNA amplificatie en detectie

Alle DNA-amplificatiereacties zijn uitgevoerd met het LightCycler® 480 Probes Master (Roche) in een totaal reactievolume van 20 µL (Tabel 2). Alle monsters zijn individueel opgewerkt, maar tijdens de PCR-detectie ingezet als duplo monsters.

Tabel 2. Overzicht PCR reactiemix.

Component	Concentratie werkoplossing	Eind-concentratie	Volume (µl)
			Mix 1x
Forward primer	10 µM	0.2 µM	0.4
Reverse primer	10 µM	0.2 µM	0.4
Lightcycler 480 Probe Master	2x	1x	9.8
Uracil DNA glycosylase	100x	1x	0.2
TE buffer	-	-	4.2
SYBR green	20x	1x	1
DNA	-	-	4
Totaal			20

Na de optimalisatie werd de SYBR green oplossing vervangen door 0,4 µl probe mix met een stock concentratie van 10 µM. Het volume TE buffer werd aangepast om het totale volume van de reactiemix op 20 µL te houden. Amplificatie vond plaats op een Quantstudio 5 (Thermo Fisher) met het volgende temperatuurprofiel (Tabel 3). Detectie van het fluorescent signaal vond plaats tijdens de annealingstap.

Tabel 3. Overzicht PCR temperatuurprofiel.

Stap	Temperatuur (°C)	Duur (min)	Aantal cycli
Pre-incubatie	95	10	1
Denaturatie	95	0.25	50
Annealing	50, 52, 54, 56, en 58	0.5	
Elongatie	72	0.5	

Voor de annealingstap is een gradiënt PCR gebruikt om te evalueren of de binding tussen primers/probe met het gDNA op verschillende temperaturen kan plaatsvinden. Dit toont de robuustheid van de primer/probe mix aan en is een belangrijk gegeven voor vervolgonderzoek wanneer aan de gekozen combinatie in een multiplex mix mogelijk andere primers en probes worden toegevoegd.

1.1.4 Monsters en synthetisch DNA

Er zijn verschillende soorten monstertypen geanalyseerd: drinkwater, oppervlaktewater, rioolwater, RWZI-effluent en ultrapuur water. Het oppervlaktewater is afkomstig uit het Amerdiep tussen Amen en Grolloo (coördinaten 52.937556, 6.617056). Dit monster is gekozen, omdat het stroomafwaarts

dichtbij één van de bronnen van de Drentsche Aa ligt. Door de origine van dit monster wordt verwacht dat de aanwezigheid van *A. cryaerophilus* laag is. Er zijn twee rioolwater (24-uur) mengmonsters geanalyseerd, afkomstig van de RWZI's in Leeuwarden en Sneek. Er zijn twee RWZI-effluent mengmonsters geanalyseerd, afkomstig van de RWZI's in Leeuwarden en Sneek. Als controle werd ultrapuur water (Versylene; Almeva BV) gebruikt. Synthetisch DNA (Integrated DNA Technologies) is gebruikt om de primerparen te controleren op de productie van een amplicon. In dit stuk DNA zijn van de vier combinaties alle primer en probe bindingplaatsen aanwezig.

1.1.5 Bepalen uniforme PCR drempelwaarde

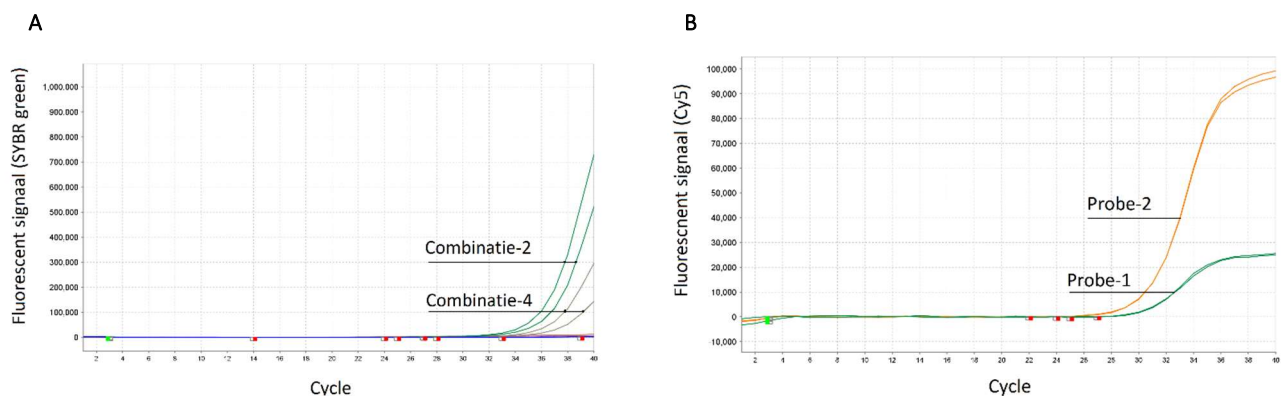
In een PCR-analyse wordt een positieve reactie gedetecteerd door accumulatie van een fluorescerend signaal. De Ct (cyclus threshold) wordt gedefinieerd als het aantal cycli dat nodig is om het fluorescentiesignaal de threshold of drempelwaarde (overschrijdt het achtergrondniveau) te laten passeren. Ct-niveaus zijn omgekeerd evenredig met de hoeveelheid doelwit nucleïnezuur in het monster. Dat wil zeggen, hoe lager het Ct-niveau, hoe groter de hoeveelheid doelnucleïnezuur in de steekproef. Voor de PCR-analyses die zijn uitgevoerd met het beschreven temperatuursprofiel (Tabel 3) en combinatie-2 (probe-2), zijn de verschillende drempelwaarden die door het instrument zijn bepaald gemiddeld. Zodoende wordt gewerkt met een uniforme drempelwaarde die op alle analyses kan worden toegepast.

2 Resultaten van het onderzoek

2.1 PCR detectie *A. cryaerophilus* met SYBR green en probes

Voor de PCR-detectie van *A. cryaerophilus* zijn zes primerparen ontwikkeld. Op basis van een sequentie vergelijking met andere bekende 16S rRNA gen sequenties uit een grote database blijkt dat deze primerparen selectief zijn voor de detectie van *A. cryaerophilus*. In sommige gevallen wordt naast *A. cryaerophilus* een andere bacteriesoort gedetecteerd, wanneer één mismatch wordt toegelaten tussen de primer en de 16S rRNA gen sequenties uit de database. Maar bacteriën anders dan *Arcobacter* die doormiddel van de zes primerparen aangetoond kunnen worden, zijn niet in watermilieus gevonden. Theoretisch zijn alle zes de primerparen dus geschikt om *A. cryaerophilus* specifiek aan te tonen in rioolwater, RWZI-effluent en oppervlaktewateren. Op basis van software matige voorspellingen voldoen vier (combinaties 1, 2, 4 en 6; Tabel 1) en zijn twee (combinatie 3 en 5) afgefallen, omdat de theoretische kans op zelf-binding van de primers te hoog is.

Een stuk synthetisch DNA, dat alle bindingplaatsen bevat van de vier primerparen en probes, is gebruikt om te testen of deze primerparen een amplicon (PCR DNA product) vormen. Op basis van SYBR green detectie, bleek dat de primerparen van combinatie-1 en -6 geen amplicon vormen, maar die van combinatie-2 en combinatie-4 wel (Figuur 1A). Een vergelijking van de cycle-treshold (Ct) waarden en de toename in het fluorescent signaal suggereren dat het primerpaar van combinatie-2 gevoeliger *A. cryaerophilus* aantoont dan die van combinatie-4. Op basis van deze uitkomsten is gekozen om het vervolgonderzoek te richten op combinatie-2. Voor kwantitatieve doeleinden is PCR-detectie met SYBR green ongeschikt. Een beter alternatief voor PCR-detectie is het gebruik van een probe. Voor combinatie-2 zijn twee probes ontwikkeld. Op basis van het fluorescent signaal lijkt probe-2 voor combinatie-2 gevoeliger te zijn dan probe-1 (Figuur 1B).



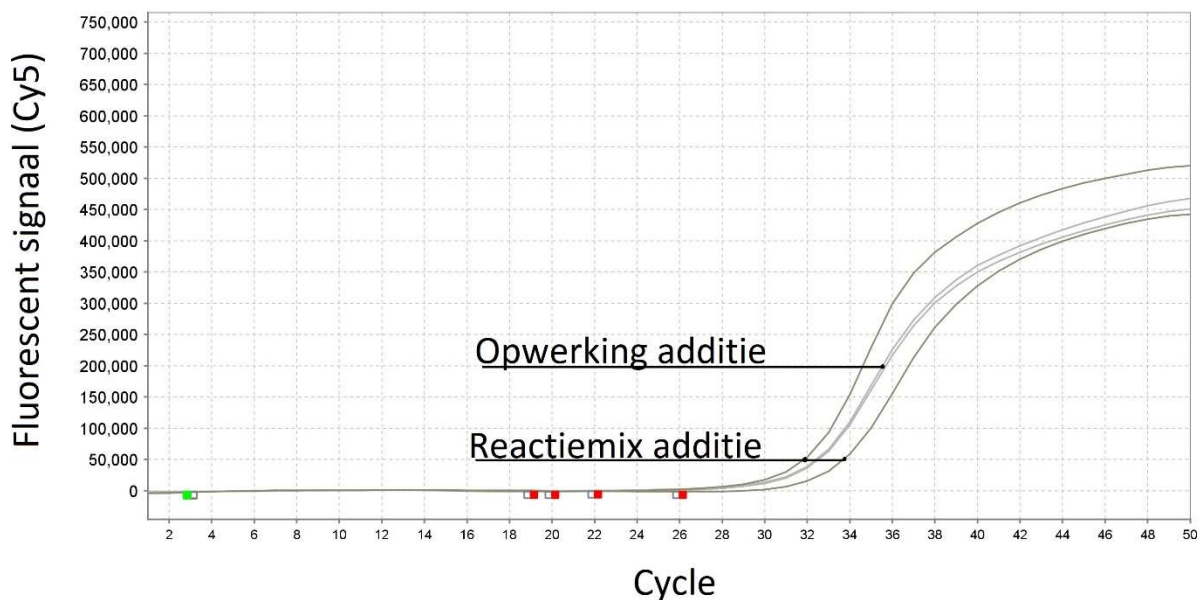
Figuur 1. PCR amplificatie plots van: (A) optimalisatie *Arcobacter cryaerophilus* detectie met verschillende primerparen op SYBR green met PCR detectie in duplo en (B) vergelijking van probe-1 en probe-2 van combinatie-2 met PCR detectie in duplo.

2.2 Beoordeling operationele performance DNA extractie

De gevoeligheid van PCR-reacties voor bepaalde componenten in het monster kan effect hebben op de meetuitkomsten. Zulke matrixeffecten kunnen de DNA-opbrengst beïnvloeden of kunnen een remmende werking hebben op de PCR amplificatie van het DNA. Bekende PCR inhibitoren in water zijn ijzer en humuszuren². Om de remmende werking van ijzer op de PCR-reacties te limiteren is een ammoniumoxalaat stap toegevoegd aan het DNA-extractieproces. Omdat het ijzer door de

ammoniumoxalaat oplossing wordt opgelost, neemt het matrixeffect van oppervlaktewater op de PCR-reactie mogelijk af. Met een interne controle zou de gehele procedure, van opwerking tot amplificatie, geborgd kunnen worden.

Om de opbrengst van de DNA-isolatie te evalueren is aan een ultrapuurwater monster synthetische DNA toegevoegd tijdens de start van de DNA-extractie. Om de invloed van de extractie op de DNA-opbrengst te onderzoeken, is hetzelfde synthetische DNA direct toegevoegd aan de PCR reactiemix. Zodoende wordt de DNA-extractie opbrengst bepaald door monsters te vergelijken die onderling worden onderscheiden door het wel of niet ondergaan van de DNA-extractieprocedure. De Ct-waarden van het geïsoleerde synthetische DNA (Ct-waarde: 32.15) wijken één cyclus af ten aanzien van wanneer het synthetische DNA (Ct-waarde: 33.13) direct wordt toegevoegd aan de reactiemix (Figuur 2). Het verschil in Ct-waarde tussen beide monsters is relatief laag, wat impliceert dat de DNA-concentraties van beide monsters nagenoeg gelijk zijn. Er treed dus weinig DNA-verlies op tijdens de DNA-extractie.

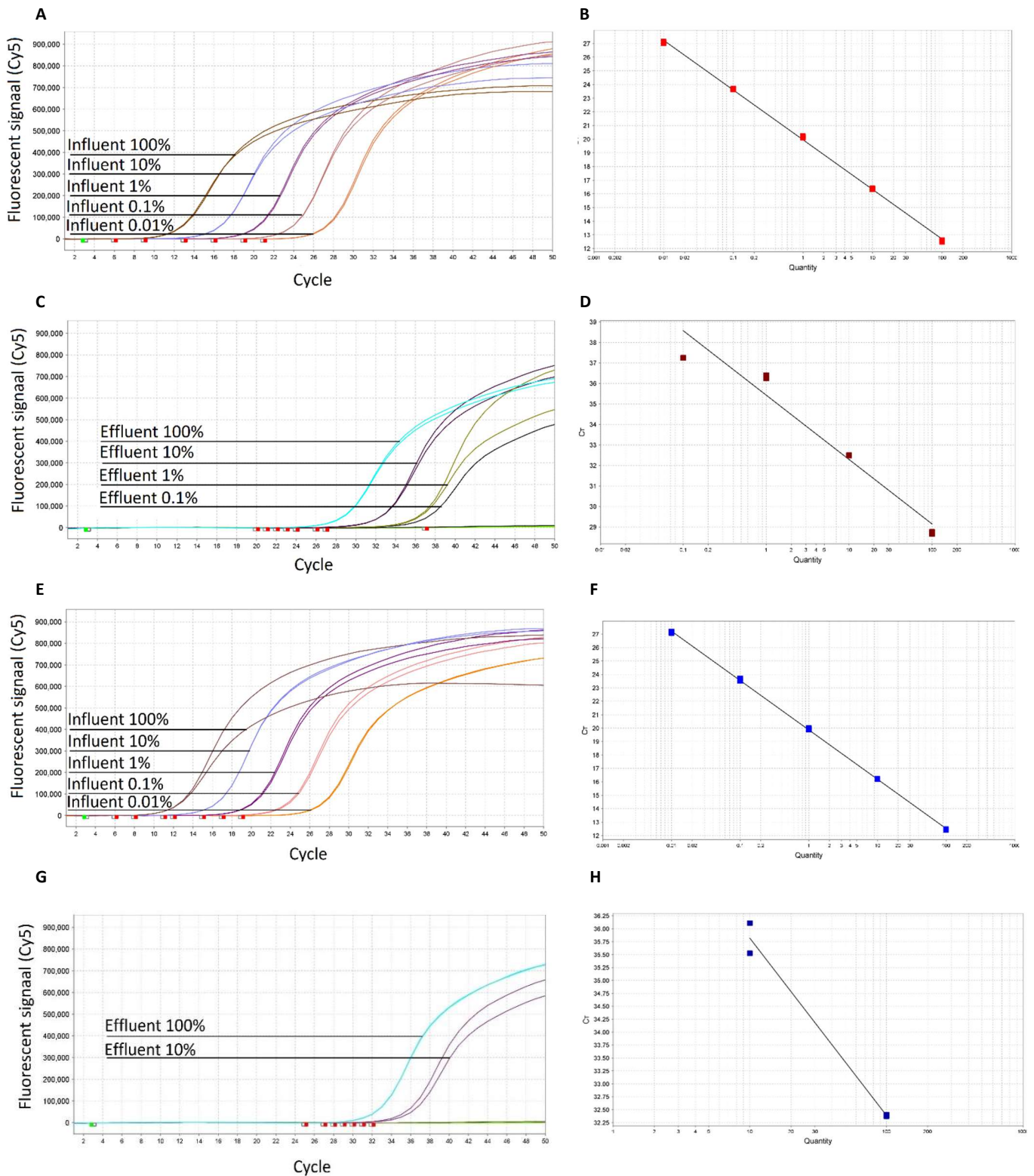


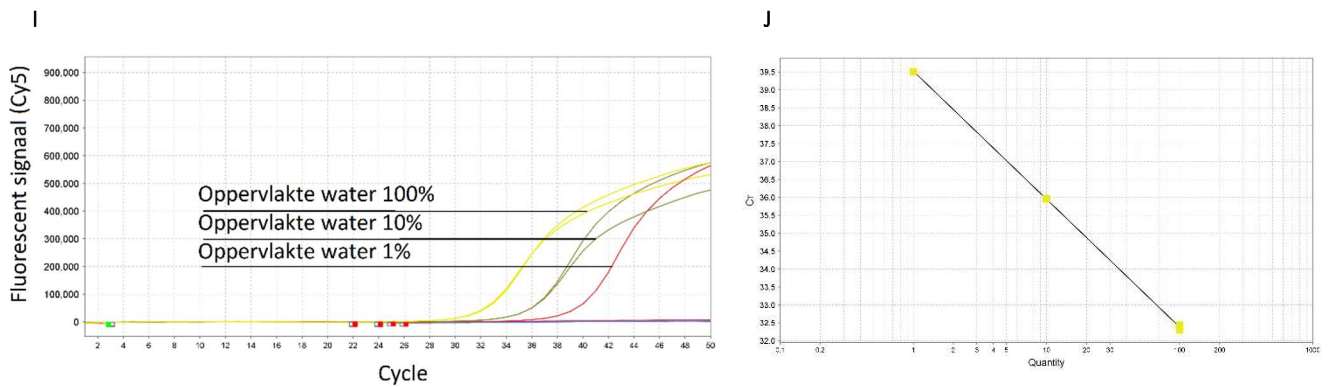
Figuur 2. PCR amplificatie evaluatie opbrengst DNA extractie middels vergelijk synthetische DNA additie tijdens PCR reactiemix en tijdens de DNA opwerking met PCR detectie in duplo.

2.3 Beoordeling operationele performance DNA amplificatie

Om de invloed van de matrixeffecten op de DNA-amplificatie te beoordelen is een decimale verdunningsreeks (100%, 10%, 1%, 0.1% en 0.01%) van de RWZI-effluent- en rioolwatermonsters gemaakt in ultrapuurwater. Onder de aanname dat ultrapuurwater geen matrix effecten geeft, werd de PCR-efficiëntie beoordeeld van de decimale verdunningsreeks middels de correlatiecoëfficiënt (R^2) van de Ct-waarden. De correlatiecoëfficiënt toont of er een lineair verband is tussen twee of meer variabelen. Bij een lineair verband is de R^2 gelijk aan 1,0. Voor de decimale verdunningsreeks van de rioolwater (Figuur 3A en 3B) en effluent (Figuur 3C en 3D) monsters van Leeuwarden was de R^2 respectievelijk gelijk aan 0,99 en 0,95 . Voor de decimale verdunningsreeks van de rioolwater (Figuur 3E en 3F) en effluent (Figuur 3G en 3H) monsters van Sneek was de R^2 respectievelijk gelijk aan 1,0 en 0,98. De correlatiecoëfficiënten voor de beide rioolwatermonsters tonen aan dat er een lineair verband is tussen de Ct-waarden. Voor de rioolwater monsters is dus geen sprake van een matrixeffect

op de PCR-uitkomsten. Voor de RWZI-effluentmonsters is de correlatie coëfficiënt lager en minder lineair. In RWZI-effluent zijn dus mogelijk componenten aanwezig die de opbrengst van de DNA extractie beïnvloeden of die de PCR-reacties remmen. In oppervlaktewater toont het lineaire verband ($R^2 = 1,0$) in de decimale verdunningsreeks (Figuur 3J) aan dat er geen matrixeffecten optreden (Figuur 3I).



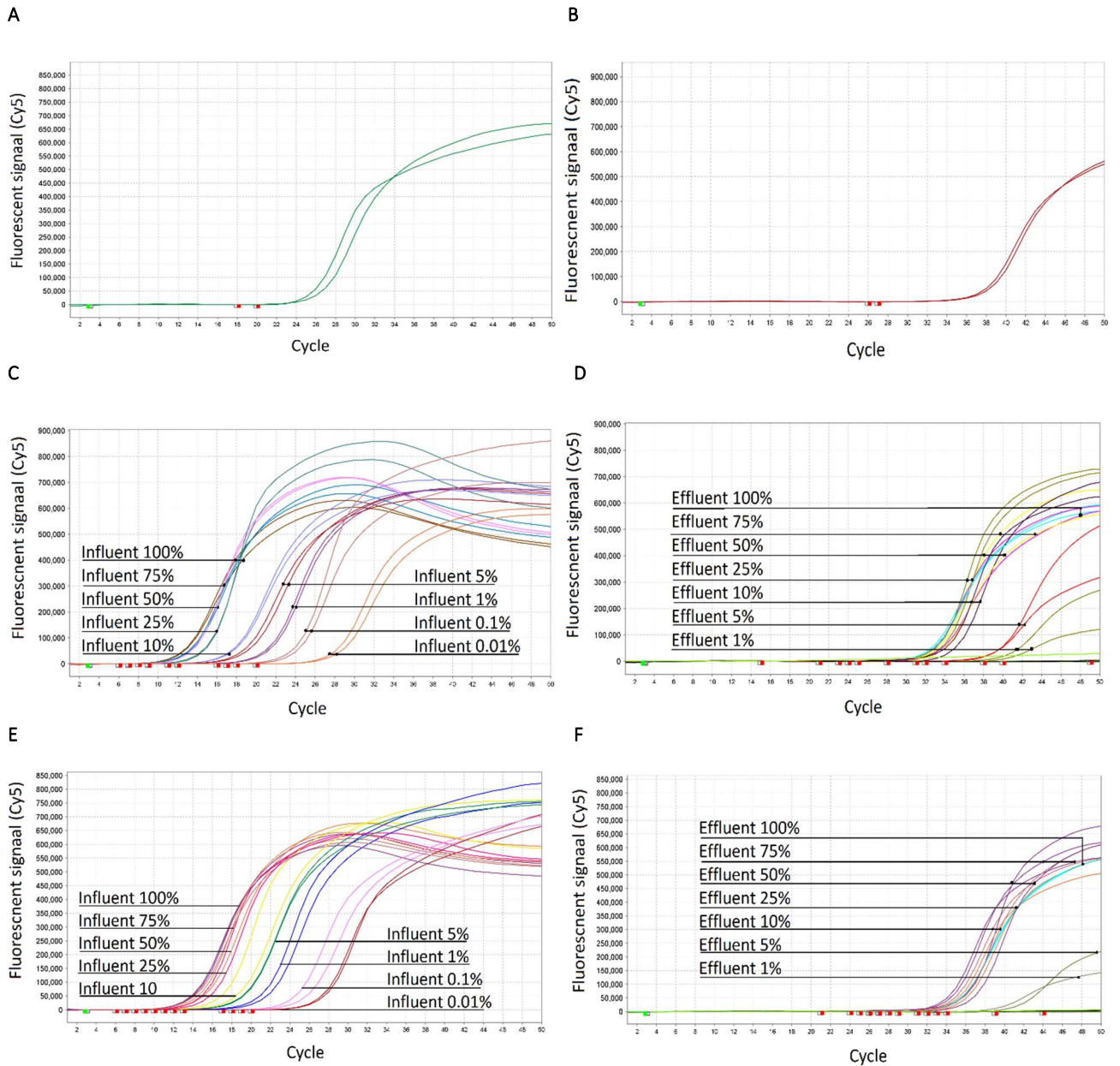


Figuur 3. PCR amplificatie plots (A, C, E, F en I) van respectievelijk het rioolwater en effluent van RWZI Leeuwarden, het rioolwater en effluent van Sneek en het oppervlaktewater met PCR-detectie in duplo, met daarbij de correlatie coëfficiënten (B, D, F, H en J) van respectievelijk het rioolwater en effluent van Leeuwarden, het rioolwater en effluent van Sneek en het oppervlaktewater.

2.4 PCR detectie *A. cryaerophilus* in oppervlaktewater en RWZI monsters

De toepasbaarheid om rioolwater- en RWZI-effluentbesmettingen aan te kunnen tonen doormiddel van *A. cryaerophilus* detectie hangt af van de aanwezigheid en abundantie van deze bacterie in de verschillende watermatrices. Daarom is de aanwezigheid van *A. cryaerophilus* bepaald in oppervlaktewater, drinkwater, rioolwater en RWZI-effluent monsters en zijn van de laatste twee ook verdunningsreeksen geanalyseerd (Figuur 4). Het oppervlaktewater (Figuur 4A) en drinkwater (Figuur 4B) geven (beide totaal volume 50 mL) respectievelijk een Ct-waarde van 22.27 en 38.11. De lage Ct-waarde voor de detectie van *A. cryaerophilus* in drinkwater suggereert aspecifieke amplificatie van de primers, en de waarschijnlijke afwezigheid van *A. cryaerophilus* in drinkwater. Deze hypothese van aspecifieke *A. cryaerophilus* detectie in drinkwater is bevestigd door detectie in drinkwater te vergelijken met een negatieve controle (data niet getoond).

Het onverdunde rioolwater (Figuur 4C; totaal volume 7,5 mL) en onverdunde effluent (Figuur 4D; totaal volume 2,5 mL) van RWZI Leeuwarden tonen onderling grote verschillen in Ct-waarden (Ct-waarde rioolwater = 12.63, Ct-waarde effluent = 32.76). De uitkomsten van RWZI Sneek zijn vergelijkbaar met die van RWZI Leeuwarden, omdat ook bij Sneek de concentratie *A. cryaerophilus* hoger is in het rioolwater (Figuur 4E; Ct-waarde = 14.14) dan in het effluent (Figuur 4F; Ct-waarde = 34.48). En omdat de Ct-waarden van de onverdunde rioolwater- en effluentmonsters van Leeuwarden en Sneek goed overeenkomen.



Figuur 4. PCR amplificatie plots van oppervlaktewater (A) drinkwater (B) het rioolwater (C) en effluent (D) van RWZI Leeuwarden en het rioolwater (E) en effluent (F) van RWZI Sneek met PCR detectie in duplo.

3 Interpretatie van de resultaten

3.1 Toepasbaarheid

Oppervlaktewateren kunnen microbiëel besmet worden, met rioolwater en RWZI-effluent als belangrijke potentiële bron. Hoewel de microbiële kwaliteit kan worden beoordeeld met behulp van fecale indicatorbacteriën, zoals *Escherichia coli*, zijn dergelijke organismen meestal niet bronspecifiek. Daarom kan de exacte oorsprong van de verontreiniging niet worden vastgesteld op basis van deze indicatorbacteriën. De concentratie van verontreinigen in oppervlaktewateren neemt toe als gevolg van klimaateffecten en droogte. Snelle detectiesystemen helpen om de menselijke gezondheid proactief te kunnen beschermen. Ook op chemisch vlak kunnen verontreinigen steeds sneller en uitgebreider worden gedetecteerd. Een voorbeeld is de detectie van kunstmatige zoetstoffen, die kunnen wijzen op verontreiniging met huishoudelijk afvalwater. De snelle methode voor detectie van huishoudelijk afvalwater, kan inzicht geven in de herkomst van het huishoudelijke afvalwater.

De uitkomsten van dit onderzoek tonen aan dat de concentraties *A. cryaerophilus* veel hoger zijn in rioolwater dan in andere watertypen. Dit bevestigt de uitkomsten van KWR (waarin weliswaar een andere analysemethode werd toegepast). Wanneer ervan wordt uitgegaan dat de efficiëntie van elke PCR-amplificatie 100% is, kunnen de resultaten onderling worden vergeleken. De gevonden resultaten laten zien dat de concentratie *A. cryaerophilus* ongeveer 250 keer hoger is in het rioolwater dan in het oppervlaktewater. De verschillen zijn dus significant. Dit betekent dat de ontwikkelde methode gebruikt kan worden om te bepalen of rioolwater de besmettingsbron is bij fecale verontreinigingen in oppervlaktewater. De celconcentraties *A. cryaerophilus* in RWZI-effluenten en oppervlaktewateren zijn vergelijkbaar. Om de aanwezigheid van RWZI-effluent in oppervlaktewateren te bepalen is detectie van *A. cryaerophilus* dus niet geschikt. Hiervoor zal een ander doelorganisme gebruikt moeten worden.

3.2 Operationele performance

In oppervlaktewateren, rioolwateren en RWZI-effluenten kunnen componenten aanwezig zijn die de opbrengst van de DNA-extractie kunnen verminderen of de PCR-reactie kunnen verstoren via een remmende werking³. Deze storingen zijn ongewild en moeten zoveel mogelijk gereduceerd worden. De resultaten tonen dat de DNA-extractie robuust is: er wordt weinig DNA verloren, zodat de meetuitkomsten een representatief beeld geven. In de onderzochte oppervlaktewateren, rioolwateren en RWZI-effluenten blijken geen componenten aanwezig te zijn die de opbrengst van de DNA-extractie beïnvloeden. De methode kan dus zonder problemen worden toegepast op deze watertypen.

4 Conclusies en aanbevelingen

4.1 Conclusies

- De gebruikte DNA-extractie en amplificatie methode zijn geschikt voor het aantonen van *A. cryaerophilus*;
- Met de ontwikkelde PCR-assay wordt *A. cryaerophilus* aangetoond in rioolwater, RWZI-effluent en oppervlaktewater;
- *A. cryaerophilus* is in vele malen hogere concentraties aanwezig in rioolwater dan in oppervlaktewater en RWZI-effluent;
- *A. cryaerophilus* kan gebruikt worden om besmettingen met ongezuiverd rioolwater in oppervlaktewateren te detecteren;
- De concentratie *A. cryaerophilus* in RWZI-effluent monsters is niet significant hoger dan in oppervlaktewater, hierdoor is het organisme niet geschikt voor het aantonen van RWZI-effluent besmettingen van oppervlaktewater;
- Andere bacteriën die als doelorganisme kunnen dienen voor de detectie van RWZI-effluent besmettingen, zijn reeds geïdentificeerd (hiervoor dient vervolgonderzoek uitgevoerd te worden);
- De ontwikkelde methode is geschikt om RWZI-influent besmettingen van oppervlaktewateren kwalitatief op te sporen: het geeft een ja of nee antwoord of er een overstort heeft plaatsgevonden, maar geeft geen informatie over hoeveelheden rioolwater.

Dit onderzoek heeft getoond dat *A. cryaerophilus* aanwezig is in oppervlaktewater, rioolwater en RWZI-effluent. De operationele prestaties van de DNA-extractie en DNA-amplificatie methoden zijn robuust: de methode kan dus zonder problemen worden toegepast op oppervlaktewateren, rioolwateren en RWZI-effluenten. Zoals verwacht tonen de uitkomsten van dit onderzoek dat *A. cryaerophilus* afwezig is in drinkwater. Deze uitkomsten tonen de potentie om de ontwikkelende PCR assay te gebruiken voor het achterhalen van rioolwater besmettingen van oppervlaktewateren.

4.2 Aanbevelingen

In dit onderzoek zijn alleen monsters van RWZI Leeuwarden en RWZI Sneek onderzocht, en zijn nog geen individuele afvalwaterbehandelingen geanalyseerd. Daarom is onduidelijk of de uitkomsten representatief zijn voor andere RWZI's en oppervlaktewateren en hoe de uitkomsten zich verhouden tot IBA's en septic tanks. Om nauwkeuriger onderscheid te kunnen maken tussen onbesmette en besmette oppervlaktewateren zijn analyses nodig van andere RWZI's en meerdere oppervlaktewateren. Met een vervolgonderzoek zou bepaald kunnen worden hoe gevoelig de PCR assay is en op welke afstand tot de bron *A. cryaerophilus* niet meer te detecteren valt. Om exact te kunnen vaststellen hoeveel *A. cryaerophilus* cellen aanwezig zijn, is de ontwikkeling en het gebruik van een kalibratielijn nodig.

Door de PCR-detectie van *A. cryaerophilus* te combineren met een ander doelorganisme zou, naast rioolwater, de aanwezigheid van RWZI-effluenten in oppervlaktewateren bepaald kunnen worden. Ook voor dit doelorganisme is ervaring en het gebruik van een kalibratielijn nodig om over tijd beter

te kunnen inschatten of er sprake is van een RWZI-effluent verontreiniging in oppervlaktewater. Gezien de huidige uitkomsten is het logisch om in zo'n vervolgonderzoek ook individuele afvalwaterbehandelingen te bemonsteren en analyseren.

Referenties

1. Timmers, P., van den Bulk, J., Heijnen, L., Kardinaal, E., Sollie, S., & Medema, G. (2020). Microbiële vingerafdruk voor bronopsporing in oppervlaktewater.
2. Sidstedt, Maja, Peter Rådström, and Johannes Hedman. (2020) PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412.9: 2009-2023.
3. Collado, L., & Figueras, M. J. (2011). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical microbiology reviews*, 24(1), 174-192.
4. Ho, H. T., Lipman, L. J., & Gastra, W. (2006). *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent!. *Veterinary microbiology*, 115(1-3), 1-