

KWR 2019.039 | oktober 2019

# DNA fingerprinting in oppervlaktewater- beheer

DEFINITIEF

**KWR**

Watercycle  
Research  
Institute



hoogheemraadschap  
**Hollands  
Noorderkwartier**



**Tauw**  
Hoogheemraadschap van  
**Rijnland**

**BASECLEAR**

FOR 100% DNA RESULTS

# DNA fingerprinting in oppervlaktewaterbeheer

**KWR | oktober 2019**

KWR 2019.039

**Opdrachtnummer**

401925

**Projectmanager**

J.A (Ton) van Leerdam

**Opdrachtgever**

TKI Watertechnologie

**Kwaliteitsborger(s)**

G. (Gertjan)Medema

**Auteur(s)**

P.H.A (Peer) Timmers, E. (Edwin) Kardinaal, J. (Joost) van de Bulk (Tauw), S.(Susan) Sollie (Tauw), L (Leo) Heijnen

**Projectbegeleiding**

Dit onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met BaseClear, gemeente Utrecht, Hoogheemraadschappen Hollands Noorderkwartier, Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden, Hoogheemraadschap Van Rijnland, Wetterskip Fryslân, Waterschap Hunze & Aa's, Waterschap Rivierenland, Waterschap Vallei & Veluwe, KWR en Tauw.

**Verzonden aan**

Alle projectpartners

Deze activiteit is mede gefinancierd met PPS-financiering uit de Toeslag voor Topconsortia voor Kennis en Innovatie (TKI's) van het ministerie van Economische Zaken en Klimaat en de resultaten zijn openbaar.

**Jaar van publicatie**

2019

**Meer informatie**

dr. P. Timmers

T +31 30 606 9636

E [Peer.Timmersl@kwrwater.nl](mailto:Peer.Timmersl@kwrwater.nl)



# Samenvatting

## Onderzoeksvraag

In oppervlakte- en afvalwaterbeheer is het van belang om te weten wat de herkomst is van het water en de eventueel probleem veroorzakende stoffen of organismen daarin (Figuur 1). Voorbeelden zijn de constatering van fecale verontreiniging op (zwem)waterlocaties, nutriënt gerelateerde problemen of suboptimaal-presterende RWZI's.



FIGUUR 1: SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN PROCESSEN DIE INVLOED HEBBEN OP HET OPPERVLAKTEWATER, ZOALS RWZI EFFLUENT, LANDBOUW, SCHEEPVAART, INDUSTRIE EN RECREATIE.

In dit onderzoek is uitgediept in hoeverre geavanceerde DNA fingerprinting technieken bij kunnen dragen aan het ophelderen van dergelijke vraagstukken. Het toepassen van DNA fingerprinting technieken zoals Next Generation Sequencing (NGS) is in tal van werkgebieden aantoonbaar zinvol gebleken. NGS technieken kunnen worden ingezet om de microbiële samenstelling van bepaalde water(stromen) in kaart te brengen. Deze microbiële samenstelling kan dienen als fingerprint voor bepaalde typen water, zoals oppervlaktewater, RWZI effluent en rioolwater. Aan de hand van deze fingerprint kan de herkomst van water(stromen) mogelijk bepaald worden. De uitdagingen voor toepassing van deze techniek liggen vooral in het opzoeken van de grenzen van de techniek. Daarom is getracht een scala aan onderzoeksvragen op diverse watertypes te beantwoorden met NGS. Deze vragen komen van verschillende waterschappen en gemeenten, die allen nauw betrokken zijn geweest bij dit onderzoek. Deze vragen zijn:

1. Is effluentlozing van RWZI's op oppervlaktewater traceerbaar, en tot hoever van de bron?
2. Is de invloed van riooloverstorten op oppervlaktewater en het verschil in herkomst van overstorten traceerbaar?
3. Is lekkage van RWZI water naar grondwater traceerbaar, en tot op welke afstand?
4. Is de herkomst van oppervlaktewater dat uitkomt op ander oppervlaktewater (bijv. polderwater in boezemwater) traceerbaar? Valt er te differentiëren naar herkomst van vergelijkbare bronnen (humaan)?
5. Kan de mate van veranderingen in de microbiële populatie met NGS getraceerd worden wanneer procesomstandigheden op een RWZI veranderen?

## Resultaten en toepassing

Er is aangetoond dat NGS meerwaarde biedt bij het geven van antwoorden op bovenstaande concrete vragen uit de watersector:

1. Ja. RWZI effluent heeft een typerende microbiële gemeenschap, en RWZI effluent van verschillende locaties lijkt sterk op elkaar (en kunnen dus niet van elkaar worden onderscheiden). Het microbiële profiel van RWZI effluent is traceerbaar in het ontvangende oppervlaktewater, eventueel via het gebruik van microbiële genera die specifiek zijn voor RWZI effluent (bijv. *Saccharimonadales*, *Fodinicola*, of *Neisseriaceae*). Tot hoever? Dat konden we niet goed beantwoorden door het ontbreken van goede referentielocaties die niet beïnvloedt worden door RWZI effluent.
2. Ja, rioolwater heeft een typerende microbiële gemeenschap, dat bestaat uit zowel fecale micro-organismen (afkomstig uit darm van mens en dier) als riool-specifieke micro-organismen (bacteriën die vooral groeien in het riool). Rioolwater van verschillende locaties lijkt sterk op elkaar (en kunnen dus niet van elkaar worden onderscheiden). Het rioolwater profiel is traceerbaar in het ontvangende oppervlaktewater bij overstorten, eventueel via het gebruik van genera die specifiek zijn voor rioolwater (bijv. *Arcobacter*).
3. Het microbiële profiel van de beluchtingstank was traceerbaar tot in de peilbuizen. Dat gaf aan dat er een bepaalde mate van lekkage optrad. Die profielen kwamen niet goed overeen met de metingen van  $\text{NH}_4$  en CZV.
4. De microbiële profielen van oppervlaktewater van verschillende locaties vertonen grote overeenkomsten en de verschillen in de tijd lijken groter dan tussen locaties. Het onderscheid tussen locaties in de onderzochte case studies is niet voldoende voor het onderscheiden van de herkomst.
5. Het profiel van specifieke micro-organismen is variabel. Omdat procesveranderingen niet voldoende in kaart gebracht waren, is het moeilijk de microbiële variabiliteit te koppelen aan de procesveranderingen. Wel kan procesoptimalisatie gereflecteerd worden in het microbiële profiel en kan de aanwezigheid en dynamiek van belangrijke micro-organismen (zoals van draadvormende bacteriën, fosfaat verwijderende bacteriën (PAOs) en glycogeen verwijderende bacteriën (GAOs)) gemonitord worden. Door het monitoren van de microbiële populatie zou er gericht gestuurd kunnen worden in operationele parameters van RWZIs om groei van bijvoorbeeld PAOs te stimuleren.

NGS blijkt een sterke techniek voor het monitoren van de dynamiek van microbiële populaties waarbij extra informatie wordt verkregen over de herkomst en samenstelling van water. Dit kan bijdragen bij het monitoren en sturen in (afval)waterbeheer gerelateerde vraagstukken.

## Aanbevelingen

Nu het duidelijk is dat NGS ingezet kan worden om de herkomst van water te traceren, is het van belang om de toepasbaarheid te bepalen. Daarom is getracht om NGS te koppelen aan riooloverstort data, mate van regenval en waterkwaliteit zoals *E. coli* en *enterococce*n kolonietallen. De koppeling lijkt aanwezig, maar moet nog gevalideerd worden met meer gegevens, zodat de reproduceerbaarheid vastgesteld kan worden. Een 'pilotstudie' waarbij dit goed in kaart wordt gebracht voor één of meerdere gebieden gedurende een jaar zou hiervoor kunnen dienen. Een ander interessant aspect voor vervolgonderzoek is om te beoordelen in welke mate de resultaten van Source Tracker te correleren zijn aan de feitelijke hoeveelheden water. Aanbevolen wordt om in een vervolgfase de debietgegevens en nutriëntenvrachten naast de NGS resultaten te

leggen om de resultaten van Source Tracker te verifiëren. Wanneer gevalideerd, kunnen sterkere uitspraken gedaan worden over de kracht van NGS en Source Tracker op het monitoren van oppervlaktewater. Dit zou ook bij kunnen dragen bij de vraag welke microbiologische samenstelling ecologisch gezond water moet hebben en wanneer het aan de KRW richtlijn voldoet.

Dit onderzoek heeft ook laten zien dat er specifieke rioolwater en RWZI effluent bacteriën zijn die traceerbaar zijn. Een gerichte analyse methode voor deze bacteriën zoals qPCR zou een snelle en goedkope methode zijn om de invloed van rioolwater of RWZI effluent te kwantificeren. Dit kan bijdragen bij het opsporen van een lekkage van riolering of RWZI's of van riooloverstorten of calamiteiten van RWZI's.

NGS kan ook ingezet worden om een totaalbeeld te krijgen van de microbiële populatie in RWZI's na procesveranderingen of om achterhalen waarom een bepaalde zuivering beter of minder goed functioneert. Door meer kennis van de microbiële populatie kunnen gerichter aanbevelingen worden gedaan om de prestaties van RWZI's te verbeteren. Ook hier kunnen mogelijk qPCR methoden ingezet worden om nog gerichter de prestatie van een zuivering te achterhalen.

# Inhoudsopgave

<b>Inhoudsopgave</b>	<b>4</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>6</b>
1.1 Aanleiding	6
1.2 DNA fingerprinting	7
1.3 Onderzoeksvragen en doelstelling	9
1.4 Leeswijzer	10
<b>2 Methodiek</b>	<b>11</b>
2.1 Projectpartners en financiering	11
2.2 Monsterschema	11
2.3 Bemonstering en analyse	11
2.3.1 Monsterbehandeling, DNA extractie + controle	11
2.3.2 DNA amplificatie (PCR) en 16S rRNA gene sequencing (NGS)	11
2.4 Databewerking	12
<b>3 Casebeschrijvingen en resultaten</b>	<b>13</b>
3.1 Inleiding	13
3.2 Hunze & Aa's: Aantonen lekkage RWZI	13
3.2.1 Casebeschrijving	13
3.2.2 Resultaten	15
3.2.3 Conclusies	22
3.3 Waterschap Vallei en Veluwe: Invloed RWZI op oppervlaktewater	23
3.3.1 Casebeschrijving	23
3.3.2 Resultaten	24
3.3.3 Conclusies	31
3.4 Gemeente Utrecht en HDSR: Waterkwaliteit in oppervlaktewater	33
3.4.1 Casebeschrijving	33
3.4.2 Resultaten	35
3.4.3 Conclusies	43
3.5 Wetterskip Fryslân: Zwemwaterkwaliteit in oppervlaktewater	44
3.5.1 Casebeschrijving	44
3.5.2 Resultaten	45
3.5.3 Conclusies	59
3.6 HH Hollands Noorderkwartier: Invloed RWZI op oppervlaktewater	61
3.6.1 Casebeschrijving	61
3.6.2 Resultaten	63
3.6.3 Conclusies	71
3.7 HH van Rijnland: Effect van S-Select® in AWZI	72
3.7.1 Casebeschrijving	72
3.7.2 Resultaten	74

3.7.3	Conclusies	81
<b>4</b>	<b>Algemene discussie</b>	<b>82</b>
4.1	Traceerbaarheid en herkomst van RWZI effluent, rioolwater en oppervlaktewater	82
4.1.1	Opbrengsten	82
4.1.2	Aanbevelingen en vervolg	85
4.2	Proces veranderingen in RWZI's	86
4.2.1	Opbrengsten	86
4.2.2	Aanbevelingen en vervolg	87
<b>5</b>	<b>Literatuur</b>	<b>88</b>
	Monstername Rijnland	89
	Monstername Vallei Veluwe	90
	Monstername Utrecht	90
	Monstername Wetterskip Fryslân	91

# 1 Inleiding

## 1.1 Aanleiding

DNA technieken worden steeds vaker toegepast in de afvalwaterketen en het oppervlaktewater. Met de ontwikkeling van dergelijke technieken is men beter in staat om vraagstukken te beantwoorden die voorheen onbeantwoord bleven met betrekking tot bacteriële populaties in verscheidende waterstromen. In dit TKI project wordt afgetast of en hoe DNA fingerprinting technieken inzetbaar zijn voor vragen zoals die leven in oppervlakte- en afvalwaterbeheer.

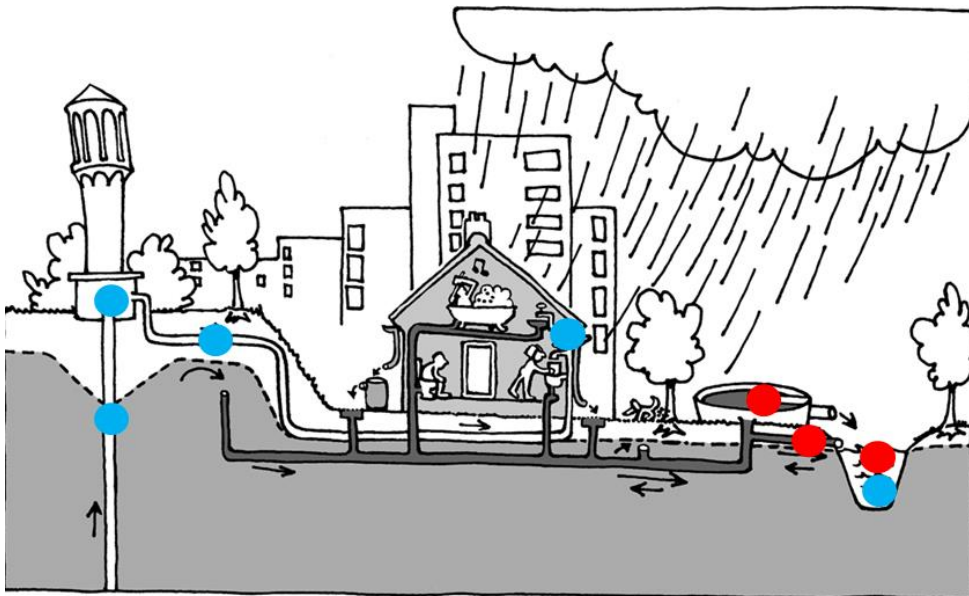
De microbiologische kwaliteit van het oppervlaktewater staat onder invloed van verschillende waterstromen zoals lozingen van effluent door RWZI's, riooloverstorting tijdens perioden met zware neerslag, foutaansluitingen tussen rioolwater- en hemelwaterstelsels, en afspoeling van uitwerpselen (huisdieren en veeteelt) vanaf omliggend gebied. Dergelijke waterstromen kunnen zorgen voor risicovolle situaties waarbij mensen worden blootgesteld aan fecaal besmet oppervlaktewater waarin zich ziekteverwekkende micro-organismen bevinden. Daarnaast zorgen dergelijke afvalstromen voor eutrofiëring van het oppervlaktewater. Als gevolg van verrijking met nutriënten kunnen ongewenste organismen (bijvoorbeeld blauwalgen) tot overmatige bloei komen waardoor de ecologische waterkwaliteit onder druk komt te staan (beperkt doorzicht en zuurstofloze omstandigheden) en afname van biodiversiteit het gevolg zal zijn. Door de verschillende afvalwaterstromen voor een locatie in kaart te brengen, wordt het mogelijk om gerichte maatregelen te nemen. Daarmee kunnen zowel gezondheidsrisico's als wel ecologische risico's beperkt worden.

Voor rioolwaterzuiveringen (RWZI's) bestaat er grote behoefte aan meer inzicht in de biologische processen binnen een RWZI. Welke bacteriepopulaties leven er in een RWZI, hoe groot zijn deze populaties, wat veroorzaakt veranderingen in de populaties en wat is de activiteit van de verschillende bacteriën? Er is al veel onderzoek gedaan naar de microbiële samenstelling in RWZI's. Zo is aangetoond dat de meeste RWZIs een kern van micro-organismen bevatten die soortgelijk is, waarbij veranderingen in deze gemeenschap vooral bepaald worden door stochastische processen en operationele parameters (schaal, temperatuur, aangeleverd organische materiaal) (Wu et al., 2019). De stromingssnelheid van afvalwater schijnt voor een groot deel de variatie in de microbiële gemeenschap te verklaren (Guo et al., 2019). Ander onderzoek richt zich op het beter in kaart brengen van de microbiële populaties in actief slib, omdat ondanks dat dit proces al meer dan 100 jaar gebruikt wordt, er nog weinig bekend is voor de verantwoordelijke micro-organismen (Jørgensen et al., 2018). Bovengestelde vragen dienen beantwoord te worden om het zuiveringsproces beter te kunnen sturen en beter te kunnen reageren op bijvoorbeeld calamiteiten. Ook het opsporen van bijvoorbeeld lekke tanks is een potentiële toepassing van DNA technieken voor RWZI's.

Voor zowel het oppervlaktewaterbeheer als voor het beheer van een RWZI geldt dat er krachtige DNA-technieken beschikbaar zijn die inzicht kunnen verschaffen in waterstromen en bacteriële processen, de zogenaamde Next Generation Sequencing (NGS) methode. Dergelijke technieken worden al ruim onderzocht in vele onderdelen van de waterketen (Figuur 1-1). Er is onderzoek nodig om uit te diepen in hoeverre deze



geavanceerde DNA-technieken kunnen bijdragen aan het ophelderen van vraagstukken over gezondheid en eutrofiering in oppervlaktewater- en afvalwaterbeheer.



FIGUUR 1-1: ONDERZOEKSGBIEDEN VAN DE NGS METHODIEK. BLAUWE CIRKELS GEEFT AAN WAAR DE METHODE AL MET SUCCES ONDERZOECHT WORDT, DE RODE CIRKELS GEVEN AAN WAAR IN DE WATERKETEN IN DIT TKI PROJECT DE FOCUS OP ZAL LIGGEN.

## 1.2 DNA fingerprinting

DNA fingerprinting (of DNA profiling) is een term die wordt gebruikt voor technieken waarbij erfelijk materiaal (DNA) wordt gebruikt om een unieke vingerafdruk te krijgen van een bepaald monster. Het wordt veel gebruikt in de forensische wetenschap waar men de dader van een misdaad opspoorde door het DNA fingerprint/profiel van de dader te vergelijken met een DNA monster van de locatie van de misdaad. DNA fingerprinting technieken hebben zich steeds verder ontwikkeld waarbij de techniek gevoeliger, goedkoper en sneller is geworden. Hierdoor wordt de methode nu in allerlei velden van wetenschap toegepast, waaronder de microbiologie.

Met een huidige DNA fingerprinting techniek, genaamd next generation sequencing (NGS), kan de gehele microbiële populatie (fingerprint/profiel) van een monster bepaald worden. Dit profiel is uniek voor elk monster en laat zien welke microben in een monster voorkomen en met welk relatief aandeel. Met NGS worden DNA sequenties van alle micro-organismen in een monster bepaald en soortgelijke sequenties worden gegroepeerd in zogenaamde Operational Taxonomic Units (OTUs). Aan deze OTUs wordt een naam van een bacteriegroep gehangen door middel van het vergelijken met een database. Bacteriegroepen bestaan uit de hiërarchische taxonomische niveaus: domein, fyllum, klasse, orde, familie, genus en soort. Bij de analyse in dit rapport hebben we de bacteriegroepen op genus niveau ingedeeld.

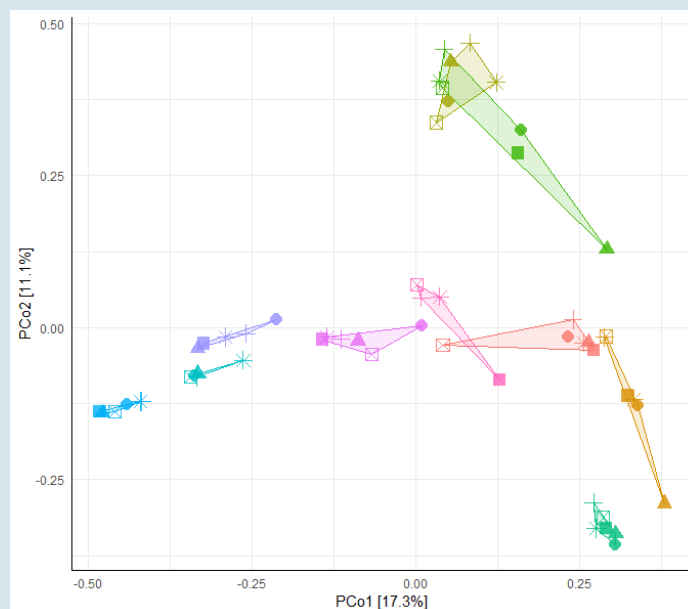
Het microbiële profiel kan getoond worden met behulp van Principal coordinates analysis (PCoA) waardoor snel duidelijk wordt welke microbiële profielen op elkaar lijken en van elkaar afwijken (zie box 'Principal coordinates analysis'). Wanneer een bepaald profiel karakteristiek is voor een bepaald soort monster (bijv. RWZI effluent of oppervlaktewater), kan dit monster herkend worden aan de hand van het microbiële

profiel. Op deze manier zou het mogelijk moeten zijn om de invloed van een bepaald profiel (bijv. RWZI effluent) op een andere profiel (bijv oppervlaktewater) te zien. Dit heet 'source tracking' waarbij aan de hand van de microbiële profielen bepaald kan worden hoeveel invloed bepaalde bronnen (sources) hebben op een bepaald oppervlaktewater (sink) (zie box 'Source Tracking').

### Principal coördinatie analyse

Principal coordinates analysis (PCoA) is een analyse methode die gebruikt wordt om het verschil tussen microbiële gemeenschappen van monsters te visualiseren. Het is een multivariate analyse methode waarmee de microbiële gemeenschappen in monsters worden gerangschikt op grond van waarnemingen (waarden) aan meerdere afhankelijke variabelen. In dit geval zijn deze variabelen de bacteriegroepen en hun abundantie in 'reads'. Deze methode is gebaseerd op een dissimilariteitsmatrix van alle variabelen en maakt hier een coördinaten-matrix van, dat teruggebracht wordt tot een tweedimensionale figuur (Ramette et al., 2007). In dit figuur worden de twee componenten die het grootste deel van de variatie in de data verklaren gebruikt als x en y-as, de zogenaamde principal coordinates (PCo's). In een PCoA plot staan op elkaar gelijkende microbiële gemeenschappen dicht bij elkaar en sterk verschillende microbiële gemeenschappen ver van elkaar af.

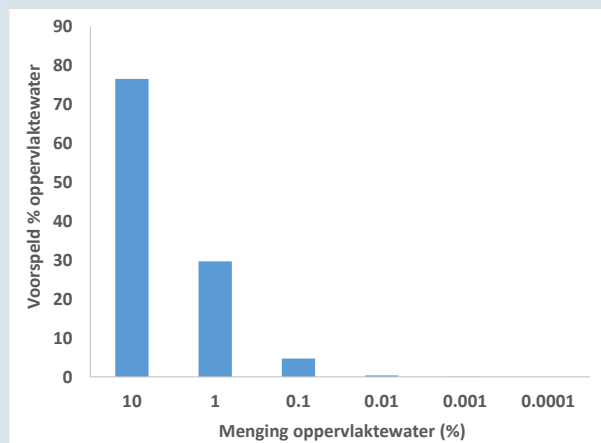
In het geval van NGS data stelt dus elk punt in een PCoA plot een microbiële gemeenschap van een monster voor. De waarnemingen die bij elk punt horen zijn de abundanties van de bacteriegroepen (uitgedrukt in reads) die de grootste variatie in de data verklaren. Omdat deze OTUs de grootste variatie in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



### Source Tracking

Source Tracker is software waarmee microbial profiling resultaten worden gebruikt om te achterhalen wat de oorsprong van een bepaalde microbiële gemeenschap in een monster is (Knights, Kuczynski et al. 2011). Source Tracker maakt gebruik van Bayesiaanse statistiek om een schatting te maken van het bestanddeel verontreiniging, afkomstig van een bekende bron (source), in een microbiële gemeenschap (sink) die mogelijk onder invloed staat van de verontreinigingsbron.

Deze methode is binnen KWR al getest op drinkwatermonsters waar in verschillende mate oppervlaktewater aan toegevoegd was (zie Figuur). Drinkwater bevat beduidend minder bacteriën dan oppervlaktewater, waardoor menging een groot effect heeft op de microbiële gemeenschap. Menging van 10% oppervlaktewater met drinkwater resulteert daarom in zo'n sterke verandering van het microbiële profiel, dat Source Tracker voorspelt dat de bron (source) van het drinkwatermonster (sink) voor 77% uit bacteriën van oppervlakte water bestaat. Dit kan dus ook ingezet worden om de bron van besmetting van bijvoorbeeld oppervlaktewater achterhalen, of van diep grondwater waar kortsluitstroming opgetreden heeft.



### 1.3 Onderzoeksvragen en doelstelling

In dit project zijn de volgende onderzoeksvragen gedefinieerd:

1. Is effluentlozing van RWZI's op oppervlaktewater traceerbaar, en tot hoever van de bron?
2. Is de invloed van riooloverstorten op oppervlaktewater en het verschil in herkomst van overstorten traceerbaar?
3. Is lekkage van RWZI water naar grondwater traceerbaar, en tot op welke afstand?
4. Is de herkomst van oppervlaktewater dat uitkomt op ander oppervlaktewater (bijv. polderwater in boezemwater) traceerbaar? Valt er te differentiëren naar herkomst van vergelijkbare bronnen (humaan)?
5. Kan de mate van veranderingen in de microbiële populatie met NGS getraceerd worden wanneer procesomstandigheden op een RWZI veranderen?

De bovenstaande onderzoeksvragen zijn verschillend, maar zijn van soortgelijke aard. De eerste 4 onderzoeksvragen zijn allen gericht op de vraag of de herkomst van bepaald water traceerbaar is aan de hand van microbiële profielen. In dit project wordt daarom vooral gekeken naar het gebruik van het microbiële profiel als 'source tracker'.

Ook proberen we te achterhalen wat de karakteristieke microben zijn in bepaalde monstertypen, zoals rioolwater, slib en effluent van RWZI's en hoe microbiële profielen veranderen door veranderende omstandigheden. Dit zal helpen met het beantwoorden van deze verschillende onderzoeksvragen in dit project.

Doel van dit onderzoek is om meer inzicht te krijgen in de toepassingsmogelijkheden van NGS, zodat in de toekomst de toepassing van de NGS methodiek breed beschikbaar is voor oppervlakte- en afvalwater beheerders. Uiteindelijk zou NGS als methode ervoor moeten zorgen dat men gericht aan de slag kan om (afval)waterstromen te inventariseren. Op basis van die kennis kan het systeembegrip worden vergroot en kunnen op termijn gericht maatregelen geformuleerd worden om o.a. de werking van RWZI's en riooloverstorten te optimaliseren en de oppervlaktewaterkwaliteit te verbeteren.

#### 1.4 Leeswijzer

Eerst wordt de methodiek van het monsteren en uitvoeren van NGS uitgelegd in hoofdstuk 2. Vervolgens volgt in hoofdstuk 3 voor elke case afzonderlijk de casebeschrijving, resultaten & discussie en de conclusies. In hoofdstuk 4 wordt dieper ingegaan op de overeenkomsten tussen alle cases en worden de algemene conclusies voor alle cases behandeld. In de bijlagen zijn details per case uitgewerkt.

## 2 Methodiek

### 2.1 Projectpartners en financiering

Begin 2017 is, via een samenwerking van 10 projectpartners, een tweejarig project opgestart: 'DNA fingerprinting in oppervlaktewaterbeheer'. KWR en Tauw hebben het project gezamenlijk getrokken. Baseclear en KWR voeren de DNA analyse uit en zeven waterschappen/gemeenten (Wetterskip Fryslân, Waterschap Hunze & Aa's, Waterschap Rivierenland, Hoogheemraadschap van Rijnland, Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden, Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier en gemeente Utrecht) participeren in dit project via de inbreng van cases (zie Hoofdstuk 3) en het uitvoeren van de monsternamen. Naast een financiële bijdrage van de deelnemende partners is het project gefinancierd via TKI-subsidie.

### 2.2 Monsterschema

In 2017 en 2018 zijn meetronden uitgevoerd bij elk van de cases. Het aantal meetpunten per case varieerde van 5 tot 12. Met NGS is vervolgens de bacteriële samenstelling (fingerprint) van het oppervlakte- dan wel grondwater bepaald.

### 2.3 Bemonstering en analyse

#### 2.3.1 Monsterbehandeling, DNA extractie + controle

Voor het isoleren van DNA uit de monsters is van elk monster een volume water gefiltreerd over polycarbonaat membraanfilters met een poriegrootte van 0,2 µm. Voor het isoleren van DNA uit de, op het filter geconcentreerde micro-organismen, is de DNeasy PowerBiofilm Kit (Qiagen/MoBio) gebruikt zoals eerder beschreven (Heijnen and Learbuch 2013). Een deel van het geïsoleerde DNA is gebruikt voor NGS analyses. Om inzicht te krijgen in het optreden van kruisbesmettingen tijdens de verschillende labwerkzaamheden zijn ook DNA-isolaties uitgevoerd op "blanco monsters" (monsters waarbij steriel DNA-vrij water is gefiltreerd). Ter controle zijn op deze "blanco monsters" ook NGS analyses uitgevoerd.

#### 2.3.2 DNA amplificatie (PCR) en 16S rRNA gene sequencing (NGS)

Voor de identificatie van verschillende micro-organismen (Bacteriën en Archaea) is eerst de V4 variabele regio van het 16S rRNA gen geamplificeerd met het primer paar 515F-806R met behulp van het polymerase enzym KAPA Hifi (KAPABiosystems). De resulterende amplicons werden van een barcode voorzien. De concentratie van de individuele PCR fragmenten is bepaald met de QuBit en equimolaire hoeveelheden van de PCR fragmenten (afkomstig van individuele monsters) zijn gemengd en gesequenced met Illumina MiSeq (2x250bp paired-end reads). De ruwe data is opgewerkt met mothur (Schloss *et al.*, 2009) tot Operational Taxonomic Units (OTUs) met 97% identiteit. De taxonomie van de OTUs is bepaald door de sequenties te vergelijken met de database Silva (versie 132; Quast *et al.*, 2012). De taxonomie van de OTUs wordt in het algemeen weergegeven op genus niveau.

## 2.4 Databewerking

Per genus is voor elk monster het aantal reads gesommeerd en de resulterende abundantie data zijn verder samen met de beschikbare co-variabelen (metadata) verwerkt met behulp van het pakket ampvis 2 (Andersen et al., 2018) dat geschreven is in de programmeertaal en software 'R'. Phylotypes (groepen reads op genusniveau) die van Eukaryote oorsprong waren of geen hit hadden met de database zijn verwijderd uit de abundantie tabel. Voor het berekenen van diversiteitsindices (Shannon en "observed phylotypes"), zijn eerst subsets van de data genomen van 10.000 tot max. 20.0000 reads ("rarefaction").

Relatieve abundantie van de dominante OTUs (top 25 gemiddelde abundantie) op verschillende taxonomische niveaus (bacteriegeslachten of klasse) werd weergegeven in "heatmaps" na het verwijderen van zeldzame OTUs die minder dan 0.1% in elk monster voorkomen. Verschillen in de abundante bacteriegeslachten (relatieve abundantie  $\geq 0.1\%$  in minstens 1 monster) worden in de verschillende subsets van de data in correlatie tot de verschillende co-variabelen aangetoond met behulp van "Principal Coördinatie Analysis" (PCoA) en bi-plots die de meest extreme bacteriegeslachten weergeven. Hiervoor is eerst een Hellinger transformatie (wortel van het quotiënt van elke waarde met de som van de rij) doorgevoerd op de abundantie tabel om te compenseren voor nul-waarden. Elk punt in een PCoA plot geeft de OTU samenstelling weer van 1 monster waarbij de OTUs minstens 0.1% abundantie hebben. Als een OTU minder dan 0.1% abundantie heeft, wordt de groep als zeldzaam beschouwd en geëxcludeerd van de dataset. Met behulp van deze PCoA plots is er snel te zien of er enig verband is tussen bepaalde monsters dat te verklaren is met een co-variabele (zoals bijvoorbeeld de monsterdatum). Voor verdere uitleg, zie box 'Principal coördinatie analyse'. Als laatste is de tool Source Tracker toegepast op de monsters van de cases waar de vraag is hoeveel invloed bepaalde bronnen (sources) hebben op een bepaald oppervlaktewater (sink) (zie box 'Source Tracking').

## 3 Casebeschrijvingen en resultaten

### 3.1 Inleiding

De deelnemende waterschappen en gemeente hebben in totaal 6 cases aangedragen om de toepasbaarheid van DNA fingerprinting in het oppervlaktewaterbeheer te toetsen.

De 6 cases zijn geselecteerd binnen 4 vraagstukken:

1. Lekkage van RWZI water naar grondwater; is dit traceerbaar? En tot op welke afstand?
2. Invloed riooloverstort/RWZI effluent op oppervlaktewater; is de herkomst van het overstortwater/effluent traceerbaar?
3. Oppervlaktewater dat uitkomt op ander oppervlaktewater (bijv. polderwater in boezemwater); is de waterherkomst traceerbaar?
4. Veranderende procesomstandigheden op een RWZI; in welke mate verandert de bacteriepopulatie op een RWZI bij procesveranderingen?

De cases worden in de navolgende paragrafen beschreven, waarbij de situatie is geschetst en de specifieke vraagstelling is benoemd. In diezelfde paragraaf worden per case de resultaten bediscussieerd en de conclusies behandeld.

### 3.2 Hunze & Aa's: Aantonen lekkage RWZI

#### 3.2.1 Casebeschrijving

In het activiteitenbesluit zijn voorschriften opgenomen om de bodemkwaliteit te waarborgen. Bij bodembedreigende activiteiten is het verplicht een combinatie van bodem beschermende voorzieningen en maatregelen te treffen om een verwaarloosbaar bodemrisico te bereiken. De regeling bevat voorschriften over de inspectie en keuring van o.a. vloeistofdichte vloeren en verhardingen, ondergrondse opslagtanks, het verrichten van periodiek bodemonderzoek (nul- en eindsituatieonderzoek) en de te treffen beheermaatregelen. Voor zuiveringen bestaat het periodiek onderzoek uit geoelectrische metingen (zeer complex en duur) of uit het jaarlijks meten van het CZV en  $\text{NH}_4$ -gehalte in peilbuizen. Bij de peilbuismethode wordt eerst de stromingsrichting van het grondwater bepaald door stijghoogtemetingen van het grondwater. Een bovenstroomse geplaatste peilbuis dient als referentie (=0 meting). Op de locatie worden i.o.m. het bevoegd gezag meerdere peilbuizen geplaatst. Indien het gemeten gehalte van CZV en/of  $\text{NH}_4$  50% hoger ligt dan de gemeten waarde in de referentiepeilbuis dient hier analyse plaats te vinden. Indien deze waarde(n) ook weer te hoog zijn, wordt de meetfrequentie verhoogt naar 2x per jaar en dient een uitgebreid grondwateronderzoek (NEN 5740 pakket; metalen, aromaten vluchtige aromatische koolwaterstoffen, vluchtige organische halogeenkoolwaterstoffen en minerale olie) plaats te vinden.

Waterschap Hunze en Aa's heeft 13 zuiveringen waar in totaal 56 peilbuizen zijn geplaatst. Uit recente CZV en  $\text{NH}_4$  analyses in peilbuizen volgt dat 12 van de 13 zuiveringen een vorm van lekkage vertonen. Op de RWZI Assen heeft aanvullend

onderzoek plaatsgevonden op het NEN 5740 pakket als ook op diverse geneesmiddelen en zoetstoffen in 4 peilbuizen (Figuur 3-1). Van het NEN 5740 pakket overschreed alleen barium de streefwaarde en is waarschijnlijk een gevolg van (fluctuerende) van nature verhoogde achtergrondconcentraties die vaker voorkomen in de regio. In de 4 peilbuizen zijn geen geneesmiddelen aangetroffen (onder detectiegrens). In 2 peilbuizen (peilbuizen 2 en 3) zijn zeer licht verhoogde gehalten aan saccharine en acesulfaam (zoetstoffen) aangetoond. In P zijn de locaties van de 4 peilbuizen weergegeven.



FIGUUR 3-1: PEILBUIZEN RWZI ASSEN (IN GROEN)

Voor het waterschap is het onduidelijk of de verhoogde concentraties  $\text{NH}_4$  en CZV daadwerkelijk veroorzaakt zijn door lekkage van de RWZI. Gezien de locatie van de RWZI Assen is het aannemelijk dat de grondwaterstromen anders lopen dan aangenomen. Peilverschillen in het afvoerende oppervlaktewater kunnen effect hebben op de grondwaterstromen waardoor  $\text{NH}_4$  en CZV vanuit het oppervlaktewater in de peilbuizen terecht komt.  $\text{NH}_4$  en CZV kunnen ook vanuit de landbouw of via reeds aanwezige humuszuren in het grondwater terecht komen. Mogelijk biedt DNA fingerprinting uitsluitsel.

**Hoofdvraag:** Is op basis van DNA fingerprinting in grondwater vast te stellen of er lekkage op de RWZI heeft plaatsgevonden van communaal afvalwater/slib?

Om de hoofdvraag te beantwoorden is op de volgende punten bemonsterd:



- PB1 = peilbuis 1
- PB2 = peilbuis 2
- PB3 = peilbuis 3
- PB4 = peilbuis 4
- INF = influent RWZI Assen
- EFF = effluent RWZI Assen
- BT = beluchtingstank RWZI Assen
- Havenkanaal voor lozingspunt
- Havenkanaal na lozingspunt

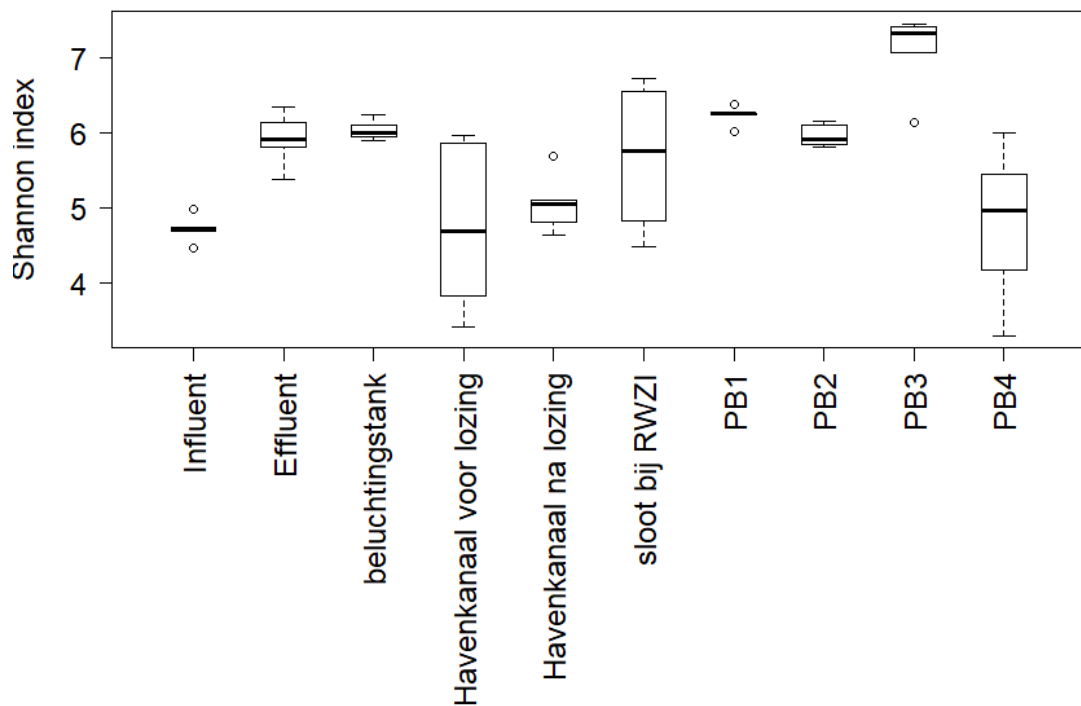
Het monsterschema is opgenomen in bijlage 1.

Het doel van deze case is om te beoordelen of DNA fingerprinting als hulpmiddel kan worden gebruikt bij de eventuele lekkage van een actief slibtank van een RWZI.

### 3.2.2 Resultaten

In Figuur 3-2 is de diversiteit (Shannon index) van de verschillende monsters weergegeven. Elke box toont het eerste, tweede (mediaan) en derde kwartiel van de indices berekend uit de kenmerken (OTU-samenstelling) van de verschillende datums. De "whiskers" representeren 1.5x de interkwartielafstand en uitbijters zijn aangegeven met cirkels.

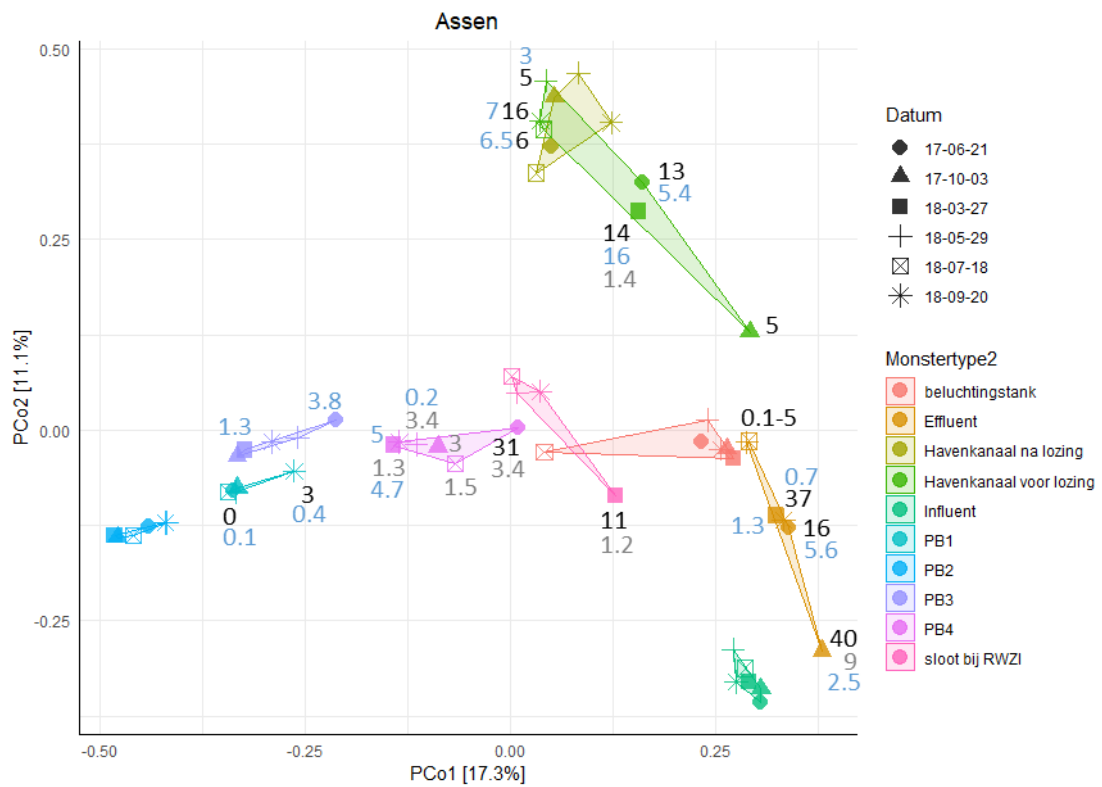
Te zien is dat enkele monsters nauwelijks variatie in diversiteit vertonen (influent, beluchtingstank, PB1) terwijl andere monsters juist grote variatie in diversiteit vertonen (Havenkanaal voor lozing, sloot bij RWZI, Peilbuis 4). De constatering dat het influent en de beluchtingstank een relatief stabiele bacteriepopulatie hebben is te verklaren doordat afvalwater een stabiele stroom met een nagenoeg constante kwaliteit vertegenwoordigd. Het havenkanaal voorafgaand aan lozing, de sloot bij de RWZI en peilbuis 4 zijn juist onderhevig aan variaties. Opvallend is dat de variatie in het havenkanaal na lozing veel kleiner is dan in het havenkanaal voor lozing. De variatie die in peilbuis 4 t.o.v. de andere peilbuizen te zien is kan komen door variaties in waterkwaliteit.



FIGUUR 3-2: SHANNON DIVERSITEIT VAN DE VERSCHILLENDE MONSTERS UIT CASE 1

Om te beoordelen in welke mate de verschillende bacteriepopulaties op elkaar lijken is in Figuur 3-3 is een PCoA opgesteld. In de PCoA zijn per bemonsteringspunt de afzonderlijke microbiële populaties weergegeven waardoor de spreiding in de populaties binnen een monsterpunt inzichtelijk wordt. Op basis van de PCoA kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- Influent is weinig variabel en lijkt qua samenstelling niet op de andere monsters
- De sloot bij de RWZI en de beluchtingstank lijken qua samenstelling te clusteren, en het RWZI effluent lijkt ook op deze monsters.
- De peilbuizen verschillen van de andere monsters, maar ook onderling. Peilbuis 1 t/m 3 lijken het meest op elkaar en peilbuis 4 lijkt 'de brug' te vormen met de andere monsters. Deze heeft ook overeenkomsten met sloot bij RWZI en de beluchtingstank.
- Peilbuizen 1 t/m 4 hebben verschillende profielen maar zijn redelijk stabiel in hun samenstelling.
- Zowel voor peilbuis 3 als peilbuis 4 was het monster van 21-6-2017 een uitbijter. Bij de andere monsters was dat niet het geval.
- Havenkanaal voor- en na lozing vertonen grote overlap, maar het Havenkanaal voor lozing varieert veel sterker in de tijd. Na lozing lijkt de populatie stabiel. Dit kan komen doordat het looswater stabiel is en daardoor dus het ontvangend water stabiliseert.



FIGUUR 3-3: PCOA VAN ALLE OTU'S VAN ALLE MONSTERS (VERSCHILLENDE KLEUREN) EN DATUMS (VERSCHILLENDE SYMBOLEN) VAN CASE 1 ASSEN (GEBASEERD OP BRAY-CURTIS DISSIMILARITEIT). DE GETALLEN BIJ DE PUNTEN ZIJN HET PERCENTAGE MICROBIELE POPULATIE VAN EFFLUENT (ZWART), INFLUENT (GRIJS), EN BELUCHTINGSTANK (BLAUW), BEPAALD MET SOURCE TRACKER.

De verschillen die in de PCoA plot te zien zijn tussen microbiële populaties van monsters, zullen normaal vooral komen door de meest dominante bacteriën. In Figuur 3-4 is de relatieve aanwezigheid van de 25 meest aanwezige bacteriën weergegeven per monster. Te zien is dat bijvoorbeeld de Havenkanaal monsters grote overeenkomsten laten zien in de meest dominante bacteriën, wat verklarend zal zijn voor de groepering in de PCoA plot. Ook de peilbuizen vertonen overeenkomsten met elkaar, maar ook onderlinge verschillen, zoals in de PCoA te zien is. Daarnaast vertonen de peilbuis monsters ook overeenkomsten met bacteriën in de sloot bij RWZI.



FIGUUR 3-4: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE OTU'S IN ALLE MONSTERS. GETOOND ZIJN DE GEMIDDELDE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA PER LOCATIE VAN CASE 1 ASSEN. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD OP GENUS NIVEAU. PB=PEILBUIS.

De volgende constatering kunnen worden gedaan aan de hand van de bovenstaande figuren:

- Effluent en de beluchtingstank vertonen overeenkomsten; dit is ook logisch aangezien effluent in feite bezonken water uit de beluchtingstank betreft.
- Havenkanaal voor- en na lozing verschillen nauwelijks.
- *Arcobacter*, *Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Saccharimonadales* en *Dechloromonas* lijken karakteristiek voor influent, effluent en sloot bij RWZI.
- *Aeromonas* komt vooral voor in influent, effluent en de beluchtingstank.
- Peilbuis 1, 3 en vooral peilbuis 4 bevatten genera die ook in de sloot bij RWZI voorkomen. Daarnaast bevat peilbuis 4 enige karakteristieke genera voor influent en effluent. Dit is ook terug te zien in de PCoA waar peilbuis 4 'de brug' vormt met de sloot en beluchtingstank.



FIGUUR 3-5: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE OTU'S IN DE BELUCHTINGSTANK EN IN WELKE MATE DEZE VOORKOMEN IN ANDERE MONSTERS. GETOOND ZIJN DE GEMIDDELDE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA PER LOCATIE. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD OP GENUS NIVEAU. PB=PEILBUIS.

Om te beoordelen of er sprake kan zijn van lekkage van afvalwater uit de actiefslibtank zijn de dominante bacteriën van de beluchtingstank voor alle andere monsters uitgelicht in Figuur 3-5. Daarnaast zijn de dominante bacteriegroepen voor de beluchtingstank, peilbuis 4 en de sloot bij de RWZI weergegeven in Figuur 3-6. Voor veel van de bacteriegroepen die ruim vertegenwoordigd zijn in de beluchtingstank geldt dat ze niet/nauwelijks in peilbuizen aanwezig zijn.

Vooraf *Flavobacterium*, *Dechloromonas* en *Rhodobacteriaceae\_unclassified* komen meer voor in de beluchtingstank, sloot en peilbuis 4 t.o.v. de andere peilbuizen. Het monster van 21-06-17 is duidelijk afwijkend waarbij meer *Dechloromonas*, *Malikia* en andere genera voorkomen die in beluchtingstank en sloot bij RWZI veel voorkomen (Figuur 3-6). Dit monster is ook de uitbijter dat veel meer gelijkenis toont met de sloot bij RWZI en de beluchtingstank (Figuur 3-3). De groep *Bacteria\_unclassified* komt juist minder voor in deze monsters en lijkt dus karakteristiek voor grondwater zonder lekkage. Dit geldt ook voor "*Candidatus Methylophilus*", "*Candidatus Methanoperedens*", *Woeseearchaeia*, *Dehalococcoida* en *Omnitrophicaeota* (Figuur 3-5). Van alle peilbuizen lijkt peilbuis 2 het meest 'intact', deze wijkt het meeste af van de andere peilbuizen (Figuur 3-3), bevat de minste genera die ook in de sloot bij RWZI voorkomen en de meeste grondwater genera (Figuur 3-5).

Bacteriën die kenmerkend zijn voor de beluchtingstank, het effluent en in mindere mate het influent zijn o.a. "*Candidatus Accumilibacter*" en *Tetrasphaera* (beide PAOs), *Zoogloea* komen in grote hoeveelheden voor in de beluchtingstank en niet/nauwelijks in PB4 en de sloot bij de RWZI (Figuur 3-5 en Figuur 3-6).



FIGUUR 3-6: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE OTU'S IN DE BELUCHTINGSTANK, PEILBUIS 4 (PB4) EN DE SLOOT BIJ RWZI. GETOOND ZIJN DE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD OP GENUS NIVEAU.

### Source Tracker

Om een indruk te krijgen van de mogelijke aanwezigheid van bacteriën uit de RWZI in het water uit de peilbuizen is het programma "Source Tracker" (Knights, Kuczynski et al. 2011) gebruikt (getallen bij de punten in Figuur 3-3). Bij deze analyses zijn de volgende potentiële bronnen voor vervuiling van het grondwater gedefinieerd als mogelijke "source":

- Influent van de RWZI
- Effluent van de RWZI
- Water uit de beluchtingstank van de RWZI

Het water uit de peilbuizen is gebruikt als "sink" en het programma "source tracker" berekent vervolgens welk deel van de "sink populatie" afkomstig is uit de verschillende bronnen (sources).

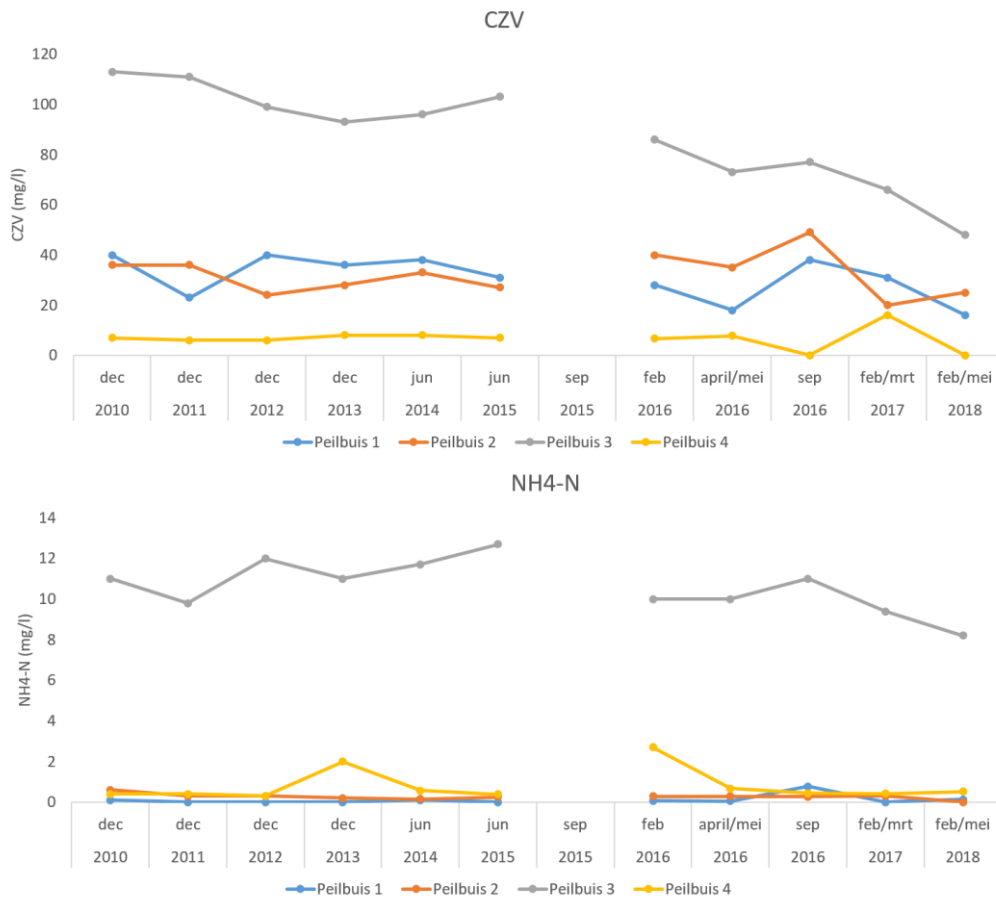
Uit deze analyse komt hetzelfde naar voren als in voorgaande analyses; peilbuizen 1 en 3 en in meerdere mate peilbuis 4 bevatten microben die karakteristiek zijn voor andere wateren terwijl dit voor peilbuis 2 niet zo lijkt te zijn. De mate waarin de verschillende peilbuizen micro-organismen die karakteristiek zijn voor andere wateren bevatten varieert sterk in de tijd. Op 21 juni 2017 bijvoorbeeld lijkt de microbiële populatie van peilbuis 4 meer op RWZI slootwater en bevat het ook micro-organismen die karakteristiek zijn voor RWZI effluent (Figuur 3-3). Dat geldt ook voor peilbuis 1 op 20-09-2018.

Verder bevat het Havenkanaal na lozing meer karakteristieke micro-organismen van de beluchtingstank van het RWZI dan vóór lozing. Dit is ook te zien in Figuur 3-5, waar

genera dominant in de beluchtingstank meer voorkomen in het Havenkanaal na lozing dan ervoor. De sloot bij de RWZI bevat op 27-3-2018 karakteristieke influent bacteriën, wat kan duiden op een riooloverstort. Dit effect is op het Havenkanaal na lozing en op peilbuis 4 ook te zien. Het is inderdaad duidelijk dat riool specifieke genera zoals *Arcobacter* en *Paludibacter* meer aanwezig zijn in dat slootmonster (Figuur 3-6). Uit neerslag gegevens en uit aanvoer naar RWZI blijkt dat er die dag lichte regenval is geweest, maar zeker geen extreme neerslag die tot overstorten zou hebben geleid.

#### Chemische lekdetectie parameters

Voor een nadere onderbouwing zijn de NGS resultaten naast de gegevens gelegd die de afgelopen jaren door het waterschap verzameld zijn over peilbuizen 1 t/m 4. In Figuur 3-7 is het chemische zuurstof verbruik (CZV) en de ammonium concentratie (NH<sub>4</sub>-N) weergegeven zoals die de afgelopen jaren gemonitord is (2010-2017) in de verschillende peilbuizen. Te zien is dat het CZV en NH<sub>4</sub> gehalte in peilbuis 3 fors hoger is dan in de andere peilbuizen. In vergelijking met de andere peilbuizen is het gehalte CZV in peilbuis 4 veruit het laagste. Ook het NH<sub>4</sub> gehalte van peilbuis 4 is fors lager dan dat van peilbuis 3. Dit strookt niet met de aanname dat er in de buurt van peilbuis 4 sprake zou zijn van een lekkage omdat er in dat geval juist in peilbuis 4 verhoogde concentraties CZV en NH<sub>4</sub> te verwachten zijn. Deze constatering wordt onderstreept door de uitgevoerde analyses op medicijnresten en zoetstoffen. Geen van de medicijnresten en zoetstoffen is in verhoogde concentraties aangetoond in peilbuis 4. Deze metingen zijn uitgevoerd tot feb/mei 2018, terwijl de fingerprinting metingen uitgevoerd zijn tot en met september 2018. Om conclusies over lekkage te kunnen trekken, zouden er dus tegelijk chemische en fingerprint metingen gedaan moeten worden. Wel kan gesteld worden dat peilbuizen 1, 3 en 4 fluctuaties in NH<sub>4</sub>-N vertonen of zeer hoog zijn. Peilbuis 2 vertoont een zeer stabiele en lage hoeveelheid. Een lekkage zou hebben kunnen zorgen voor deze fluctuaties, die niet in peilbuis 4 optreden.



FIGUUR 3-7: HET CHEMISCHE ZUURSTOFVERBRUIK (CZV; BOVEN) EN DE AMMONIUM CONCENTRATIE (NH<sub>4</sub>-N; ONDER) IN DE VERSCHILLENDE PEILBUIZEN, GEMETEN TUSSEN 2010 EN 2018.

### 3.2.3 Conclusies

Het doel van deze case was om de toepasbaarheid van DNA fingerprinting te verkennen voor het vaststellen van een eventuele lekkage van de actief slibtank van de RWZI Assen. Geconcludeerd wordt dat DNA fingerprinting voor deze case een bruikbaar hulpmiddel is geweest om de invloed van RWZI influent, effluent en beluchtingstank te onderscheiden.

Er is duidelijk geworden dat peilbuis 2 verschilt van andere peilbuizen; het heeft de minste invloed van bacteriën van andere wateren dan grondwater. Verder staan peilbuis 3, en vooral peilbuis 4 wel onder invloed van bacteriën die karakteristiek zijn voor ander wateren zoals beluchtingstank, influent en effluent van het RWZI. De combinatie van NGS gegevens met reeds beschikbare gegevens (CZV, NH<sub>4</sub>, medicijnresten en zoetstoffen) zou herhaald moeten worden op dezelfde tijdstippen, zodat conclusies getrokken kunnen worden getrokken over lekkage van de RWZI Assen. NGS lijkt een extra middel om lekkage aan te tonen terwijl lekkage niet heeft gezorgd voor verhoogde concentraties CZV en NH<sub>4</sub> in peilbuizen. NGS lijkt ook te kunnen dienen als “early warning system” dat er een lekkage is opgetreden in een pijpleiding. Meer NGS metingen zijn echter noodzakelijk om deze conclusie te toetsen, aangezien er grote verschillen lijken te zijn in de mate van lekkage per monsterdatum.



### 3.3 Waterschap Vallei en Veluwe: Invloed RWZI op oppervlaktewater

#### 3.3.1 Casebeschrijving

Waterschap Vallei en Veluwe en de gemeente Epe maakten d.m.v. het waterkwaliteitsspoor in 2010 al afspraken over verbeteringen in de afvalwaterketen in kern Epe. De uitvoering in 2014 van deze maatregelen, getiteld 'bestrijding stankoverlast' was onderverdeeld in twee categorieën, namelijk geen-spijt en onderhoud. Zo werd mogelijk gemaakt dat een deel van de droogvallende Dorpse Beek doorspoeld kan worden met effluent van RWZI Epe dat verder naar de Grift wordt geleid (Figuur 3-8). Tevens werd benedenstrooms gebaggerd tot aan de monding met de Grift en werd er gemaaid in de watergang zelf en werden beschoeiingen vervangen.

Het is voor Waterschap Vallei en Veluwe onduidelijk tot hoever de negatieve invloed van de RWZI in het ontvangend water reikt en wat het aandeel is van het effluent uit de RWZI verder stroomafwaarts in een watersysteem. DNA fingerprinting geeft hier mogelijk antwoord op. De hoofdvraag is vooral of DNA fingerprinting een goede techniek is om onderscheid te (kunnen) maken op verschillende afvalwaterbronnen (RWZI vs riooloverstorten).

**Hoofdvraag:** Geeft het effluent een waarneembaar effect op het oppervlaktewater en zo ja, hoe ver heeft dit effect doorwerkt? De hypothese is dat de volgende deelvragen beantwoord kunnen worden met DNA fingerprinting:

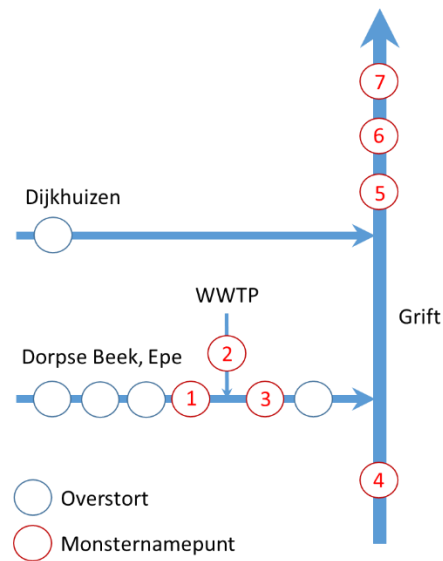
1a. Is er verschil in de bacteriële fingerprint in de Dorpse beek, tussen het meetpunt bovenstrooms de RWZI (meetpunt 1) en het meetpunt benedenstrooms van de RWZI (meetpunt 3)? Is effluent van de RWZI (meetpunt 2) traceerbaar in de Dorpse beek (meetpunt 3)?

1b. Is er verschil in de bacteriële fingerprint in de Grift, tussen het meetpunt bovenstrooms van de instroom van de Dorpse beek (meetpunt 4) en het meetpunt benedenstrooms van de instroom van de Dorpse beek (meetpunt 5)?

1c. Is de bacteriële fingerprint van de Dorpse beek (na RWZI) (meetpunt 3) zichtbaar/traceerbaar op het meetpunt in de Grift benedenstrooms van de instroom van de Dorpse beek (meetpunt 5)?

2. Is te verwachten dat met DNA fingerprint onderscheid te maken tussen invloed van RWZI en invloed van riooloverstorten op de Dorpse beek en de Grift?

Een schematische weergave van waterstromen in het systeem Dorpse Beek/Grift staat in Figuur 3-8, met daarin de monsterpunten voor fingerprinting aangegeven. Er zijn aan de Dorpse Beek twee externe overstorten (Korte Kuipersweg en Beekstraat) en één externe overstort met randvoorziening BBB De Pal allen bovenstrooms van RWZI Epe. Eén overstort (Oenerweg) ligt benedenstrooms van RWZI Epe. Er ligt ook een overstort (Plekweversweg) op de kop van watergang Dijkhuizen (stroomafwaarts in de Grift).



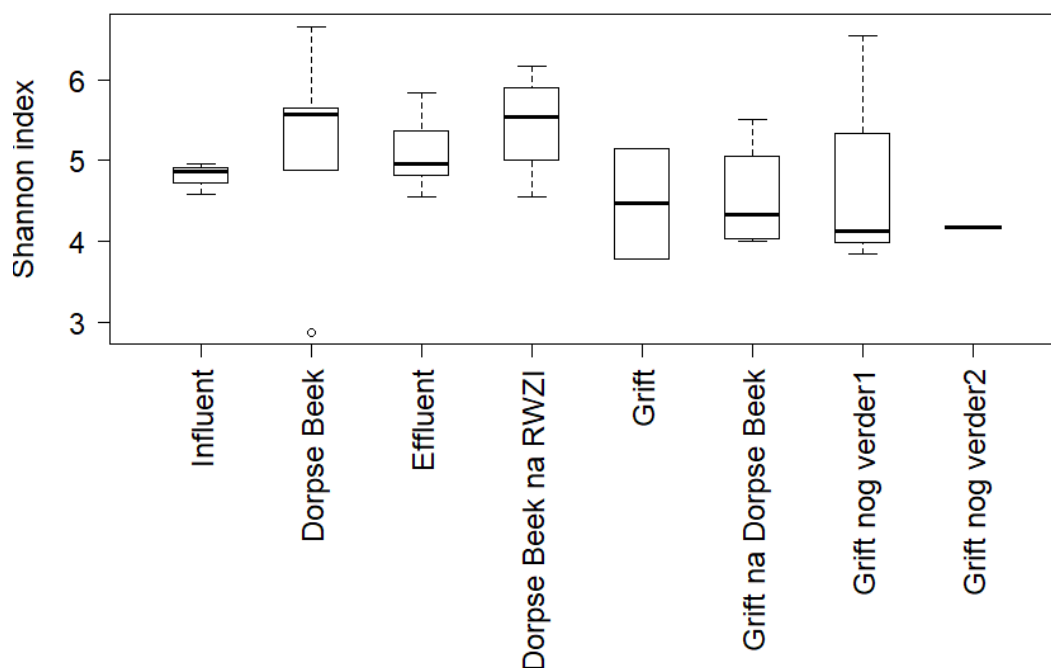
FIGUUR 3-8: SCHEMATISCHE WEERGAVE DORPSE BEEK, GRIFT EN DIJKHUIZEN, INCLUSIEF OVERSTORTLOCATIES EN LIGGING MONSTERNAMELOCATIES.

Om de hoofdvraag te beantwoorden is op de volgende punten bemonsterd:

1. Dorpse Beek (Neustringweg voor RWZI Epe)
2. Effluent RWZI
3. Dorpse Beek na RWZI (Dorpse Beek Epe Hoevestraat na instroom mengmonster na zuivering)
4. Grift (Grift Eperweg vóór instroom Dorpse Beek)
5. Grift na Dorpse beek (Grift Vemderweg na instroom Dorpse Beek)
6. Grift nog verder 1 (Grift Oenerweg 121)
7. Grift nog verder 2 (Griftdijk (Grift Heerde Griftdijk 4))

### 3.3.2 Resultaten

In Figuur 3-9 is de diversiteit (Shannon index) van de verschillende monsterlocaties gedurende de tijd weergegeven. Te zien is dat enkele monsters nauwelijks variatie in diversiteit vertonen op verschillende monsterdata (influent, Grift nog verder2) terwijl de andere monsters juist grote temporele variatie in diversiteit vertonen.



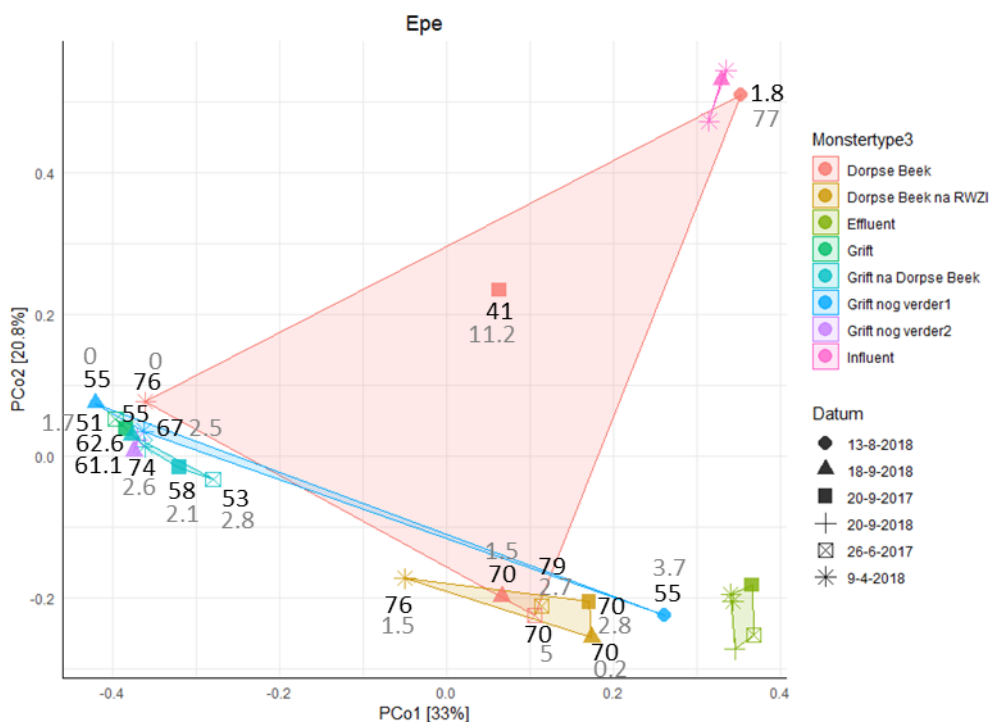
FIGUUR 3-9: SHANNON DIVERSITEIT BOXPLOTS VOOR DE VERSCHILLENDE MONSTERS VAN CASE 2 EPE.

Om te beoordelen in welke mate de verschillende bacteriepopulaties op elkaar lijken is in Figuur 3-10 is een PCoA opgesteld. In de PCoA zijn per bemonsteringspunt de afzonderlijke populaties weergegeven waardoor de spreiding in de populaties inzichtelijk wordt. Op basis van de PCoA kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- De bacteriepopulaties in influent van de RWZI zijn op vrijwel alle meetdagen identiek. Dit geldt ook voor het effluent van de RWZI. Dit is ook te zien aan de lage variatie aan diversiteit van influent en effluent (Figuur 3-9:) en bevestigt dus de microbiële stabiliteit van deze monsters. Verder zijn influent en effluent monsters zeer verschillend en moet onderscheid tussen invloed van deze bronnen eenvoudig gemaakt kunnen worden.
- De monsters van de Dorpse Beek vóór lozing vertonen grote variëteit in de tijd:
  - o Het monster dat op 26-6-2017 en op 18-09-2018 genomen is van de Dorpse Beek voorafgaand aan de RWZI lijkt sterk op de monsters van de Dorpse Beek na het lozingspunt en liggen relatief dicht bij de effluentmonsters. Dit kan een indicatie zijn dat het effluent van de RWZI Epe de Dorpse beek zowel stroomafwaarts als ook stroomopwaarts kan beïnvloeden, afhankelijk van de tijd.
  - o Het monster van de Dorpse beek voorafgaand aan het RWZI lozingspunt dat op 9-4-2018 is genomen lijkt sterk op het water van de Grift. Mogelijk is er slechts op deze meetdag geen sprake geweest van beïnvloeding door RWZI effluent.
  - o Het monster dat op 20-9-2017 en 13-8-18 genomen is uit de Dorpse beek lijkt niet op het water uit de Grift en ook niet op effluent, maar meer op influent. Dat is een indicatie dat er destijds beïnvloeding is geweest door een riooloverstort.
- De monsters van de Dorpse Beek na RWZI lozing liggen tussen de Dorpse Beek vóór lozing en het effluent. Ook vertonen de monsters variëteit in de tijd. Deze variëteit is wel minder dan bij de Dorpse Beek voorafgaand aan het lozingspunt van de RWZI. Dit duidt op invloed van het effluent op de Dorpse Beek na de RWZI; omdat het effluent stabiel is gedurende het jaar en bij grotere invloed

van de effluentlozing mogelijk de populatie in de Dorpse Beek na RWZI meer 'naar effluent trekken' (bv op 20-9-2017 en 18-9-2018).

- De bacteriepopulaties op de verschillende locaties in de Grift vertonen allen veel overeenkomsten met elkaar, behalve die van 13-8-18. Voorafgaand en na de Dorpse beek treedt er echter wel een kleine verandering op in de samenstelling van de populatie; De Grift na Dorpse Beek wijkt af van de monsters van de Grift voor Dorpse Beek en verderop. Verderop in de Grift lijkt de bacteriepopulatie dus weer sterk op de initiële populatie van de Grift. De bacteriepopulatie van de Grift wordt dus beïnvloed door de Dorpse Beek, wat verderop verdund. Op 13-8-18 lijkt er veel invloed van RWZI effluent en/of influent te zijn geweest, via de Dorpse beek of direct. De Dorpse Beek leek op deze datum meer op influent.

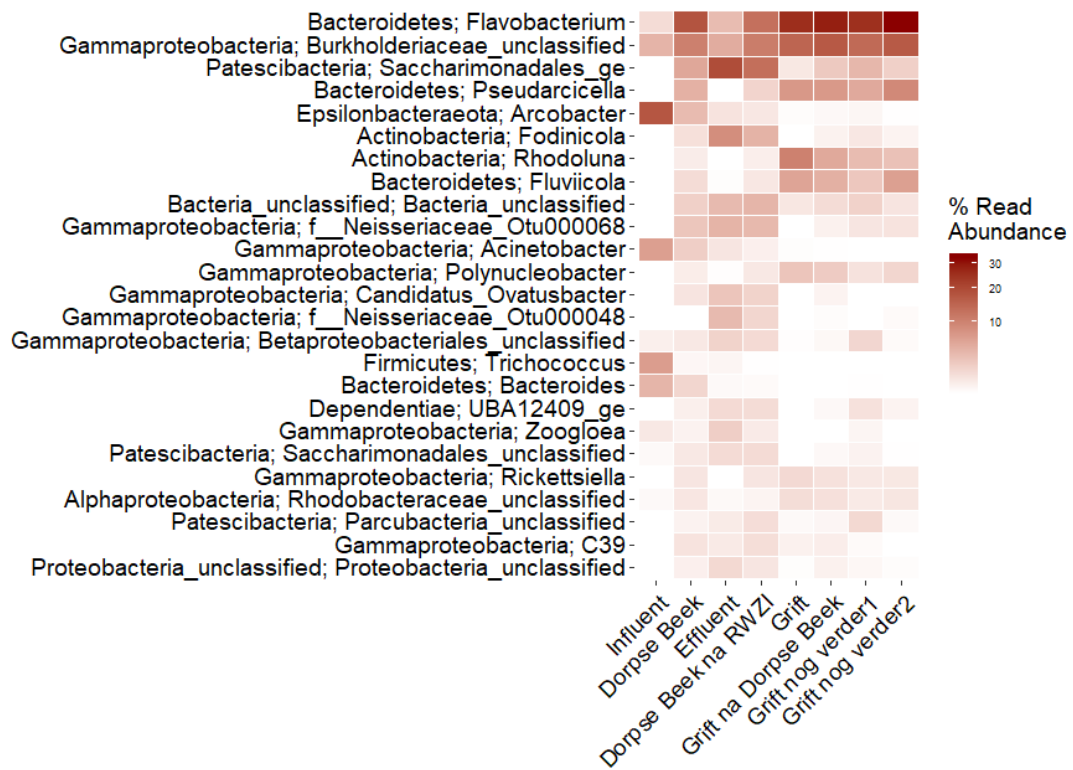


FIGUUR 3-10: PCOA VAN ALLE OTU'S VAN ALLE MONSTERS (VERSCHILLENDE KLEUREN) EN DATUMS. DE GETALLEN BIJ DE PUNTEN ZIJN HET PERCENTAGE MICROBIELE POPULATIE VAN EFFLUENT (ZWART) EN INFLUENT (GRIJS), BEPAALD MET SOURCE TRACKER.

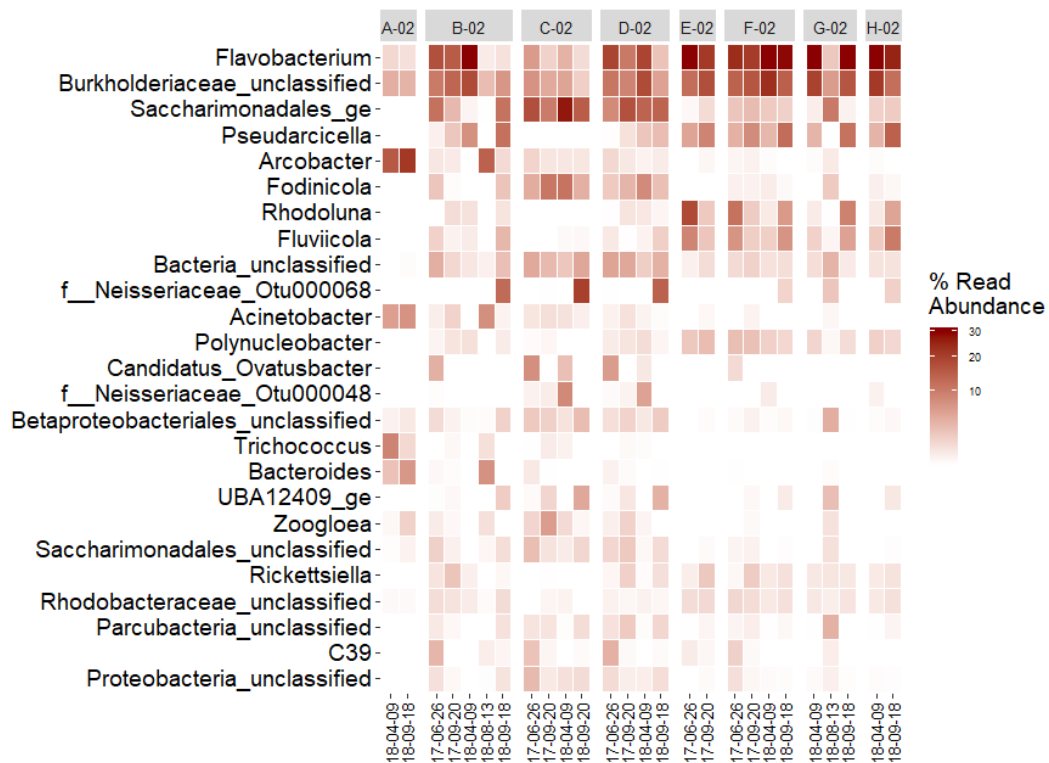
In Figuur 3-11 is de relatieve aanwezigheid van de 25 meest voorkomende bacteriegroepen per monster weergegeven. Diezelfde data is uitgesplitst per monsterdatum in Figuur 3-12. Deze bacteriegroepen zouden verklarend kunnen zijn voor de verschillen die we zien in Figuur 3-10. Enkele zaken die opvallen:

- Ten opzichte van de Dorpse beek na RWZI bevat de Dorpse beek voor het RWZI verhoogde percentages bacteriegroepen die kenmerkend zijn voor het influent van de RWZI Epe (Figuur 3-11). Specifieke bacteriën zoals *Arcobacter* en *Acinetobacter* en *Bacteroides* komen voorafgaand aan het lozingspunt van de RWZI in hogere mate voor. Dit kan indicatief zijn voor een riool overstort. Dit is voor alle monsterdata behalve 9-4-18 het geval, waarbij op 13-8-18 dit effect het grootst is (Figuur 3-12). Uit analyse van de overstort data lijkt inderdaad dit de enige periode zonder overstort. Dit komt overeen met Figuur 3-10 waar het monster van 9-4-18 het minst beïnvloed is door RWZI influent en die van op 13-8-18 het meest.

- Andere groepen komen juist meer voor in het RWZI effluent en in de Dorpse Beek na lozing, en niet of minder vóór lozing, zoals *Saccharimonadales*, *Fodinicola*, maar ook *Neisseriaceae* (Figuur 3-12). Dit impliceert dat deze bacteriegroepen indicatief zijn voor RWZI effluent, en niet voor influent. Wel moet gezegd worden dat er ook groepen die veel in het RWZI effluent voorkomen ook vóór lozing in de Dorpse Beek voorkomen. Mogelijk is dit veroorzaakt doordat de effluentlozing zich beide kanten op verspreid, afhankelijk van het tijdstip. Dit zou de grote variabiliteit van de microbiële populatie in de tijd van de Dorpse Beek kunnen verklaren. Ook kan dit verklaren waarom de microbiële populatie van de Dorpse Beek voor en na RWZI op sommige tijdstippen niet veel verschilt, en op andere wel (Figuur 3-10).
- Andere groepen komen meer voor in de Dorpse beek vóór dan na lozing, en niet of minder in het influent en effluent. Deze inheemse bacteriegroepen worden dus mogelijk verdund door invloed van effluent, zoals *Flavobacterium*, *Burkholderaceae*, maar ook *Pseudarcicella* en *Fluviicola* (Figuur 3-11 en Figuur 3-12). Dit impliceert dat deze bacteriegroepen juist indicatief zijn voor oppervlakte water zonder invloed van RWZI lozing. De abundantie van deze genera neemt dan ook toe naarmate er verder van het effluent richting de Grift bemonsterd wordt (behalve voor het monster van 13-8-18 van de Grift).
- Het monster van 13-8-18 van de Grift lijkt onder invloed te staan van RWZI effluent en vertoont hogere mate van *Saccharimonadales*, *Fodinicola*, *Zoogloa*, *Saccarimonadadales\_unclassified* en *Arcobacter*, net zoals het effluent en de Dorpse Beek na RWZI.
- De Grift na Dorpse Beek bevat duidelijk soortgelijke bacteriën als de Dorpse Beek die niet in de Gift vóór invloed van de Dorpse Beek voorkomen. De Grift wordt dus duidelijk beïnvloed door de Dorpse Beek, wat de observatie in Figuur 3-10 bevestigt.
- Ten opzichte van 'Grift nog verder1' lijkt het aandeel bacteriegroepen wat gelijkenis vertoont met Dorpse Beek beperkt lager te zijn in 'Grift nog verder2'. Indien het monster 'Grift nog verder2' daadwerkelijk verder weg ligt van de Dorpse Beek, kan dit er op duiden dat het effect hiervan afneemt naarmate de afstand groter wordt.



FIGUUR 3-11: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE OTU'S IN ALLE MONSTERS VAN CASE 2 EPE. GETOOND ZIJN DE GEMIDDELDE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA PER LOCATIE. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS.



FIGUUR 3-12: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE OTU'S IN ALLE MONSTERS VAN CASE 2 EPE. GETOOND ZIJN DE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS. A-02= INFLUENT, B-02=DORPSE BEEK, C-02=EFFLUENT, D-02=DORPSE BEEK NA RWZI, E-02=GRIFT, F-02=GRIFT NA DORPSE BEEK, G-02=GRIFT NOG VERDER 1, H-02= GRIFT NOG VERDER 2.

In Figuur 3-13 zijn een aantal typische RWZI bacteriën in het effluent weergegeven en hoeveel deze voorkomen in de overige monsters. Ten eerste is te zien dat de samenstelling van het RWZI effluent verschilt op verschillende data, en dat deze fingerprint terug te zien is in de oppervlaktewateren die op dezelfde datum gemonsterd zijn. Deze profielen zijn verdund en vertonen dus een lagere relatieve abundantie, maar dezelfde samenstelling (te zien aan de cirkeldiagrammen). Verder verifieert deze weergave weer duidelijk dat Dorpse Beek vóór lozing op 26-06-2017 sterk beïnvloed was door RWZI effluent, wat niet het geval was op 20-09-2017. De Grift voor instroom van de Dorpse Beek bevat in alle gevallen nauwelijks RWZI bacteriën terwijl dit na instroom van de Dorpse beek wel het geval is, waarbij hier ook de invloed van RWZI groter is op 26-06-2017.



FIGUUR 3-13: DE RELATIEVE HOEVEELHEID VAN EEN AANTAL KARAKTERISTIEKE BACTERIEGROEPEN VAN RWZI EFFLUENT DIE IN DE VERSCHILLENDE MONSTERS VOORKOMEN OP VERSCHILLENDE TIJDSTIPPEN. DE CIRKELDIAGRAMMEN GEVEN DEZELFDE DATA WEER, MAAR GEVEN EEN DUIDELIJKER BEELD VAN HET MICROBIEEL PROFIEL. DE PERCENTAGES ONDER DE CIRKELDIAGRAMMEN ZIJN HET PERCENTAGE MICROBIELE POPULATIE VAN RWZI EFFLUENT, BEPAALD MET SOURCE TRACKER.

### Source Tracker

Op de verkregen DNA fingerprinting data zijn analyses uitgevoerd met Source Tracker om te onderzoeken welk deel van de bacteriële gemeenschap in het oppervlaktewater afkomstig is van het riool en van het effluent van de RWZI in Epe. Dit wordt uitgedrukt in een percentage microbiële populatie dat afkomstig is uit riool en uit RWZI effluent (zie getallen in Figuur 3-10 en de percentages in Figuur 3-13). Zoals te zien is, vertonen alle monsters een behoorlijke mate van RWZI microben. Dit bevestigt de bovenstaande waarnemingen en de verwachtingen. Op 26-06-2017 is de mate van invloed van RWZI bacteriën rond 70% in de Dorpse Beek, terwijl dit op 20-09-2017 maar 41% is. Daarnaast is er een groter verschil na lozing op de Dorpse Beek op 20-09-2017 dan op 26-06-2017 (Figuur 3-13). Ook is te zien dat de Grift voordat de Dorpse Beek inprikt



duidelijk minder RWZI invloed vertoond dan erna. Als laatste is duidelijk dat ook source tracker goed onderscheid kan maken tussen de bacteriële fingerprint van influent en RWZI effluent; het Dorpse Beek monster van 13-08-2018 dat het meest lijkt op influent bevat ook het hoogste percentage bacteriën van influent (77%) wat doorwerkt op de Grift aan de Oenerweg (Grift nog verder 1) dat van 0 naar 3.7% microben van influent stijgt (Figuur 3-10).

### Riooloverstort en RWZI effluent invloed

Op de meeste meetdagen is de invloed van bacteriën uit effluent op de Dorpse Beek duidelijk zichtbaar. De Dorpse Beek monsters van 20-09-2017 en vooral 13-08-2018 lijken het karakteristieke effluent bacteriën te bevatten, maar daar lijken juist veel karakteristieke rioolwater bacteriën aanwezig. Deze bevindingen zijn te zien in de PCoA plot, heatmaps en in source tracker resultaten die weergegeven zijn in de PCoA plot.

Volgens overstortgegevens waren er in 2017 en 2018 een aantal overstortgebeurtenissen aan de Neustrinkweg en De Pal, beide gelegen vóór de RWZI en uitmondend aan de Dorpse Beek (Figuur 3-14). De hevigste overstort momenten lijken inderdaad plaatsgevonden te hebben rond 20-09-17 en 13-08-18. In april 2018 waren er inderdaad geen overstortmomenten, dat overeenkomt met de microbiologische waarnemingen. De source tracker analyse lijkt daarom riool overstort te kunnen onderscheiden van RWZI invloed.

Datum	Volume (m3) geschat	Rioolwater (%)
9-06-17	226.98	-
26-6-2017	-	5.3
8-09-17	1112.54	-
9-09-17	1633.82	-
17-09-17	64.69	-
17-09-17	103.34	-
17-09-17	617.53	-
20-9-2017	-	11.15
9-4-2018	-	0
29-05-18	872.83	-
13-08-18	1864.19	77.27

FIGUUR 3-14: OVERSTORTGEGEVENS AAN DE NEUSTRINKWEG EN DE PAL (AAN DORPSE BEEK VÓÓR RWZI) IN GESCHAT VOLUME (M<sup>3</sup>) EN HET PERCENTAGE RIOOLWATER MICROBIOOM IN DE DORPSE BEEK VÓÓR RWZI OP VERSCHILLENDE TIJDSTIPPEN, ZOALS BEPAALD MET SOURCE TRACKER.

### 3.3.3 Conclusies

De microbiële populatie van Dorpse Beek lijkt duidelijk in meer of mindere mate op RWZI influent en effluent, en de effluentlozing lijkt zich beide kanten op te verspreiden. Ondanks dat de RWZI Epe in 2017 met gemiddelde effluentconcentraties van 5 mg/l N-totaal en 0,15 mg/l P-totaal zeer goed functioneerde blijkt uit de NGS analyses dat de Dorpse beek een duidelijke fingerprint van het RWZI effluent heeft. Dit is niet verwonderlijk aangezien de Dorpse Beek in droge periodes voornamelijk bestaat uit RWZI effluent. Het effect van de RWZI Epe op de Dorpse Beek vóór lozing verschilt erg in de tijd en zorgt voor grote spreiding tussen monsters die op verschillende tijdstippen genomen zijn.

Door deze grote fluctuaties in de tijd is analyse alleen mogelijk per tijdstip en niet in het algemeen. Deze dataset maakt het daarom lastig om uitspraken te doen over invloed van RWZI effluent; er is namelijk geen 'nul-meting' zonder RWZI invloed en we kunnen dus niet met zekerheid zeggen of bepaalde microbiële populaties op beide plekken inheems zijn, of echt komen door RWZI effluent, en wat de achtergrond RWZI effluent invloed is, die toelaatbaar is. Een combinatie van NGS met *E. coli* en Enterococcon getallen zou moeten helpen met het vaststellen bij welke relatieve invloed van RWZI effluent de kolonievormende getallen omhoog gaan en de waterkwaliteit negatief beïnvloedt. Er zijn karakteristieke bacteriegroepen aan te wijzen voor riool (RWZI influent), RWZI effluent en voor oppervlaktewater. Daarnaast is naast de aanwezigheid van karakteristieke RWZI effluent bacteriën in de Dorpse Beek, de invloed van Dorpse Beek op de Grift zeer duidelijk en deze invloed neemt af naarmate verderop de Grift bemonsterd wordt.

Het antwoord op de onderzoeksvragen op basis van deze data is:

1a. Is er verschil in de bacteriële fingerprint in de Dorpse beek, tussen het meetpunt bovenstrooms de RWZI (meetpunt 1) en het meetpunt benedenstrooms van de RWZI (meetpunt 3)? Is effluent van de RWZI (meetpunt 2) traceerbaar in de Dorpse beek (meetpunt 3)?

Ja, maar dit varieert in de tijd. De monsters van Dorpse Beek bovenstrooms het RWZI vertonen veel variatie in de tijd waarbij sommige monsters meer gelijkenis hebben met de Grift of met Dorpse Beek benedenstrooms de RWZI. Alle monsters van Dorpse Beek benedenstrooms de RWZI lijken meer op RWZI effluent dan op monsters verder benedenstrooms bij de Grift. Er zijn ook duidelijk meer karakteristieke RWZI genera aanwezig in de Dorpse Beek dan in de Grift. Dit duidt er dus op dat het effluent de Dorpse Beek stroomafwaarts (en ook stroomopwaarts) beïnvloedt en dat het beekwater verder verdund naarmate het benedenstrooms bij de Grift terecht komt.

1b. Is er verschil in de bacteriële fingerprint in de Grift, tussen het meetpunt bovenstrooms van de instroom van de Dorpse beek (meetpunt 4) en het meetpunt benedenstrooms van de instroom van de Dorpse beek (meetpunt 5)?

De Grift bovenstrooms vertoont meer overeenkomsten met monsters van de Grift verderop (nogverder 1 en nogverder 2) dan met de Grift benedenstrooms van Dorpse Beek. De Grift benedenstrooms na Dorpse Beek vertoont ook hogere abundantie van de top 25 abundante genera uit het effluent dan bovenstrooms en verderop. De invloed van de Dorpse Beek is dus duidelijk waarneembaar, en neemt weer af, waarschijnlijk door verdunning.

1c. is de bacteriële fingerprint van de Dorpse beek (na RWZI) (meetpunt 3) zichtbaar/traceerbaar op het meetpunt in de Grift benedenstrooms van de instroom van de Dorpse beek (meetpunt 5)?

Ja, zie antwoord op 1c. het is alleen nog niet mogelijk om een waardeoordeel aan de traceerbaarheid te hangen.

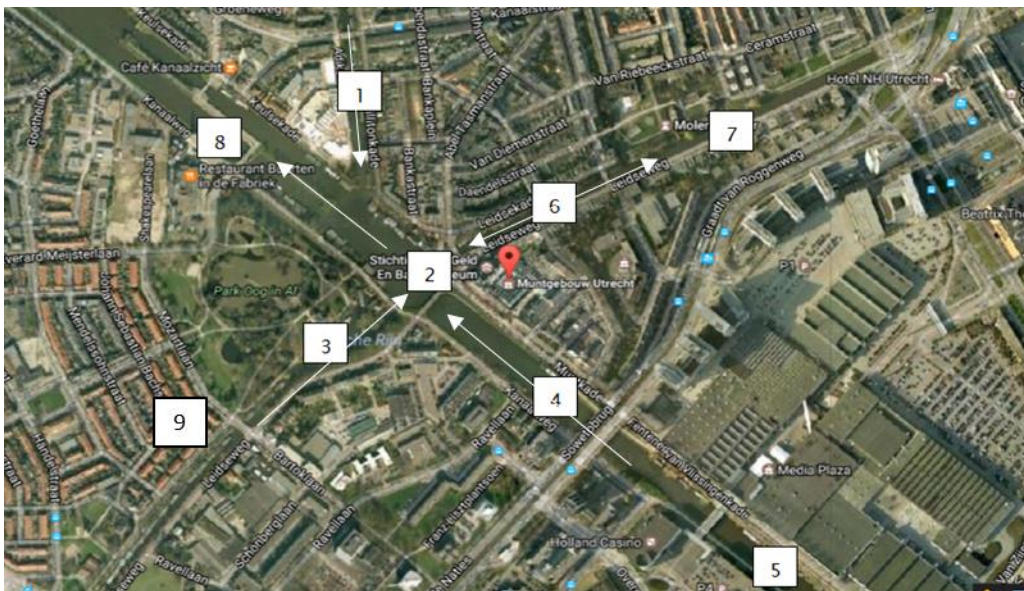
2. Is met DNA fingerprinting onderscheid te maken tussen invloed van RWZI en invloed van riool overstorten op de Dorpse beek en de Grift?

Ja. Vanwege het grote verschil in de fingerprint van influent en effluent en het kleine debiet van de Dorpse beek is de verwachting dat overstorten een groot effect kunnen hebben op de waterkwaliteit van de Dorpse Beek. De aanwezigheid van riooloverstort bacteriën is het grootst op 20-09-2017 en vooral 13-08-2018, wat samenvalt met overstortmomenten.

### 3.4 Gemeente Utrecht en HDSR: Waterkwaliteit in oppervlaktewater

#### 3.4.1 Casebeschrijving

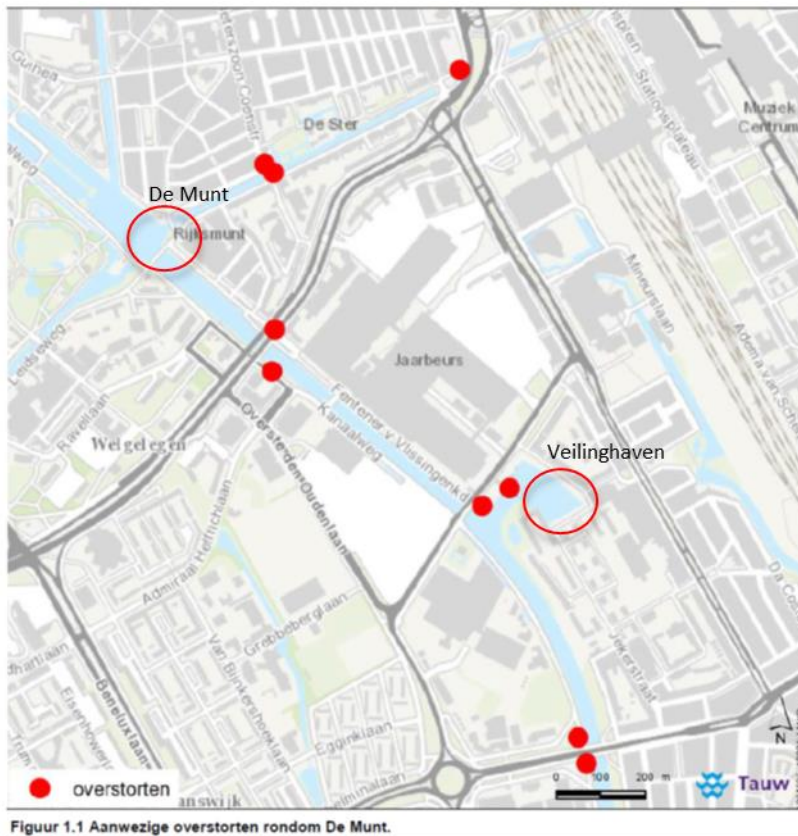
De Munt is een locatie in het Merwedekanaal in Utrecht. Het ligt op een kruispunt van diverse watergangen (Figuur 3-15). Bij hevige neerslag wordt water uit het Merwedekanaal via het sluisencomplex geloosd richting het Amsterdam Rijnkanaal. De stroomrichting is dan noordwaarts. Bij droog weer is er nagenoeg geen stroming aanwezig.



FIGUUR 3-15: STROMINGSRICHTINGEN EN MONSTERLOCATIES RONDOM ZWEMLOCATIE 'DE MUNT'.

Bij warm weer zwemmen veel Utrechters in het water bij het vlonder van De Munt. Sinds een aantal jaar staat daar een bordje met 'negatief zwemadvies'. De provincie heeft in overleg met Rijkswaterstaat en de gemeente het bord geplaatst omdat de plek steeds populairder werd, de plek niet veilig is en het officieel vaarwater (er wordt intensief geroeid) is.

De gemeente Utrecht /HDSR bemonsteren het water sinds 2013 en controleert de waterkwaliteit. Vaak is de kwaliteit goed, maar bij hevige regenval treden één of meer riool overstorten (bovenstrooms) (Figuur 3-16) in werking en wordt de zwemplek beïnvloed. Vooral na de hevige bui van 28 juli 2014 is deze invloed duidelijk waarneembaar geweest. Inschatting van de gemeente is dat de overstort ten zuiden van de Sowetobrug, onder de Kanaalweg, de belangrijkste is.



FIGUUR 3-16: LIGGING OVERSTORTEN NABIJ DE MUNT EN VEILINGHAVEN (BRON: NOTITIE "ZWEMWATERKWALITEIT DE MUNT NA OVERSTORTING" (TAUW, 8 SEPTEMBER 2014))

**Hoofdvraag:** Is DNA fingerprinting een goede techniek om oppervlaktewaterstromen te (kunnen) onderscheiden en daarmee de bron van bacteriële overschrijdingen aan te kunnen wijzen?

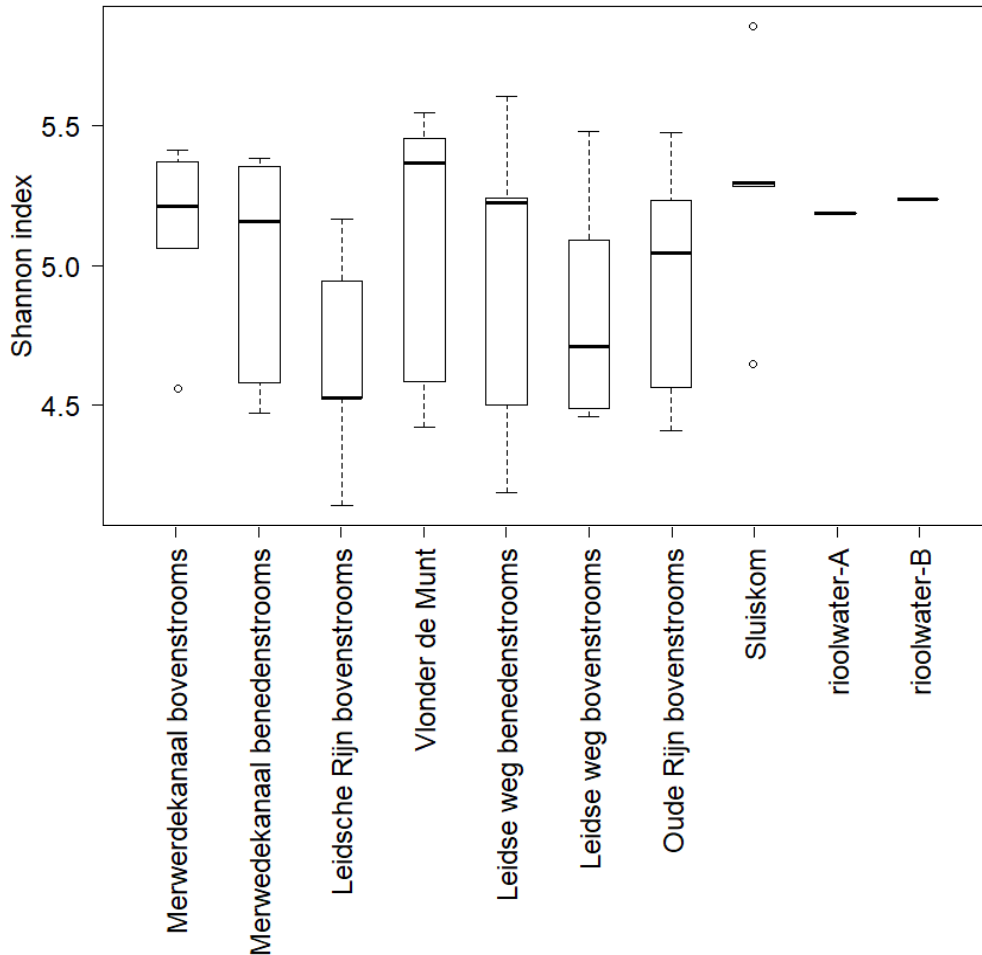
Om de hoofdvraag te beantwoorden is op de volgende punten bemonsterd (Figuur 3-15):

1. Oude Rijn bovenstreams.
2. Vlonder de Munt.
3. Leidse Rijn bij wijk Oog in Al bovenstreams.
4. Merwedekanaal benedenstreams riooloverstort Sowetobrug.
5. Merwedekanaal bovenstreams riooloverstort Sowetobrug.
6. Leidse weg benedenstreams riooloverstort J.P. Coenstraat.
7. Leidse weg bovenstreams riooloverstort J.P. Coenstraat.
8. Sluiskom Oog in Al.
9. Rioolwater A en Rioolwater B.

Het monsterschema is opgenomen in bijlage 1.

### 3.4.2 Resultaten

In Figuur 3-17 is de diversiteit (Shannon index) van de verschillende monsters weergegeven. Te zien is dat de variatie in de diversiteit van de verschillende oppervlaktewatermonsters groot is (veel variatie in diversiteit over de verschillende monsterdagen). Bij de monsters van Sluiskom zijn er twee grote uitschieters te zien, terwijl de overige monsters zoveel op elkaar lijken dat de spreiding in de boxplot niet te zien is.



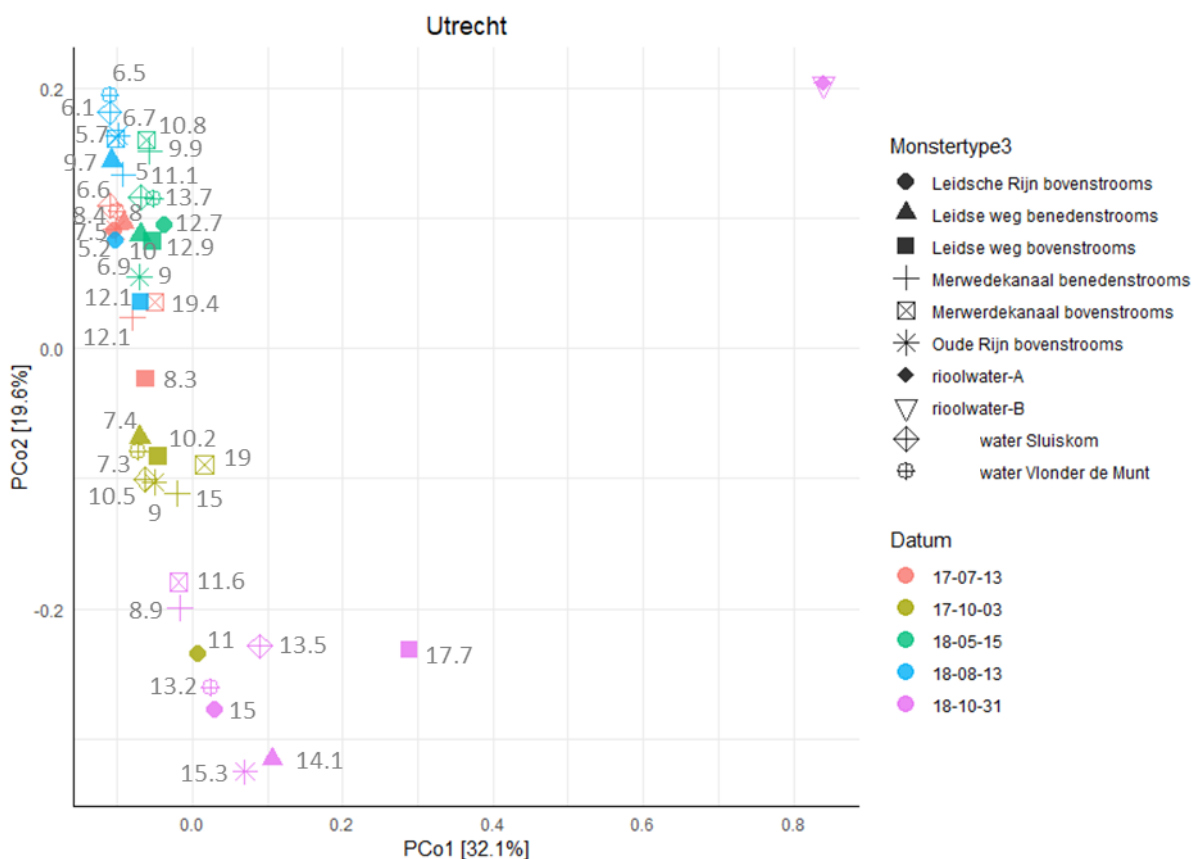
FIGUUR 3-17: DIVERSITEIT (SHANNON INDEX) VAN DE VERSCHILLENDE MONSTERS VAN CASE GEMEENTE UTRECHT EN HDSR

Om te beoordelen in welke mate de verschillende bacteriepopulaties op elkaar lijken is in Figuur 3-18 een PCoA opgesteld. In de PCoA zijn per bemonsteringspunt de afzonderlijke populaties weergegeven waardoor de spreiding in de populaties inzichtelijk wordt. Op basis van de PCoA kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- Alle oppervlaktewatermonsters van een specifieke datum vertonen veel overeenkomsten met elkaar; monsters van een zelfde locatie wijken tussen verschillende datums sterk van elkaar af
- Het feit dat de oppervlaktewaterkwaliteit samenhangt met de datum en niet met de locatie kan betekenen dat al het oppervlaktewater met elkaar in verbinding staat. Het kan ook zijn dat seizoensgebonden invloeden op de

microbiële populatie groter zijn dan de verschillen tussen locaties. Een andere optie is dat de invloed van rioolwater afhankelijk van het tijdstip is.

- De oppervlaktewatermonsters van 31-10-2018 en in mindere mate 3-10-2017 wijken af van de overige drie meetrondes. De oorzaak voor dit verschil is niet bekend maar het is opvallend dat het in beide gevallen een monster in oktober betreft.
- De oppervlaktewatermonsters wijken sterk af van de rioolwatermonsters



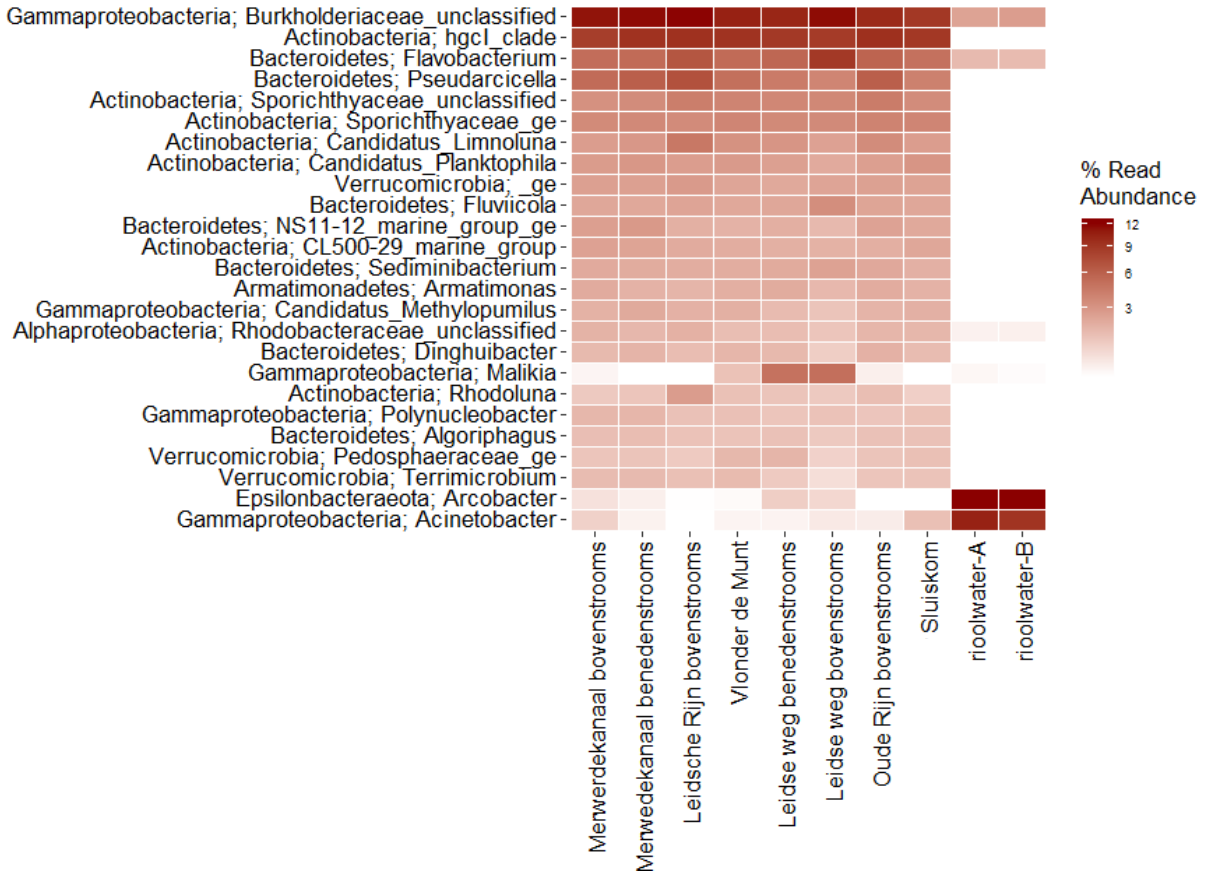
FIGUUR 3-18: PCOA VAN ALLE OTU'S VAN ALLE MONSTERS (VERSCHILLENDE SYMBOLEN) EN DATUMS (VERSCHILLENDE KLEUREN) VAN CASE 4 UTRECHT (GEBASEERD OP BRAY-CURTIS DISTANCE). DE GETALLEN BIJ DE PUNTEN ZIJN HET PERCENTAGE MICROBIELE POPULATIE VAN INFLUENT, BEPAALD MET SOURCE TRACKER.

In Figuur 3-19 is de relatieve aanwezigheid van de 25 meest aanwezige bacteriën weergegeven per monster, dat ook per monsterdatum gescheiden is in Figuur 3-20. Deze bacteriegroepen zouden verklarend kunnen zijn voor de verschillen die we zien in Figuur 3-18. Te zien is dat de bacteriepopulaties in alle oppervlaktewatermonsters grote gelijkenissen vertonen, zoals ook duidelijk ter zien is in Figuur 3-18. Er zijn hooguit wat accentverschillen waar te nemen tussen de verschillende punten. De verwachting is dat er bij het in werking treden van overstorten wel degelijk verschillen op zullen treden en beter inzicht ontstaat in welke waterstroom nu van invloed is op de waterkwaliteit.

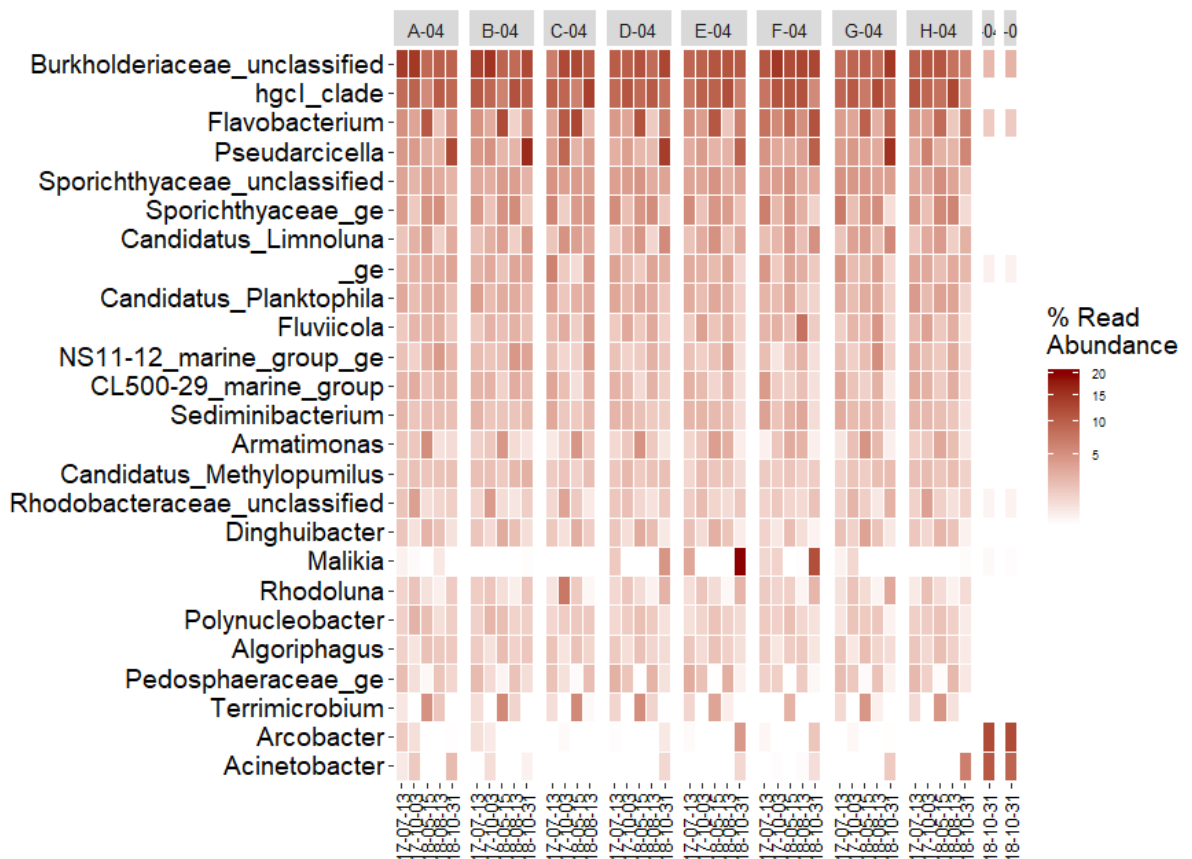
De rioolwatermonsters wijken sterk af en bevatten voornamelijk *Arcobacter* en *Acinetobacter* welke ook in lage concentraties in de meeste oppervlaktewatermonsters aangetroffen worden. Deze genera komen in andere influent of effluent monsters van RWZI's ook veel voor en lijken dus te kunnen dienen als indicator voor rioolwater en



influent van RWZI. Ook is hier weer te zien dat *Flavobacterium* en *Burkholderiaceae* meer voorkomen in oppervlaktewateren, zoals in andere cases ook het geval was. Deze kunnen dus mogelijk dienen als indicatorbacteriegroepen voor oppervlakte water. Het is opvallend dat de bacteriën die dominant aanwezig (>9%) zijn in oppervlaktewater (*Burkholderiaceae* en *Flavobacterium*) ook aanwezig zijn in het rioolwater (<3%).



FIGUUR 3-19: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE MICROBIËLE GROEPEN IN ALLE MONSTERS VAN CASE 4 UTRECHT. GETOOND ZIJN DE GEMIDDELDE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA PER LOCATIE. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS.



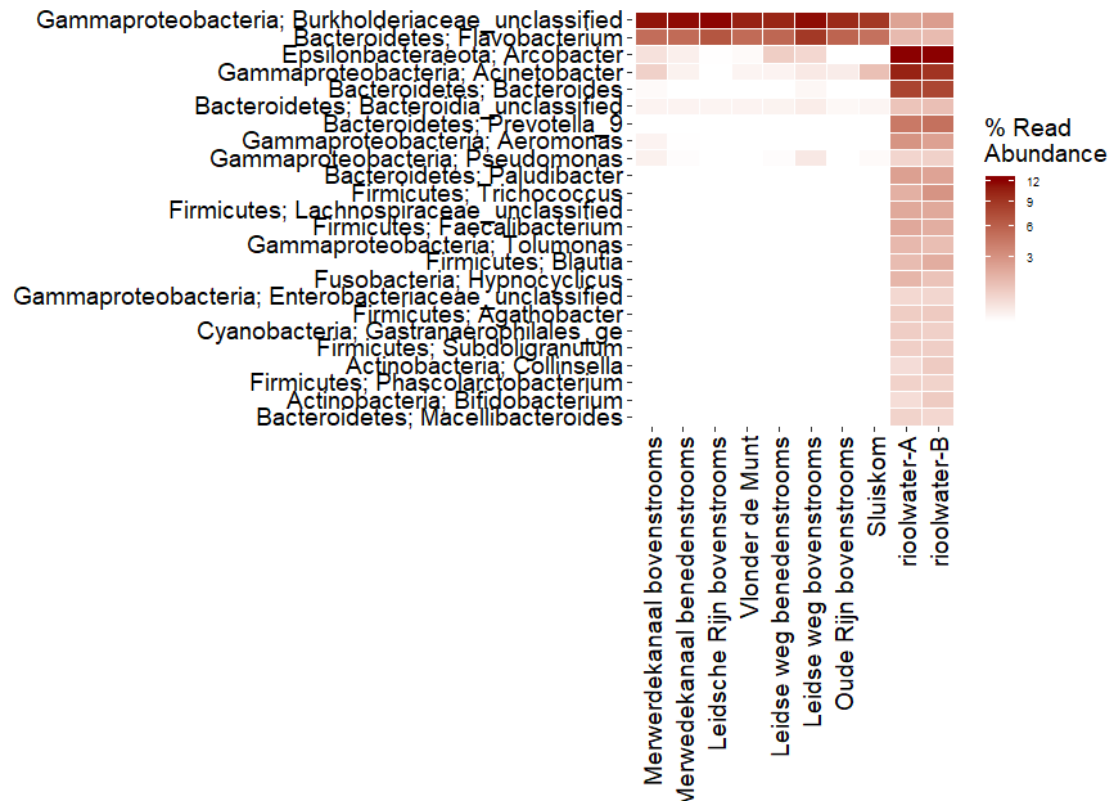
FIGUUR 3-20: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE MICROBIËLE GROEPEN IN ALLE MONSTERS VAN CASE 4 UTRECHT. GETOOND ZIJN DE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS. A-04= MERWERDEKANAAL BOVENSTROOMS, B-04= MERWERDEKANAAL BENEDENSTROOMS, C-04= LEIDSCHE RIJN BOVENSTROOMS, D-04= VLONDER DE MUNT, E-04= LEIDSE WEG BENEDENSTROOMS, F-04= LEIDSE WEG BOVENSTROOMS, G-04= OUDE RIJN BOVENSTROOMS, H-04= SLUISKOM, I-04= RIOOLWATER-A, J-04= RIOOLWATER-B.

In FIGUUR 3-21 zijn de 25 meest dominante bacteriën van het rioolwater weergegeven voor de overige monsters, dat in Figuur 3-22 gescheiden is per monsterdatum. Opvallend is dat naast de hiervoor genoemde bacteriegroepen, ook *Bacteroides*, *Prevotella* en *Aeromonas* dominant aanwezig zijn in rioolwater maar juist nauwelijks aanwezig zijn in oppervlaktewater. Deze groepen worden ook in andere RWZI influent en effluent monsters als dominant gevonden en kunnen dus dienen als indicator bacteriën voor rioolwater en RWZI influent. Het is goed te zien dat indicatorbacteriegroepen zoals *Arcobacter*, *Acinetobacter* en *Bacteroides* wel degelijk voorkomen in bepaalde oppervlaktewateren wat een invloed van riool kan betekenen. Omdat we geen 'nul-meting' hebben van oppervlaktewater zonder invloed van RWZI lozing, kunnen we niet inschatten wat de normale relatieve hoeveelheid van de rioolwater bacteriën zou moeten zijn in "schoon" oppervlaktewater. Omdat het ook niet bekend is welke monsters invloed van riool overstort hebben gehad, is het niet mogelijk de microbiële response daarvan te meten. Er zijn geen overstort kolken bemonsterd en daarom is het niet mogelijk de oppervlaktewatermonsters te vergelijken met 'ongemengd' overstortwater. Op basis van deze informatie, kunnen daarom geen conclusies getrokken worden over de mate van eventuele beïnvloeding van de oppervlaktewaterkwaliteit door riool overstorten.

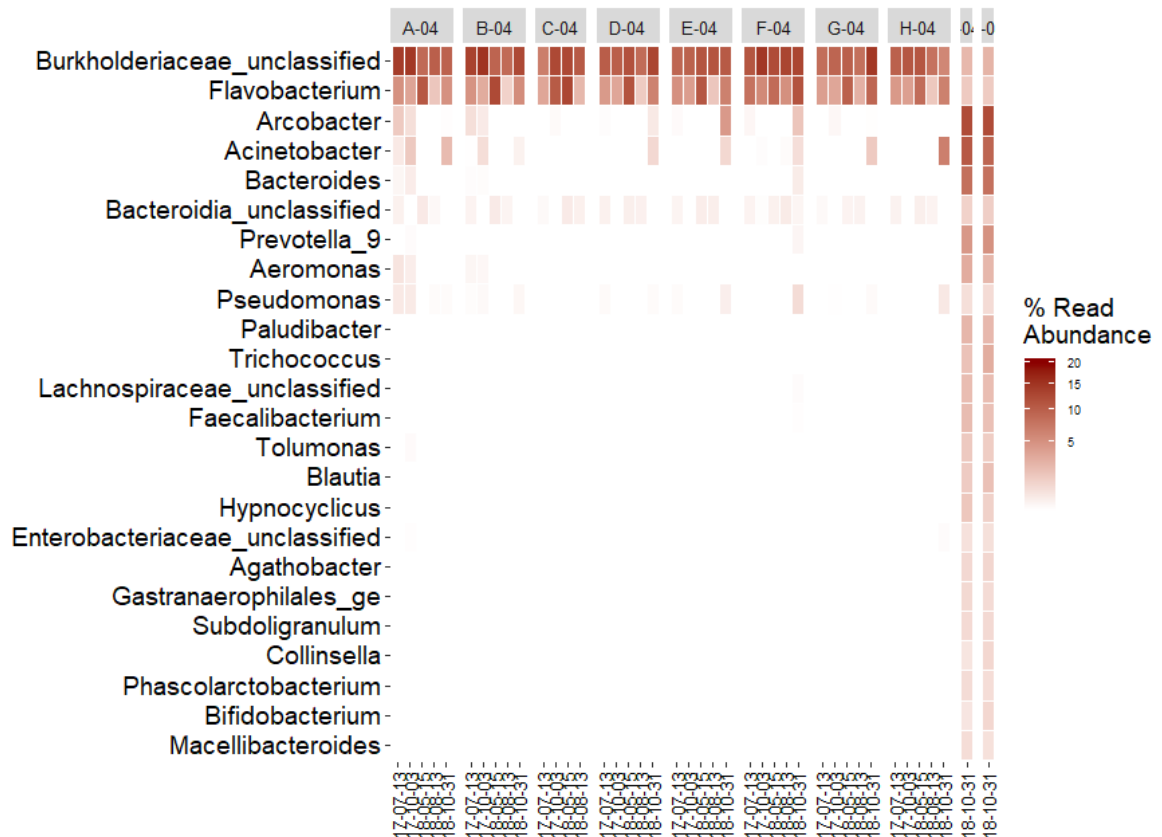


Het advies voor het vervolg is daarom:

1. herhalen van het monsternamprogramma rondom een heftige bui op dezelfde 8 punten
2. meten van 3 kolken van dergelijke overstorten voorafgaand aan een overstort incident



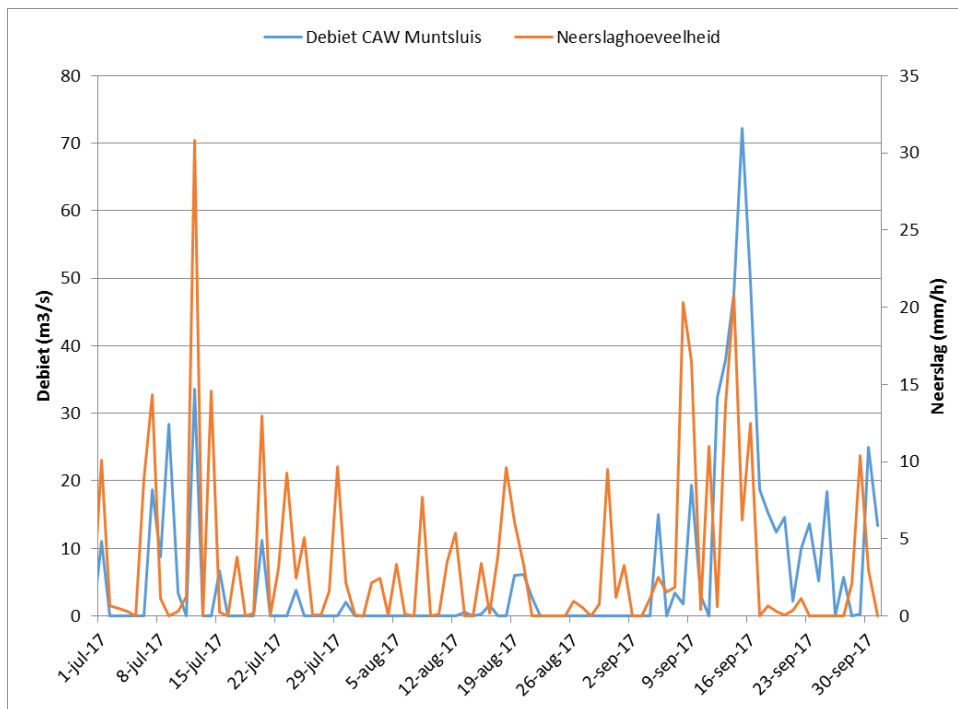
FIGUUR 3-21: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE MICROBIËLE GROEPEN IN DE RIOOLWATER MONSTERS, WEERGEGEVEN VOOR ALLE ANDERE MONSTERS VAN CASE 4 UTRECHT. GETOOND ZIJN DE GEMIDDELDE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA PER MONSTERLOCATIE. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS.



FIGUUR 3-22: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE MICROBIËLE GROEPEN IN DE RIOOLWATER MONSTERS, WEERGEGEVEN VOOR ALLE ANDERE MONSTERS VAN CASE 4 UTRECHT. GETOOND ZIJN DE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS. A-04= MERWERDEKANAAL BOVENSTROOMS, B-04= MERWERDEKANAAL BENEDENSTROOMS, C-04= LEIDSCHE RIJN BOVENSTROOMS, D-04= VLONDER DE MUNT, E-04= LEIDSE WEG BENEDENSTROOMS, F-04= LEIDSE WEG BOVENSTROOMS, G-04= OUDE RIJN BOVENSTROOMS, H-04= SLUISKOM, I-04= RIOOLWATER-A, J-04= RIOOLWATER-B.

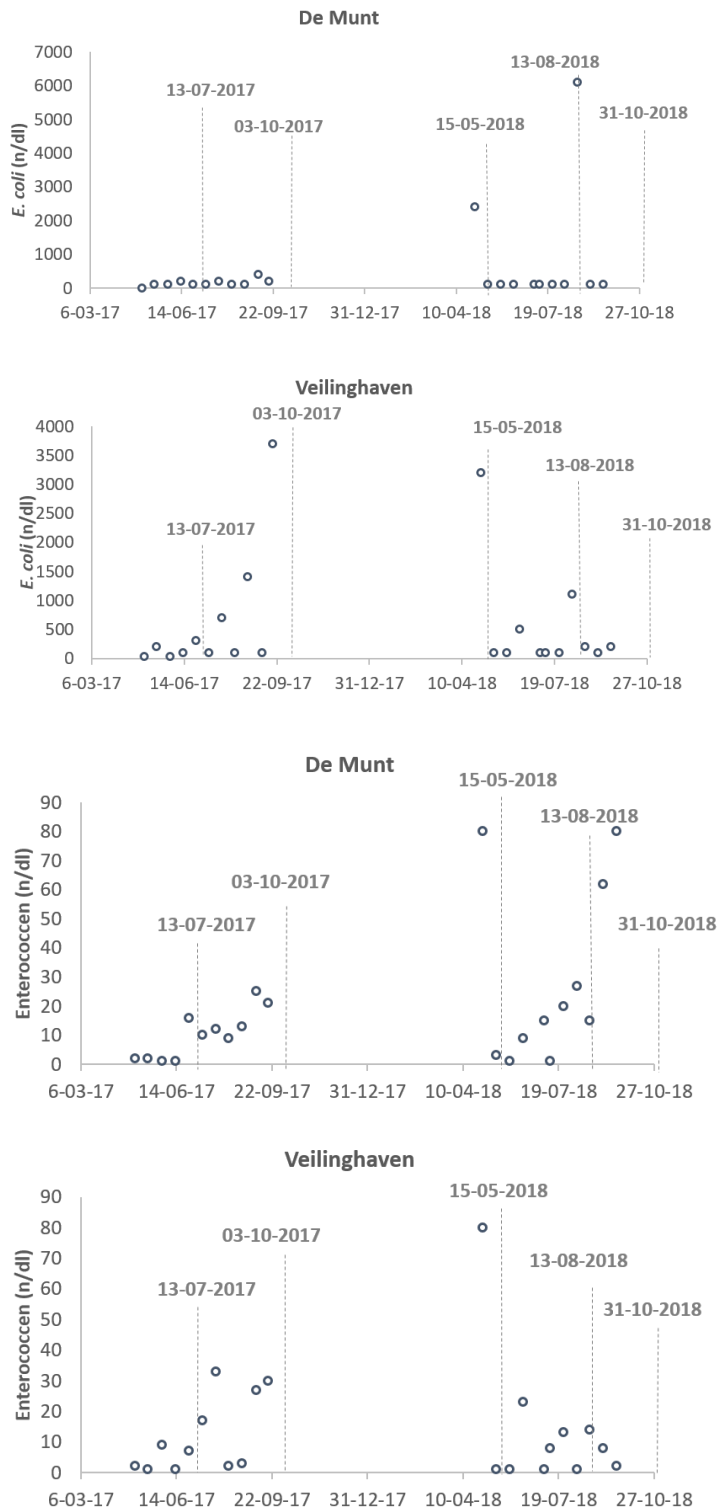
#### Relatie met *E. coli* en Enterococcen

Naast NGS zijn ook *E. coli* / Enterococcen concentraties beschikbaar van diverse meetpunten. In Figuur 3-23 valt te zien dat in de zomermaanden van 2017 er nauwelijks water via de Muntsluis gespuid is, wat betekent dat water rondom deze locatie stagnant is of afwatert naar het zuiden van het Merwedekanaal.



FIGUUR 3-23: DEBIET CAW MUNTSLUIS (M3/S) EN NEERSLAGGEGEVENS (MM/H).

In de Veilinghaven en bij de Munt zijn ook koloniegetallen gemeten voor *E. coli* en Enterococci (Figuur 3-24). Veilinghaven ligt zuidelijk van de monsterpunten in het Merwedekanaal en dus kan dit kanaal water van deze locatie ontvangen. Duidelijk is dat vanaf 13-07-2017 en vooral op 3-10-2017 koloniegetallen stijgend zijn. Dit is ook terug te zien aan het aandeel riool bacteriën dat het hoogst is op deze data in Merwedekanaal (Figuur 3-18).



FIGUUR 3-24: E COLI EN ENTEROCOCCEN TELLINGEN VOOR CASE UTRECHT, SPECIFIEK VOOR DE MUNT EN VEILINGHAVEN. DE WEERGEGEVEN DATA ZIJN DATA WANNEER NGS MONSTERS GENOMEN ZIJN.

### Source Tracker

Het resultaat van Source Tracker analyse waarbij de monsters rioolwater-A en rioolwater-B zijn gebruikt als “source” en de oppervlaktewatermonsters als “sink” is weergegeven in Figuur 3-18. Hier staan de getallen bij de punten voor het percentage microbiële profiel van rioolwater. Te zien is dat de meeste locaties op 31-10-2018 het meest rioolwater bacteriën bevatten. Daarnaast is duidelijk dat het Merwedekanaal beneden- en bovenstrooms het meeste rioolwater bacteriën bevat op 13-07-2017 en 03-10-2017. De microbiële profielen van de monsters die meer rioolwater bacteriën bevatten lijken niet meer op rioolwater dan andere monsters, maar clusteren vooral op monsterdatum. Dit is niet het geval geweest bij de meeste andere cases waar ook het aandeel RWZI bacteriën vastgesteld is. Daar lijkt de hoeveelheid RWZI en rioolbacteriën in het water een grote invloed te hebben op de gelijkheid met het microbiële profiel van RWZI effluent en rioolwater.

#### 3.4.3 Conclusies

Op basis van de NGS resultaten kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- Alle oppervlaktewatermonsters van een specifieke datum vertonen veel overeenkomsten met elkaar. Monsters van een zelfde locatie wijken tussen verschillende datums sterk van elkaar af
- Het feit dat de oppervlaktewaterkwaliteit samenhangt met de datum en niet met de locatie kan betekenen dat al het oppervlaktewater met elkaar in verbinding staat. Het kan ook zijn dat seizoensgebonden invloeden op de microbiële populatie groter zijn dan de verschillen tussen locaties. De aanwezigheid van karakteristieke rioolwater bacteriën lijkt geen sterke invloed te hebben hierop. Een andere optie is dat de invloed van RWZI effluent een sterke invloed afhankelijk van het tijdstip is.
- De verwachting is dat er bij het in werking treden van overstorten wel degelijk verschillen op zullen treden en beter inzicht ontstaat in welke waterstroom nu van invloed is op de waterkwaliteit.
- De rioolwatermonsters wijken sterk af en bevatten voornamelijk *Arcobacter* en *Acinetobacter* welke ook in lage concentraties in de meeste oppervlaktewatermonsters aangetroffen worden. Deze genera komen in andere influent of effluent monsters van RWZI's ook veel voor en lijken dus te kunnen dienen als indicator voor rioolwater en influent van RWZI. Ook is hier weer te zien dat *Flavobacterium* en *Burkholderiaceae* meer voorkomen in oppervlaktewateren, zoals in andere cases ook het geval was. Deze kunnen dus mogelijk dienen als indicatorbacteriegroepen voor oppervlakte water.
- Er zijn niet genoeg meetpunten genomen om de resultaten van Source Tracker (aandeel rioolwater bacteriën) te koppelen aan *E. coli*/Enterococci metingen.

### 3.5 Wetterskip Fryslân: Zwemwaterkwaliteit in oppervlaktewater

#### 3.5.1 Casebeschrijving

In de afgelopen jaren zijn er bij de officieel vastgestelde zwemwaterlocaties in de Burgumermar en De Leien herhaaldelijk overschrijdingen van de zwemwaterparameter *E.coli* en een verhoging van intestinale Enterococcen vastgesteld. Op grond van de EU-zwemwaterrichtlijn resulteerde dit bij de zwemwaterlocaties tot een kwaliteitsbeoordeling variërend van 'aanvaardbaar' tot 'slecht'. Zwemwaterlocaties 'Zwemwater Dagrecreatieterrein Burgumer Mar' en 'Zwemwater Burgumermar Eastermar' hebben momenteel een beoordeling 'aanvaardbaar'. Zwemwater de Leien Rottevalle heeft de beoordeling 'slecht'.

Het stroomgebied vanaf de RWZI Burgum naar Opeinde betreft boezemwater met een vast waterpeil van ca. -0,52 m NAP. De waterstroming is hoofdzakelijk van Burgum naar het Burgumermeer toe en vandaaruit hoofdzakelijk richting Dokkumer Nieuwe Zijlen en Gaarkeuken (Groningen), door afwatering naar het Lauwersmeer toe. Vanuit De Leien is dit ook de hoofdstroom. In sommige gevallen, bij dichte sluizen en afwatering bij Harlingen, zal het boezemwater richting Burgum lopen. Bij geen spui en in werking zijnde grote gemalen in het zuiden van het beheersgebied, zal de stroming zuidelijk zijn. Als er in zijn geheel geen afwatering en werkende gemalen zijn, zal het boezemwater alleen onder invloed staan van de windrichting.

Grote bronnen van fecale verontreiniging in het onderzoekgebied zijn de RWZI's in Burgum en Drachten en wellicht de nabij gelegen industrie, landbouw, riool overstorten, recreatievaart en ganzen in de winterperiode. Om hier duidelijkheid over te krijgen heeft er in 2015 een bronopsporingsonderzoek van de fecale verontreiniging plaatsgevonden. Uit dit onderzoek bleek dat de verontreiniging veelal uit humane bronnen komt. Een vervolgonderzoek hierop is het onderhavige DNA fingerprinting project om met behulp van DNA-technieken afvalwaterstromen te kunnen traceren.

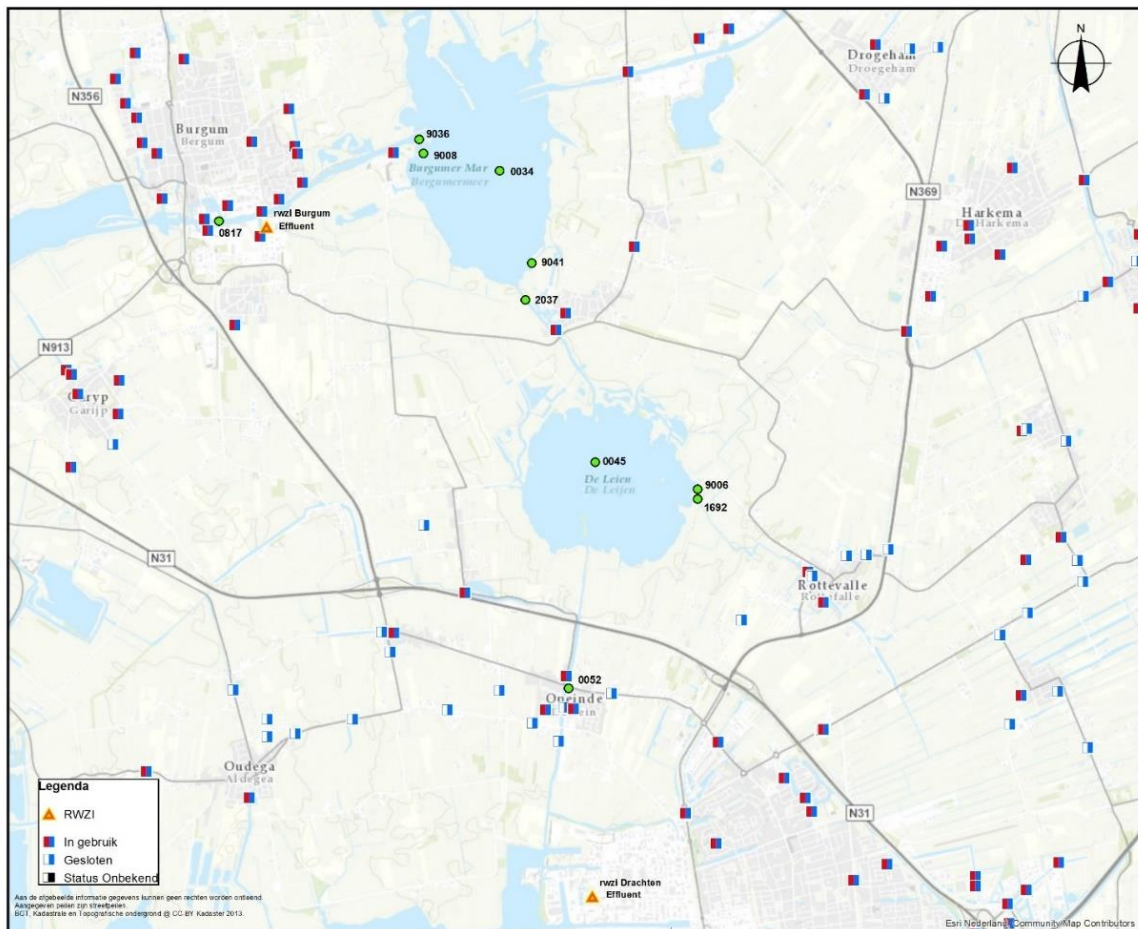
**Hoofdvraag:** Is DNA fingerprinting een goede techniek om oppervlaktewaterstromen te (kunnen) onderscheiden en daarmee de bron van bacteriële overschrijdingen aan te kunnen wijzen?

Om de hoofdvraag te beantwoorden is op de volgende punten bemonsterd:

1. Prinses Margriet Kanaal oostelijk van jachthaven (0817)
2. Effluent Burgum
3. Burgumermar strekdam / Burgumermar Bergum (9036)
4. Zwemwater Dagrecreatieterrein Burgumer Mar (9008)
5. Burgumermar midden (0034)
6. Zwemwater Burgumermar Eastermar (9041)
7. De Lits t.n.v. Eastermar (2037)
8. De Leien midden (0045)
9. Zwemwater de Leien Rottevalle (9006)
10. De Leien instroom vanuit Rottevalle/De Lits Camping (1692)
11. Opeinderkanaal (0052)
12. Effluent Drachten

In Figuur 3-25 zijn alle meetpunten aangegeven waar metingen worden verricht. Er zijn tien meetpunten in het oppervlaktewater en in totaal twee meetpunten bij de RWZI's

Burgum en Drachten voor metingen van het effluentwater. In Figuur 3-25 zijn ook de overstorten in het gebied te zien (rood/blauw=in gebruik; wit/blauw=gesloten)

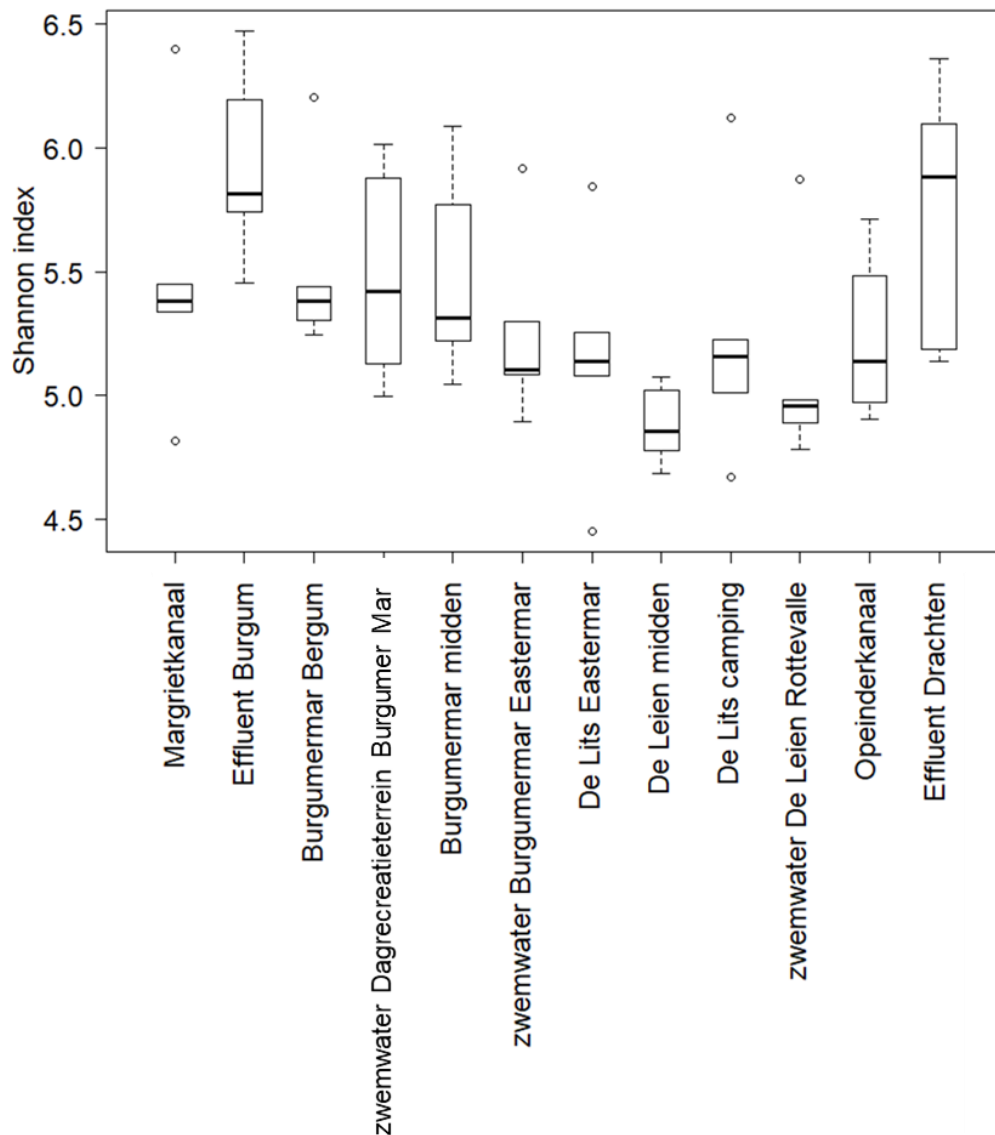


FIGUUR 3-25: LIGGING MEETPUNTEN (GELE CIRCELS), RWZIS, EN OVERSTORTEN (ZIE LEGENDA) VAN CASE WETTERSKIP FRYSLÂN.

Het monsterschema is opgenomen in bijlage 1.

### 3.5.2 Resultaten

In Figuur 3-26 is de diversiteit (Shannon index) van de verschillende monsters weergegeven. Wat opvalt, is dat de variatie in diversiteit sterk verschilt per monster. Het effluent van Burgum, Zwemwater Dagrecreatieterrein Burgumer Mar en het effluent van de RWZI Drachten variëren bijvoorbeeld veel in diversiteit terwijl het Margrietkanaal en het Zwemwater De Leien Rottevalle nauwelijks variatie in diversiteit vertonen.



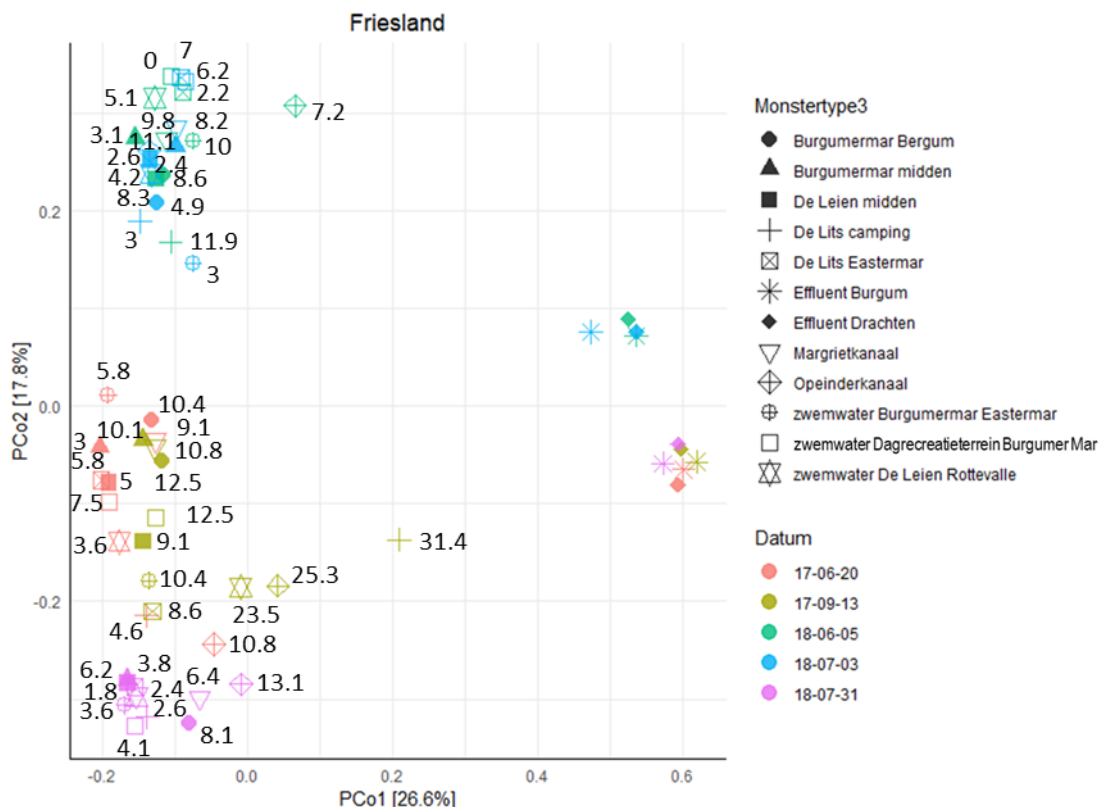
FIGUUR 3-26: DIVERSITEIT (SHANNON INDEX) VAN DE VERSCHILLENDE MONSTERS VOOR CASE 5 WETTERSKIP FRYSLÂN

Om te beoordelen in welke mate de verschillende bacteriepopulaties op elkaar lijken is in Figuur 3-27 is een PCoA opgesteld. In de PCoA zijn per bemonsteringspunt de afzonderlijke populaties weergegeven waardoor de spreiding in de populaties inzichtelijk wordt. Op basis van de PCoA kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- Alle oppervlaktewatermonsters van een specifieke datum vertonen veel overeenkomsten met elkaar, onafhankelijk van locatie.
- Alle effluentmonsters van een specifieke datum vertonen veel overeenkomsten met elkaar, onafhankelijk van locatie. Dat maakt onderscheid tussen beide RWZI's lastig.
- Monsters van een zelfde locatie wijken dus voor verschillende datums sterk van elkaar af.



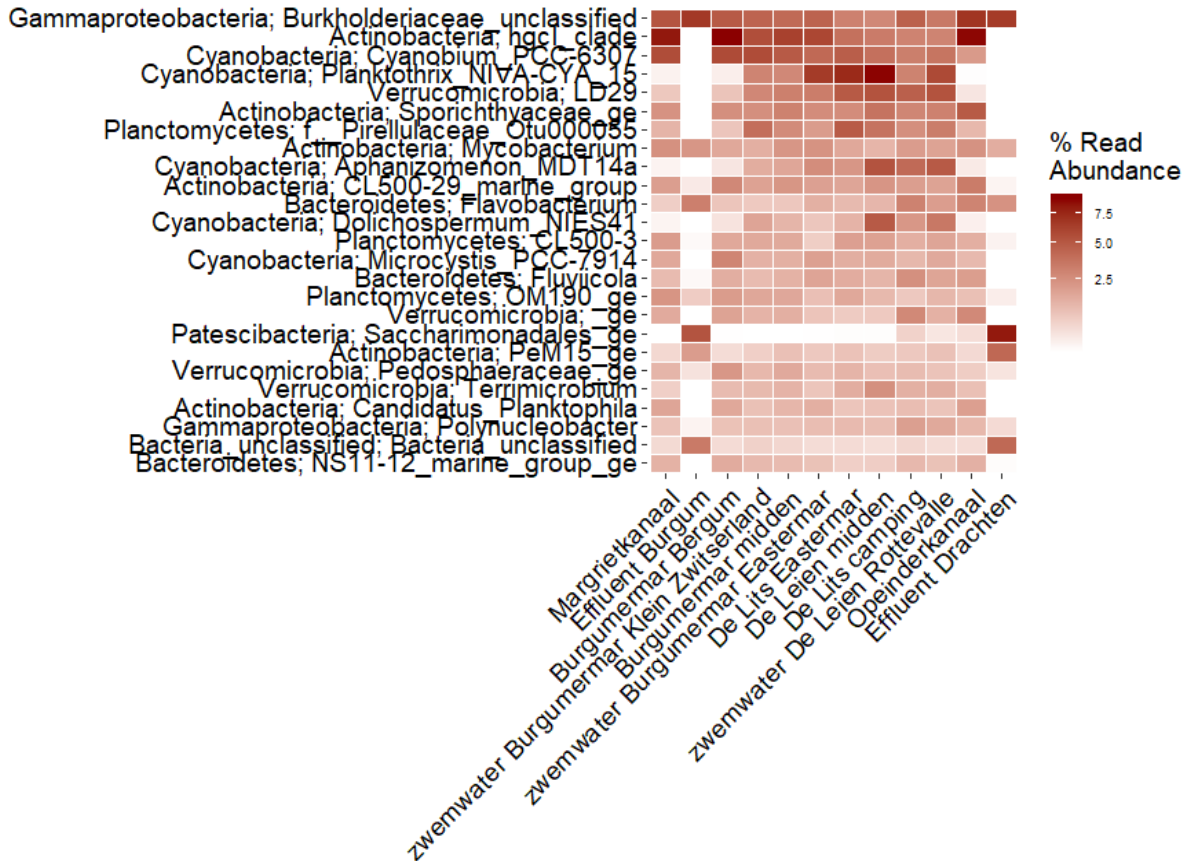
- De microbiële samenstelling van effluent en oppervlaktewater toont meer samenhang met de datum dan met locatie: De oppervlaktewater- en effluentmonsters van 5-6-2018 en 3-7-2018 vertonen veel overeenkomsten met elkaar alsmede de monsters van 20-6-2017, 13-9-2017 en 31-7-18. Opvallend is dat de monsters van 31-7-2018 sterk afwijken van de eerder in 2018 genomen monsters. De oorzaak van deze afwijking is niet bekend.
- De oppervlaktewatermonsters wijken sterk af van de RWZI effluent monsters.



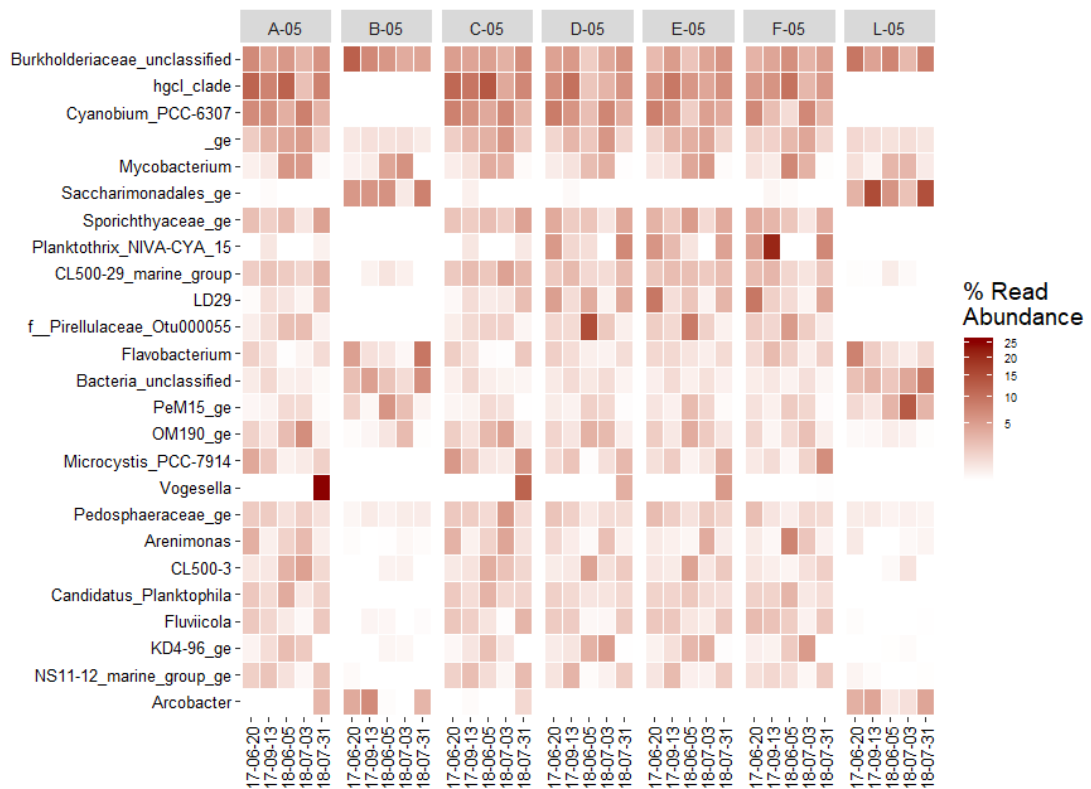
FIGUUR 3-27: PCOA VAN ALLE OTU'S VAN ALLE MONSTERS (VERSCHILLENDE SYMBOLEN) EN DATUMS (VERSCHILLENDE KLEUREN) VAN CASE 5 FRIESLAND (GEBASEERD OP BRAY-CURTIS DISTANCE). DE GETALLEN BIJ DE PUNTEN ZIJN HET PERCENTAGE MICROBIELE POPULATIE VAN EFFLUENT, BEPAALD MET SOURCE TRACKER.

In Figuur 3-28 is de relatieve aanwezigheid van de 25 meest aanwezige bacteriën weergegeven per monster. In FIGUUR 3-29 en Figuur 3-30 is dit gescheiden per monsterdatum. Deze bacteriegroepen zouden verklarend kunnen zijn voor de verschillen die we zien in Figuur 3-27. Te zien is dat de dominante bacteriepopulaties in alle oppervlaktewatermonsters grote gelijkenissen vertonen. Voornamelijk *Burkholderiaceae* komen in alle oppervlaktewatermonsters in hoge mate voor, maar ook in de effluenten van de RWZI's Burgum en Drachten. Bij andere casussen kwam deze groep minder in het RWZI effluent voor. Hier is dus opvallend dat het effluent van de RWZI's Drachten en Burgum af lijkt te wijken van de effluenten van de RWZI's die in de andere cases gemeten zijn. Verder is *Actinobacteria\_hgcl\_clade* dominant in alle wateren behalve het RWZI effluent terwijl *Actinobacteria\_Mycobacterium* en *Actinobacteria\_PeM15\_ge* in alle monsters inclusief RWZI effluent dominant voorkomt. Wat verder opvalt, is dat de meetlocaties Prinses Margrietkanaal en Burgumermar

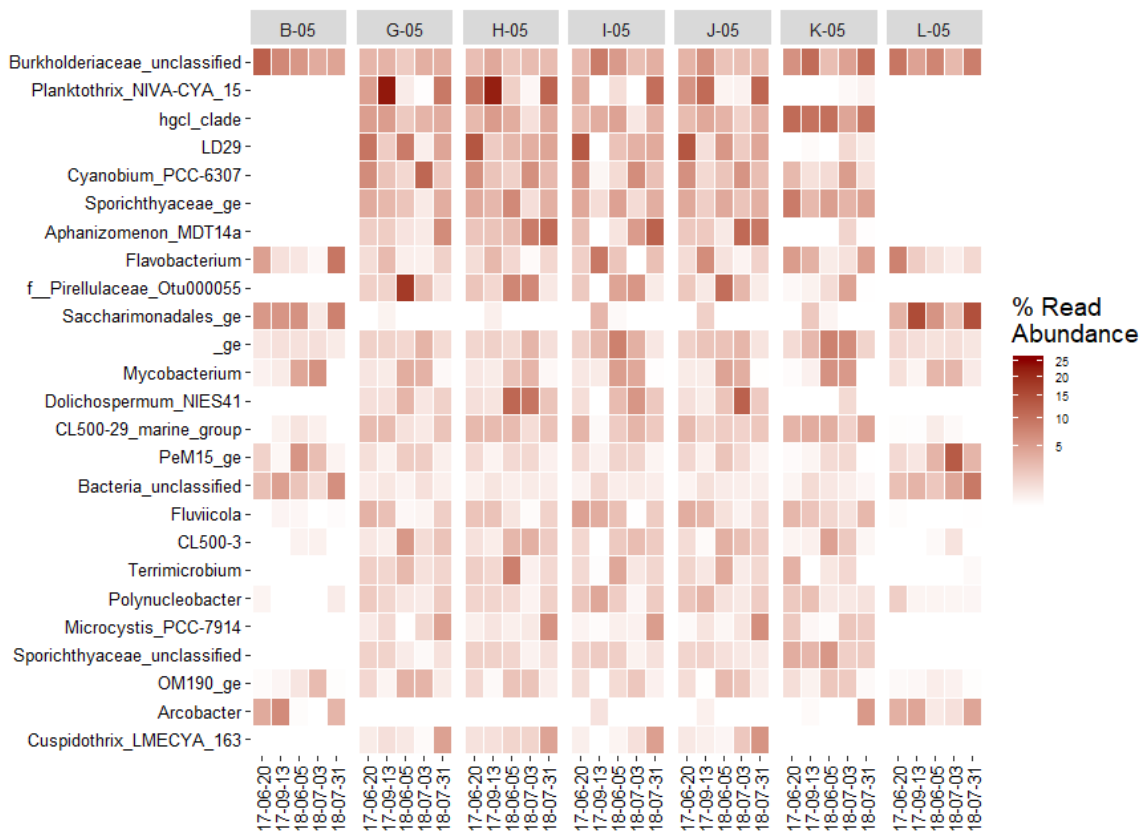
Strekdam Bergum qua samenstelling gedeeltelijk afwijken van de andere oppervlaktewateren. Deze afwijking ligt vooral in de cyanobacterien; de relatieve abundantie van Planktothrix\_NIVA-CYA\_15 en Aphanizomenon\_MDT14a zijn hier bijvoorbeeld lager dan op de andere meetlocaties. Dit betekent dat hier minder blauwalg aanwezig is. Een mogelijke verklaring is dat de meetlocaties Prinses Margrietkanaal en Burgumermar Strekdam Bergum op de hoofdroute van de Friese boezem liggen waardoor bijvoorbeeld blauwalgen minder kans krijgen om zich te ontwikkelen (kortere verblijftijd).



FIGUUR 3-28: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE OTUS IN ALLE MONSTERS VAN CASE 5 FRIESLAND. GETOOND ZIJN DE GEMIDDELDE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA PER MONSTERLOCATIE. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS.



FIGUUR 3-29: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE OTUS IN ALLE MONSTERS VAN CASE 5 FRIESLAND. GETOOND ZIJN DE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS. A-05= MARGRIETKANAAL, B-05= EFFLUENT BURGUM, C-05= BURGUMERMAR BERGUM, D-05= ZWEMWATER DAGRECREATIETERREIN BURGUMER MAR, E-05= BURGUMERMAR MIDDEN, F-05= ZWEMWATER BURGUMERMAR EASTERMAR, L-05= EFFLUENT DRACHTEN.



FIGUUR 3-30: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE OTUS IN ALLE MONSTERS VAN CASE 5 FRIESLAND. GETOOND ZIJN DE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS. B-05= EFFLUENT BURGUM, G-05= DE LITS EASTERMAR, H-05= DE LEIEN MIDDEN, I-05= DE LITS CAMPING, J-05= ZWEMWATER DE LEIEN ROTTEVALLE, K-05= OPEINDERKANAAL, L-05= EFFLUENT DRACHTEN.

In Figuur 3-31 zijn de dominante bacteriën van het rioolwater weergegeven voor de overige monsters. Een bacteriegroep die veel aanwezig is in het effluent van de RWZI's Burgum en Drachten betreft de *Saccharimonadales*. Deze groep komt bij andere cases ook voor in RWZI effluent en kan mogelijk dienen als indicator hiervoor. Deze groep is alleen terug te zien in de oppervlaktewatermonsters De Lits Camping, zwemwater De Leien Rottevalle en Opeinderkanaal. Er is weinig over deze bacteriegroep bekend maar hij komt in hoge mate voor in het RWZI effluent. Opvallend is dat deze bacteriegroep niet aanwezig is op de meetlocatie De Leien Midden terwijl dit hetzelfde oppervlaktewater betreft als het zwemwater De Leien Rottevalle en gevoed wordt vanuit het Opeinderkanaal.

In de oppervlaktewatermonsters De Lits camping, zwemwater De Leien Rottevalle en Opeinderkanaal waar *Saccharimonadales* aanwezig is, worden nog meer bacteriegroepen aangetroffen die dominant zijn in RWZI effluent, zoals *Arcobacter*, *Rickettsiella*, *Saccharimonadaceae*, en *Gammaproteobacteria* C39. Het lijkt dus dat deze locaties meer beïnvloed worden door RWZI effluent. *Arcobacter* is een ander bacteriegroep die veel in andere cases in RWZI influent en effluent gevonden wordt en dus mogelijk ook kan dienen als indicator. Als men specifiek naar de aanwezigheid van deze bacteriegroepen kijkt, lijkt het Margrietkanaal ook mogelijk beïnvloed door RWZI effluent (Figuur 3-31). Indien *Arcobacter* van het Margrietkanaal afkomstig is van het RWZI Burgum, dan betekent dit dat het effluent ook naar het westen stroomt en niet

alleen oostelijk naar het Burgumermar. Het kan ook dat andere RWZI's invloed uitoefenen op deze wateren, zoals het RWZI Leeuwarden (zie rapport Hulsbos et al., Kenmerk R001-1246437MHB-mdg-V02-NL, 'Waterkwaliteit in de Friese Boesem', Bijlage 2). De meeste andere bacteriegroepen die aanwezig zijn in het effluent zijn echter niet aanwezig in het oppervlaktewater. Dat is ook terug te zien in de gehele microbiële populatie die duidelijk verschillend is voor RWZI effluent dan voor oppervlaktewateren (Figuur 3-27).



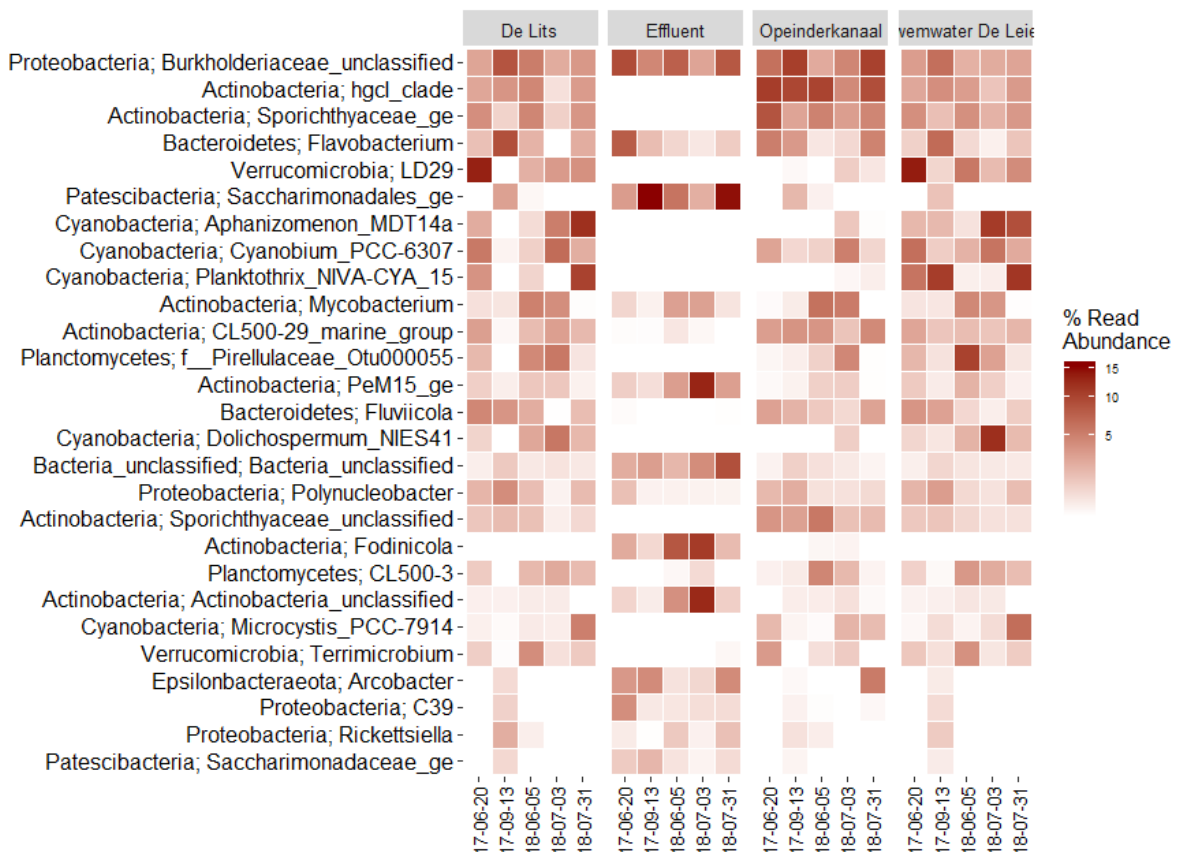
FIGUUR 3-31: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE OTUS IN HET EFFLUENT, WEERGEGEVEN VOOR ALLE ANDERE MONSTERS VAN CASE 5 FRIESLAND. GETOOND ZIJN DE GEMIDDELDE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA PER MONSTERLOCATIE. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS.

### RWZI Drachten: De Lits camping, zwemwater De Leien Rottevalle en Opeinderkanaal

Oppervlaktewatermonsters De Lits camping, zwemwater De Leien Rottevalle en Opeinderkanaal zijn dus mogelijk beïnvloed door effluent bacteriën van RWZI Drachten op 13-09-2017. Dat is ook te zien aan het feit dat de microbiële populaties hiervan dichter bij die van het effluent liggen dan de rest (Figuur 3-27). Daarom kijken we bij deze wateren in detail naar de verschillende monsters in de tijd. In figuren Figuur 3-28 en Figuur 3-31 worden gemiddeldes getoond van alle monsterdata per locatie. Figuur 3-27 laat daarentegen zien dat de meeste variatie binnen en tussen locaties vooral verklaard worden door de monsterdatum. Het is daarom logischer en minder vertekenend om de monsterdata apart te laten zien. Dit is weergegeven in figuren

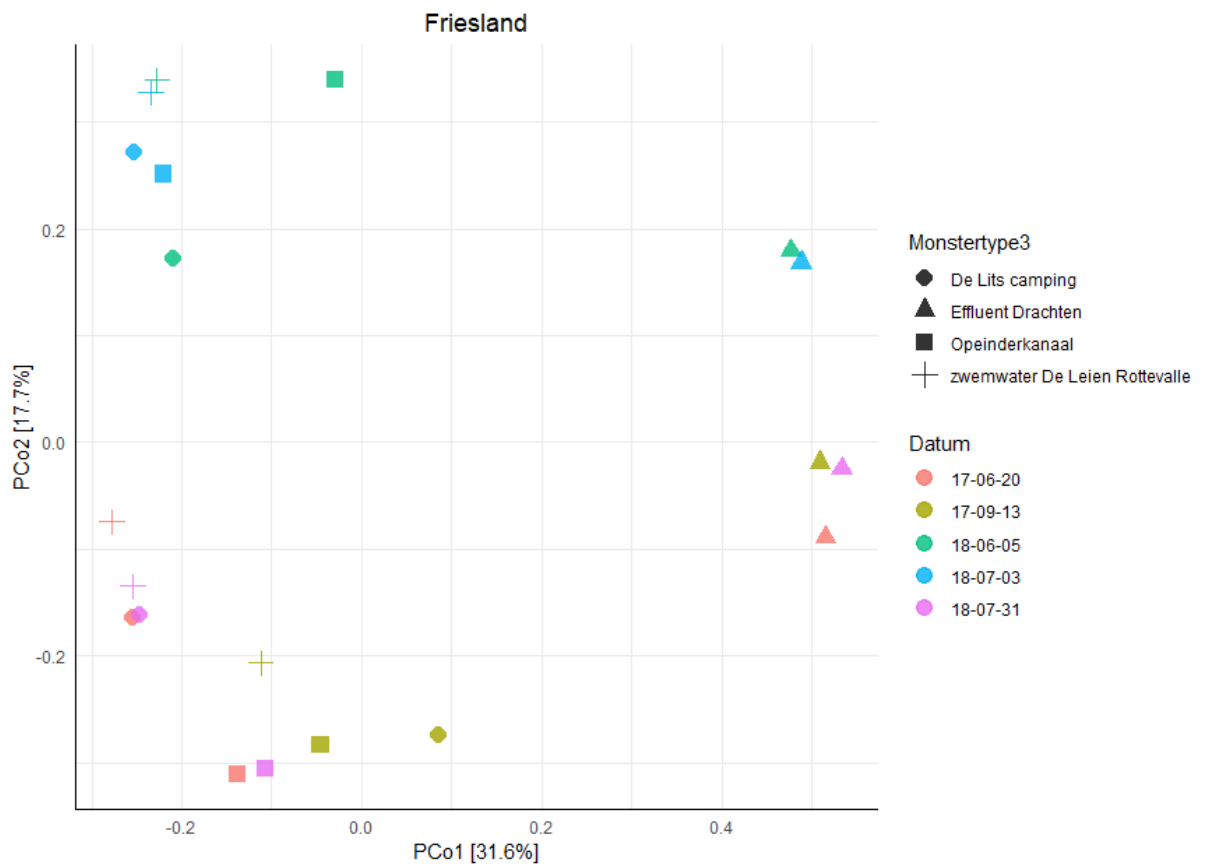
FIGUUR 3-29, Figuur 3-30 en Figuur 3-32. Hier is te zien dat de samenstelling van de bacteriepopulaties op de verschillende monsterdata inderdaad sterk varieert. Het effluent laat bijvoorbeeld sterk variërende hoeveelheden *Flavobacterium* en *Saccharimonadales* zien. De groep *Flavobacterium* komt in andere cases meer voor in oppervlaktewater. Dat is ook hier het geval; in de meeste monsters is het aandeel *Flavobacterium* zeer laag in het effluent vergeleken met andere wateren.

Als we nu kijken naar de mogelijke RWZI indicator bacteriegroep *Saccharimonadales*, komt deze gedurende het jaar in grote hoeveelheden voor in het effluent. Opvallend is daarom dat deze bacteriegroep juist het meest voorkomt in de meetlocaties De Lits, Effluent Drachten, Opeinderkanaal en Zwemwater de Leien Rottevalle op één en dezelfde datum, namelijk 13-09-17 (Figuur 3-32). Dit is tijdens een piek van regenval, waardoor het aandeel van het effluent groter is. Andere mogelijke indicatorbacteriegroepen die dominant zijn in RWZI effluent (*Arcobacter*, *Rickettsiella*, *Saccharimonadaceae*, en *Gammaproteobacteria* C39) komen ook meer voor op diezelfde datum (Figuur 3-32). Dit bevestigt dat deze als indicator dienen en dat RWZI invloed dus grote variatie toont in de tijd. Voor weer andere mogelijke indicatorbacteriegroepen, zoals *Mycobacterium* en *Actinobacteria*\_PeM15 zien we dat deze op andere data (05-06-18 en 03-07-18) dominant zijn in effluent en dat dit terug te zien is in de oppervlaktewateren op diezelfde data. Dit impliceert dat deze bacteriegroepen ook als indicator voor RWZI effluent kunnen dienen, maar op andere tijdstippen. Deze verschillen lijken ook verklarend voor grote scheiding in microbiële populaties van RWZI effluent en oppervlaktewateren tussen de clusters van 05-06-18 en 03-07-18 en die van 20-6-2017, 13-9-2017 en 31-7-2018 (Figuur 3-27 en Figuur 3-33).



FIGUUR 3-32: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE OTUS IN DE LITS, EFFLUENT VAN RWZI DRACHTEN, OPEINDERKANAAL EN ZWEMWATER DE LEIEN ROTTEVALLE VAN CASE 5 FRIESLAND. GETOOND ZIJN DE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS.

In Figuur 3-33 is een PCoA opgenomen van de hierboven weergegeven meetlocaties. Net als in de eerdere PCoA valt op dat zowel de oppervlaktewatermonsters als de effluentmonsters sterk variëren over de meetdagen. Dit was ook duidelijk te halen uit de variatie in diversiteit (Figuur 3-26). De variatie in de effluentsamenstelling is opvallend en was bij andere RWZI's in mindere mate geconstateerd. Ook hier is weer te zien dat de bacteriepopulaties van 5-6-2018 en 3-7-2018 duidelijk anders van samenstelling zijn dan die van 20-6-2017, 13-9-2017 en 31-7-2018. Dit geldt voor het effluent, maar ook voor de oppervlaktewater monsters. Het verschil tussen de monsters van 3-7-2018 en 31-7-2018 is opvallend omdat deze monsters kort na elkaar genomen zijn (Figuur 3-33). Dit laat zien dat de variatie in de tijd dus erg groot is, en dat het daarom extra belangrijk is om op meerdere tijdstippen en vaker te bemonsteren om trends in microbiële profielen te detecteren. Verder kunnen we concluderen dat, in ieder geval voor de wateren die veel karakteristieke RWZI effluent-bacteriën bevatten, de variatie in microbiële samenstelling gedurende het jaar gecorreleerd is aan de variatie van indicator-bacteriegroepen in het effluent gedurende het jaar.



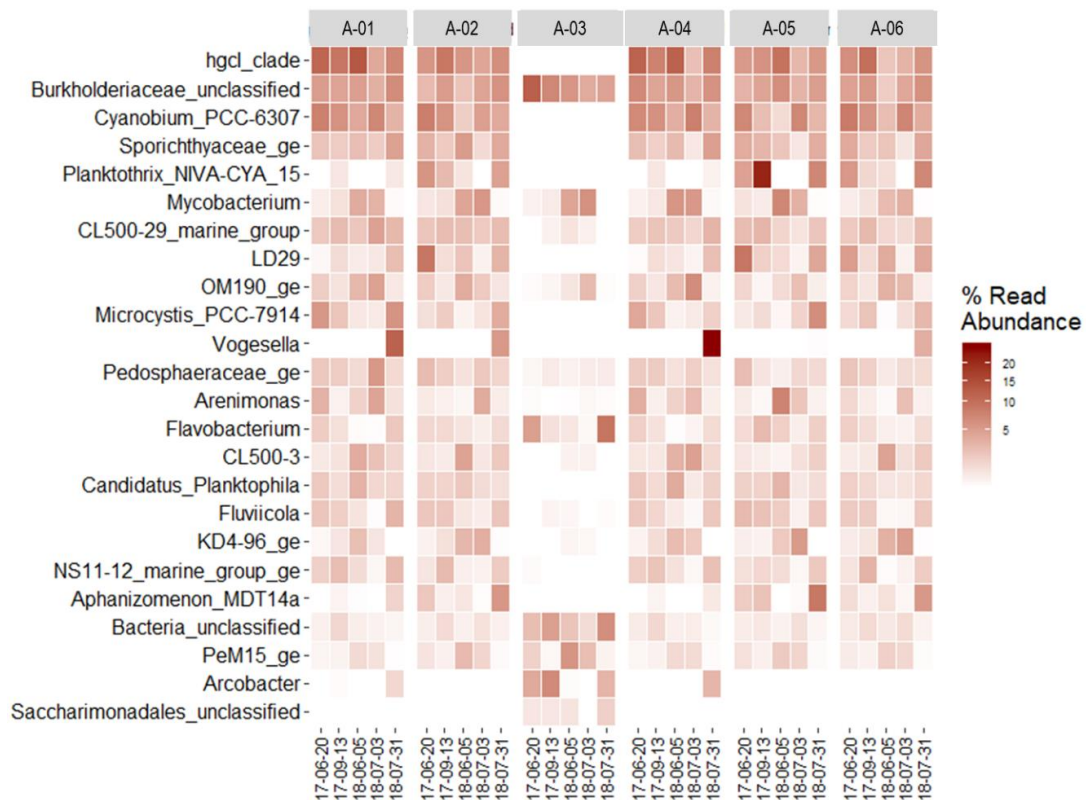
FIGUUR 3-33: PCOA VAN ALLE OTU'S VAN MEETPUNTEN DE LITS CAMPING, EFFLUENT DRACHTEN, OPEINDERKANAAL, ZWEMWATER DE LEIEN ROTTEVALLE (VERSCHILLENDE SYMBOLEN) EN DATUMS (VERSCHILLENDE KLEUREN) VAN CASE 5 FRIESLAND (GEBASEERD OP BRAY-CURTIS DISTANCE).



### RWZI Bergum: Meetlocaties Burgumermar Bergum, Burgumermar midden, Effluent Burgum, Margrietkanaal, Zwemwater Burgumermar Eastermar, Zwemwater Dagrecreatieterrein Burgumer Mar

Van deze meetlocaties is geen sterkte invloed van RWZI effluent aangetoond met bovenstaande analyses. In Figuur 3-34 zijn daarom voor de meetlocaties vanaf het meetpunt Burgumermar Bergum tot aan Zwemwater Dagrecreatieterrein Burgumer Mar de bacterie samenstellingen van de onafhankelijke meetdagen weergegeven.

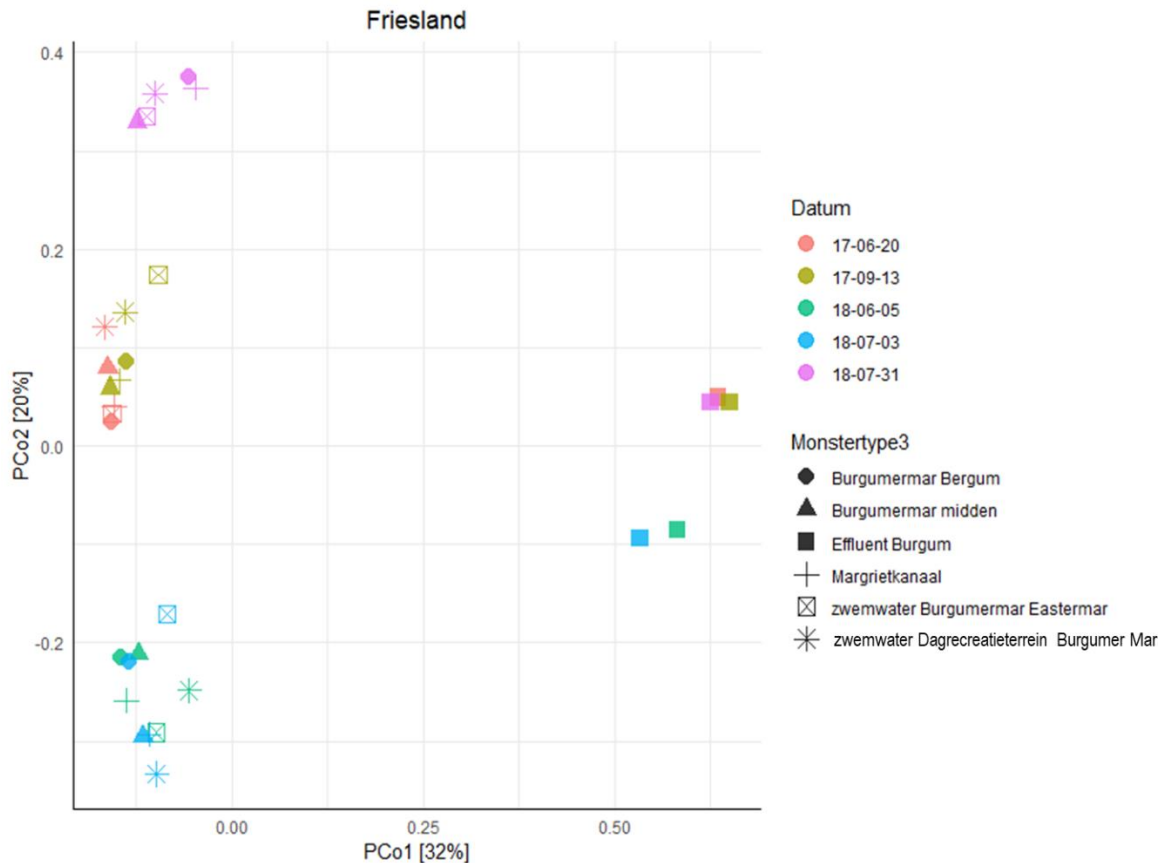
Ook hier is weer de sterke variatie in de tijd te zien in alle monsters, o.a. ook in het effluent van RWZI Burgum. Het effluent laat sterk variatie zien in *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, en *Actinobacteria\_PeM15*. Ondanks dat het in eerste instantie niet duidelijk was, is te zien dat deze verhoogde aanwezigheid in het effluent ook terug te zien zijn in de oppervlaktewatermonsters. Zoals bij RWZI Drachten, komen *Mycobacterium* en *Actinobacteria\_PeM15* bijvoorbeeld meer voor op 05-06-18 en 03-07-18 in het effluent, dat terug te zien is in de ontvangende oppervlaktewateren. Dit gegeven versterkt weer dat deze bacteriegroepen verklarend zijn voor het feit dat de gehele microbiële populatie op 05-06-18 en 03-07-18 in het effluent en oppervlaktewateren zich afscheidt van de monsters van 20-6-2017, 13-9-2017 en 31-7-2018 (Figuur 3-27 en Figuur 3-35).



FIGUUR 3-34: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE OTUS IN A-01: BURGUMERMAR BERGUM, A-02: BURGUMERMAR MIDDEN, A-03: EFFLUENT BURGUM, A-04: MARGRIETKANAAL, A-05: ZWEMWATER BURGUMERMAR EN A-06: ZWEMWATER DAGRECREATIETERREIN BURGUMER MAR VAN CASE 5 FRIESLAND. GETOOND ZIJN DE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS.

Uit Figuur 3-35 komt hetzelfde beeld naar voren als in de PCoA in Figuur 3-27. Zowel de oppervlaktewatermonsters als de effluentmonsters variëren sterk over de meetdagen.

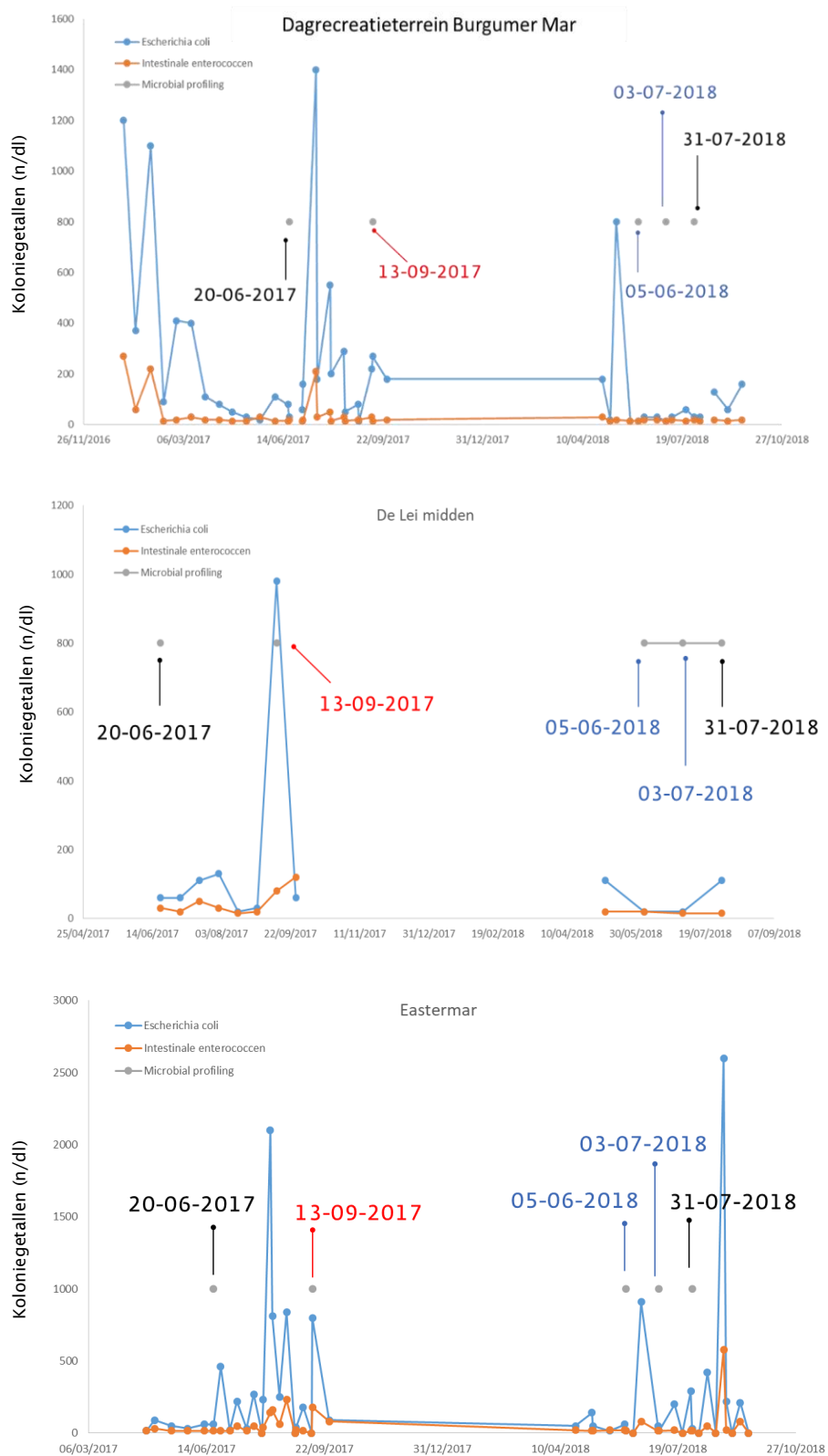
De variatie in de effluentsamenstelling van de RWZI Burgum is wel wat kleiner dan die van de RWZI Drachten. De bacteriepopulaties van 5-6-2018 en 3-7-2018 zijn duidelijk anders van samenstelling dan die van 20-6-2017, 13-9-2017 en 31-7-2018, zoals bij RWZI Drachten. Het verschil tussen de monsters van 3-7-2018 en 31-7-2018 is opvallend omdat deze monsters kort na elkaar genomen zijn.



FIGUUR 3-35: PCOA VAN MEETPUNTEN OP LOCATIES BURGUMERMAR BERGUM, BURGUMERMAR MIDDEN, EFFLUENT BURGUM, MARGRIETKANAAL, ZWEMWATER BURGUMERMAR EASTERMAR, ZWEMWATER DAGRECREATIETERREIN BURGUMER MAR

### Zwemwaterkwaliteit

In 2017 en 2018 zijn op de officiële zwemwaterlocaties in het gebied reguliere metingen uitgevoerd naar de zwemwaterkwaliteit (Figuur 3-36). Tot en met juni zijn de concentraties *E. coli* en Enterococci laag (m.u.v. Burgum, waar ook hoge waarden in de winter zijn). De eerste fingerprint-metingen op 20 juni 2017 valt tegelijk met lage waarden voor *E. coli* en intestinale Enterococci. Vanaf juli zijn er regelmatig hoge waarden gemeten.



FIGUUR 3-36: RESULTATEN VAN REGULIERE METINGEN NAAR DE ZWEMWATERKWALITEIT IN 2017 EN 2018 (E COLI EN ENTEROCOCCEN KOLONIEGETALLEN (N/DL)) OP DE OFFICIËLE ZWEMWATERLOCATIES IN HET GEBIED. DE GRIJZE PUNTEN MET DATA STELLEN NGS MONSTERNAMEN MOMENTEN VOOR.

### Source Tracker

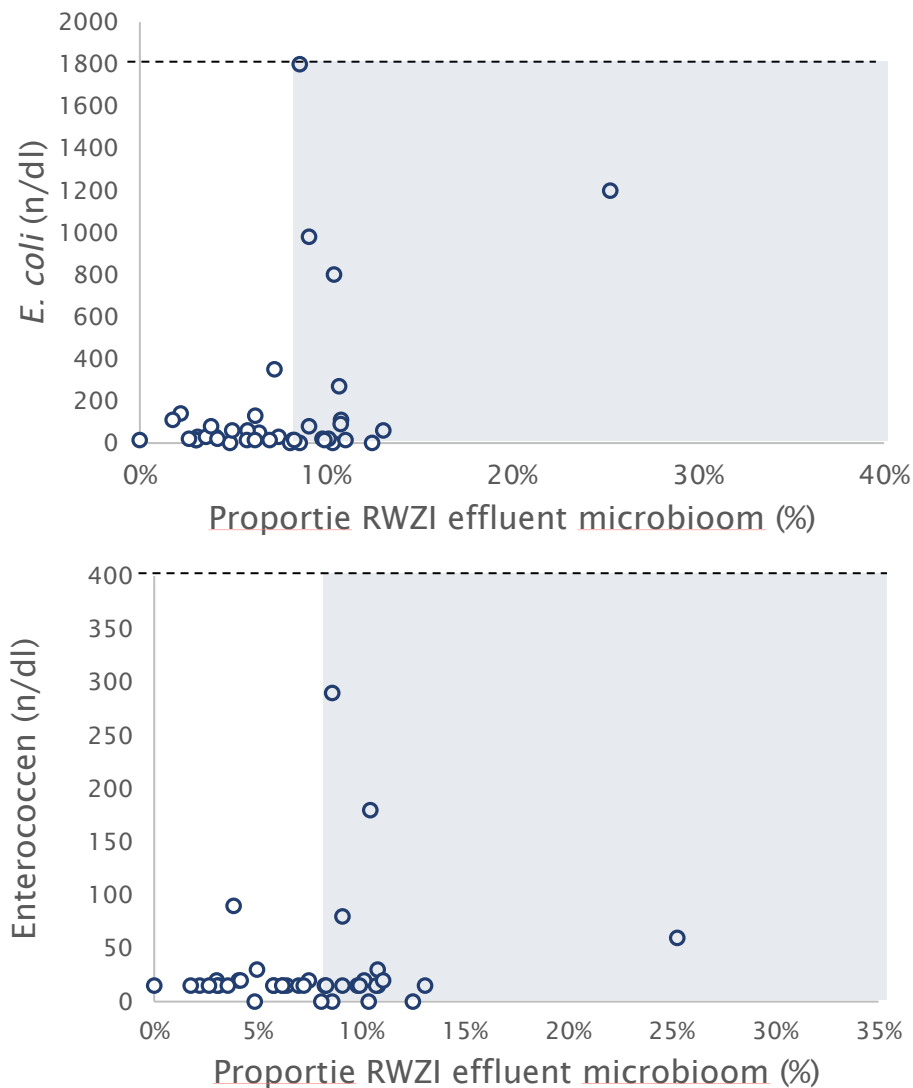
Er is getracht verschillende analyses uit te voeren met "Source Tracker".

- A. Een analyse waarbij de twee RWZI's (Drachten en Burgum) zijn aangemerkt als twee verschillende vervuilingbronnen.
- B. Een analyse waarbij de twee RWZI's (Drachten en Burgum) zijn aangemerkt als één gezamenlijke vervuilingbronnen.

De resultaten van source tracker analyse B zijn in Figuur 3-27 weergegeven. De getallen bij de punten staan voor het percentage microbiële populatie van RWZI effluent. Ook hier is weer duidelijk uit te halen dat De Lits Camping, De Leien Rottevalle en Opeinderkanaal de meeste RWZI bacteriën bevatten, vooral op 13-09-2017. Dit bevestigt voorgenoemde resultaten.

Source tracker analyse A heeft onwaarschijnlijke resultaten opgeleverd en hebben we daarom niet getoond in dit rapport. De microbiële populaties van de twee RWZI's kunnen duidelijk niet onderscheiden worden van elkaar door Source Tracker. Het was inderdaad duidelijk te zien dat deze RWZI's veel op elkaar lijken; de monsterdata lijken beter te clusteren dan de RWZI locaties (Figuur 3-27) en dit is ook terug te zien in de top 25 meest abundante genera (Figuur 3-31).

Om te weten te komen bij welke hoeveelheid karakteristieke RWZI effluent-bacteriën men gaat spreken van een lagere waterkwaliteit, hebben we getracht het aandeel RWZI effluent-bacteriën uit source tracker te combineren met *E. coli* en Enterococci koloniegetallen van de verschillende oppervlaktewateren. Koloniegetallen zijn gemeten gedurende 2017 en 2018 in het Margrietkanaal, zwemwater Dagrecreatieterrein Burgumer Mar, Burgumermar Midden, Eastermar, De Lits Eastermar, De Leien Midden en Opeinderkanaal. In Figuur 3-36 is voor alle officiële zwemwaterlocaties aangegeven waar monsters voor NGS geanalyseerd zijn. Op 20-06-2017 was de hoeveelheid RWZI effluent-bacteriën overal gelijk en relatief laag. Op 13-09-2017 was dit een stuk hoger, dat correspondeert met hogere koloniegetallen (Figuur 3-36). Alle koloniegetallen van alle bovengenoemde gemeten wateren zijn uitgezet tegen alle hoeveelheden RWZI effluent-bacteriën afkomstig van source tracker data van deze case (Figuur 3-37). Er is geen lineair verband te ontdekken, maar duidelijk is wel dat boven een bepaald aandeel RWZI effluent-bacteriën (>5-8%), de koloniegetallen omhoog gaan en soms de signaalwaarde overschrijden. Deze signaalwaarde is voor *E. coli* op 1800 n/dl en Enterococci op 400 n/dl. Er is eerder uit de literatuur gebleken dat het voorkomen van *Arcobacter* (aanwezig in het RWZI effluent) in oppervlaktewater samengaat met hoge hoeveelheden fecale besmetting (Lee et al.,2012).



FIGUUR 3-37: ALLE MONSTERLOCATIES IN CASE 5 WAAR DE PROPORTIES RWZI EFFLUENT (%) VAN SOURCE TRACKER DATA UITGEZET IS TEGEN E COLI (LINKS) EN ENTEROCOCCEN KOLONIEGETALLEN (N/DL) (RECHTS). ZWEMWATER Overschrijding is voor E COLI BIJ 1800 N/DL EN ENTEROCOCCEN BIJ 400 ND/L.

### 3.5.3 Conclusies

De data laten zien dat karakteristieke micro-organismen voor RWZI effluent ook in de oppervlaktewateren voorkomen. De Lits camping, zwemwater De Leien Rottevalle en Opeinderkanaal lijken meer van deze micro-organismen te bevatten dan de andere meetlocaties. Ook zijn er grote verschillen tussen tijdstippen. De bacteriepopulaties van 5-6-2018 en 3-7-2018 zijn duidelijk anders van samenstelling dan die van 20-6-2017, 13-9-2017 en 31-7-2018 voor alle oppervlaktewatermonsters en effluent monsters, ongeacht locatie. Deze correlatie tussen RWZI effluent en oppervlaktewater impliceert dat het RWZI effluent de variatie in het oppervlaktewater veroorzaakt. Voor beide RWZI's zien we dat bijvoorbeeld *Mycobacterium* en *Actinobacteria\_PeM15* meer voorkomen op 05-06-18 en 03-07-18 in het effluent, en deze zijn terug te zien in de oppervlaktewateren. Daarnaast vertoont het effluent van de RWZI's meer *Arcobacter* op 13-09-17, dat ook weer terug te zien is in de oppervlaktewateren De Lits camping,

zwemwater De Leien Rottevalle en Opeinderkanaal. De RWZI's hebben een soortgelijke fingerprint, waarbij fluctuaties afhankelijk zijn van de monsterdatum. Dit maakt het moeilijk om de invloed van de verschillende RWZI's te onderscheiden. De reden waarom de microbiële populatie sterk afhankelijk is van de monsterdatum kan veroorzaakt worden door seizoen verschillen zoals stochastische factoren (dispersie en drift), maar ook deterministische factoren (temperatuur en de concentratie en type koolstofbronnen) (Wu et al., 2019). De stromingssnelheid van afvalwater schijnt ook een belangrijke parameter te zijn die variatie in de microbiële gemeenschap van RWZIs veroorzaakt (Guo et al., 2019). Dispersie, drift en de stromingssnelheid van afvalwater worden bepaald door regenval. Op 29-07-2018 heeft het voor het eerst sinds lange tijd (minimaal een maand) substantieel geregend, rond 11 mm nabij Burgum. De afwijking kan dus ook komen door weersinvloed of als gevolg uit- en afspoeling van landelijk gebied. Voornamelijk *Burkholderiaceae* komen in alle oppervlaktewatermonsters van alle cases in hoge mate voor, maar ook in de effluenten van de RWZI's Burgum en Drachten. Bij andere casussen kwam deze groep minder voor in het RWZI effluent. Dit kan betekenen dat het effluent op een locatie gemonsterd is waar het al sterker verdund is met oppervlaktewater.

Over overstorten is niets bekend en daarom is de invloed hiervan op het oppervlaktewater niet te traceren. De kans op overstort is uiteraard veel groter bij hevige regenval, wat het geval was in augustus 2018. Zwemwater de Leien Rottevalle mondt uit bij de Leien en daar treedt overstort wel eens op.

### 3.6 HH Hollands Noorderkwartier: Invloed RWZI op oppervlaktewater

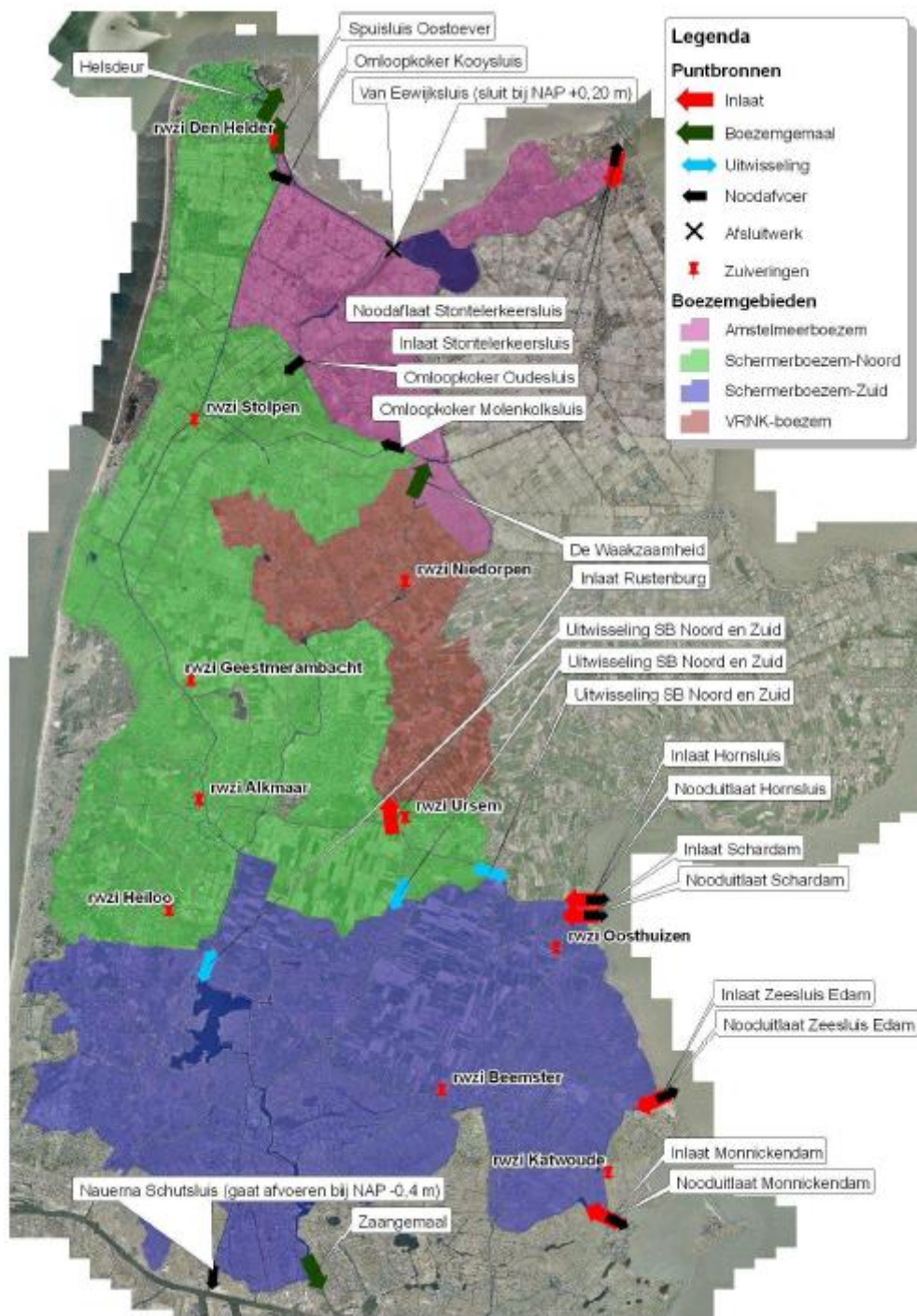
#### 3.6.1 Casebeschrijving

Het Noord Hollands Kanaal maakt onderdeel uit van de Schermerboezem. De Schermerboezem is een KRW waterlichaam, waarvoor doelstellingen zijn geformuleerd voor de waterkwaliteit en de ecologie. Belangrijke vraag is het effect van lozingen en het herleiden van bronnen van vervuilende stoffen op het kanaal. Eén van de bronnen is de RWZI Geestmerambacht. Het effluent van deze RWZI wordt geloosd op het Noord Hollands Kanaal, wordt afgevoerd richting Den Helder en komt uiteindelijk met ander afgevoerd water in de Waddenzee terecht. De kwaliteit van het Noord Hollands Kanaal zou in de zomermaanden grotendeels bepaald worden door de aanwezige RWZI's zoals die van Alkmaar en Geestmerambacht.

In Figuur 3-38 zijn de gebieden aangegeven die in verbinding staan met het Noord Hollands Kanaal, de Schermerboezem-Noord. Op dit deel van de Schermerboezem, waarvan het water naar Den Helder wordt afgevoerd en via het gemaal de Helsdeur naar de Waddenzee gaat, lozen zes RWZI's. Van zuid naar noord zijn dat Heiloo/Castricum, Ursem, Alkmaar, Geestmerambacht, de Stolpen en Den Helder. Het waterschap wil inzichtelijk krijgen in hoeverre maatregelen op de RWZI's kunnen bijdragen aan verbetering van de waterkwaliteit en ecologie in het NH Kanaal. Mogelijk helpt DNA fingerprinting hierbij.

**Hoofdvraag:** Is het mogelijk om m.b.v. DNA onderzoek te bepalen in hoeverre door de seizoenen heen de invloed van effluent zichtbaar aanwezig is in het Noord Hollands Kanaal? Kan aangegeven worden hoe groot deze invloed is t.o.v. andere bronnen?





FIGUUR 3-38: LIGGING GEBIEDEN DIE IN VERBINDING STAAN (AFWATEREN) NAAR DE BOEZEM EN DE RWZI'S. (BRON: J.M. HERMANS 2014. PVA INVULLING ACHTERGRONDCONCENTRATIE BLANCO KRW DEELSTROOMGEBIEDEN. MEMO NR. 14.0008488. HHNK, HEERHUGOWAARD. 33 P)

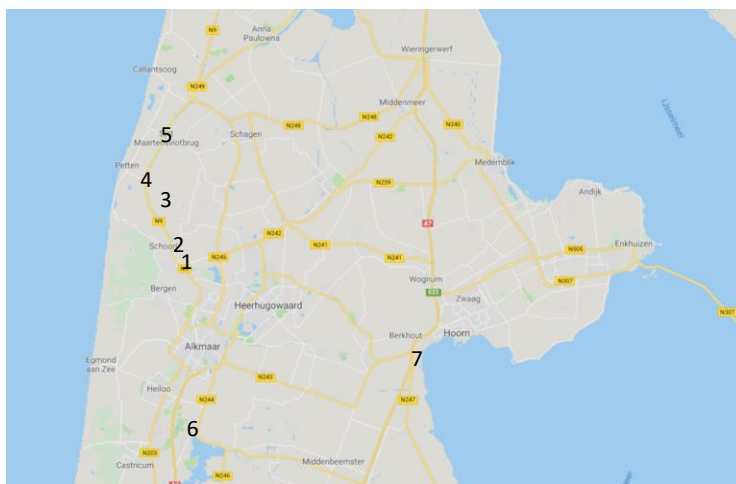


Om de hoofdvraag te beantwoorden is op de volgende punten bemonsterd:

	Codering	x-coordin.	y-coordin.	omschrijving
1	Nieuw meetpunt	p.m.	p.m.	Uitlaat effluentsloot RWZI Geestmerambacht
2	135201	109.660	524.700	N-H Kanaal, brug Schoorldam
3	135203	108.781	527.443	Hempolder onder Schoorl, inlaat Ringpolder, boezemzijde
4	135301	107.392	529.862	N-H kanaal, Burgervlotbrug
5	135302	109.149	533.459	N-H Kanaal, St. Maartensvlotbrug
6	134604	111.576	509.424	N-H Kanaal, Akersloot, pontveer
7	002002	129.544	512.754	Beemsteruitwatering, houten brug ca. 500 m westelijk van inlaat

TABEL 3-1: MEETPUNTEN BEHORENDE BIJ DE CASE VAN HH HOLLANDS NOORDERKWARTIER.

Aan de hand van de uitgebreide beschrijving van de meetpunten (zie: <http://www.hnk-water.nl/mpa/>) is een overzichtskaart opgesteld (Figuur 3-39).



- 1: Uitlaat effluentsloot rwzi Geestmerambacht
- 2: 135201: N-H kanaal, brug Schoorldam
- 3: 135203: Hempolder onder Schoorl, inlaat ringpolder Boezemzijde
- 4: 135301: N-H kanaal, Burgervlotwe
- 5: 135302: N-H kanaal, st. Maartensvlotbrug
- 6: 134604, N-H kanaal, Akersloot, pontveer
- 7: 002002, Beemsteruitwatering

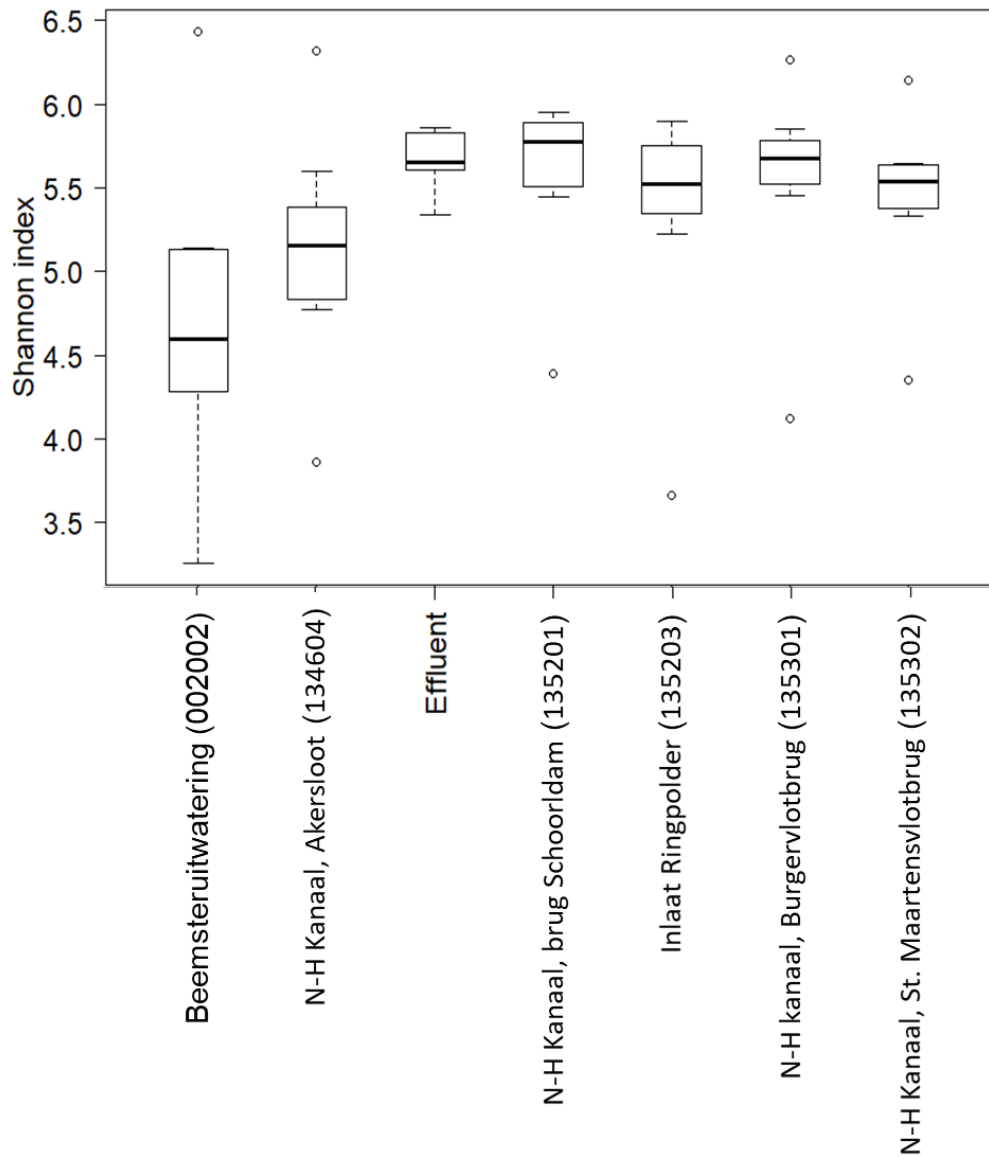
FIGUUR 3-39: OVERZICHTSKAART VAN ALLE MEETPUNTEN BEHORENDE BIJ DE CASE VAN HH HOLLANDS NOORDERKWARTIER

Vanaf de effluentsloot bij de RWZI Geestmerambacht zijn vier meetpunten stroomafwaarts naar het noorden richting Den Helder gekozen. Hiervan ligt meetpunt met codering 135203 niet in het Noordhollands Kanaal, maar in een zijvaart. Het doel hierbij was om te kijken of het effluent ook het gebied ingaat. Het meetpunt 134604 ten zuiden van de RWZI Geestmerambacht is meegenomen als referentie bovenstrooms. Als schoon meetpunt is het meetpunt 002002, het inlaatpunt vanuit het Markermeer, meegenomen.

### 3.6.2 Resultaten

In Figuur 3-40 is de diversiteit (Shannon index) van de verschillende monsters weergegeven. Opvallend is dat de monsters Beemsteruitwatering en N-H Kanaal Akersloot een grotere variatie in diversiteit vertonen dan de overige monsters. Deze monsters betreffen de referentiemonsters zonder invloed van effluent van de RWZI's Alkmaar en Geestmerambacht. In de case Hunze en Aa's was ook de variatie van

diversiteit verminderd na invloed van effluent. Daarnaast is de Beemsteruitwatering het inlaat- en soms uitslagpunt van water uit het Markermeer dat het gebied van HHNK in gaat of uit gaat. De samenstelling van het water op het meetpunt kan dus sterk wisselen, afhankelijk van het moment van monsternamen en de stroming. Dat verklaart mogelijk meer de fluctuaties dan de afwezigheid van effluent.

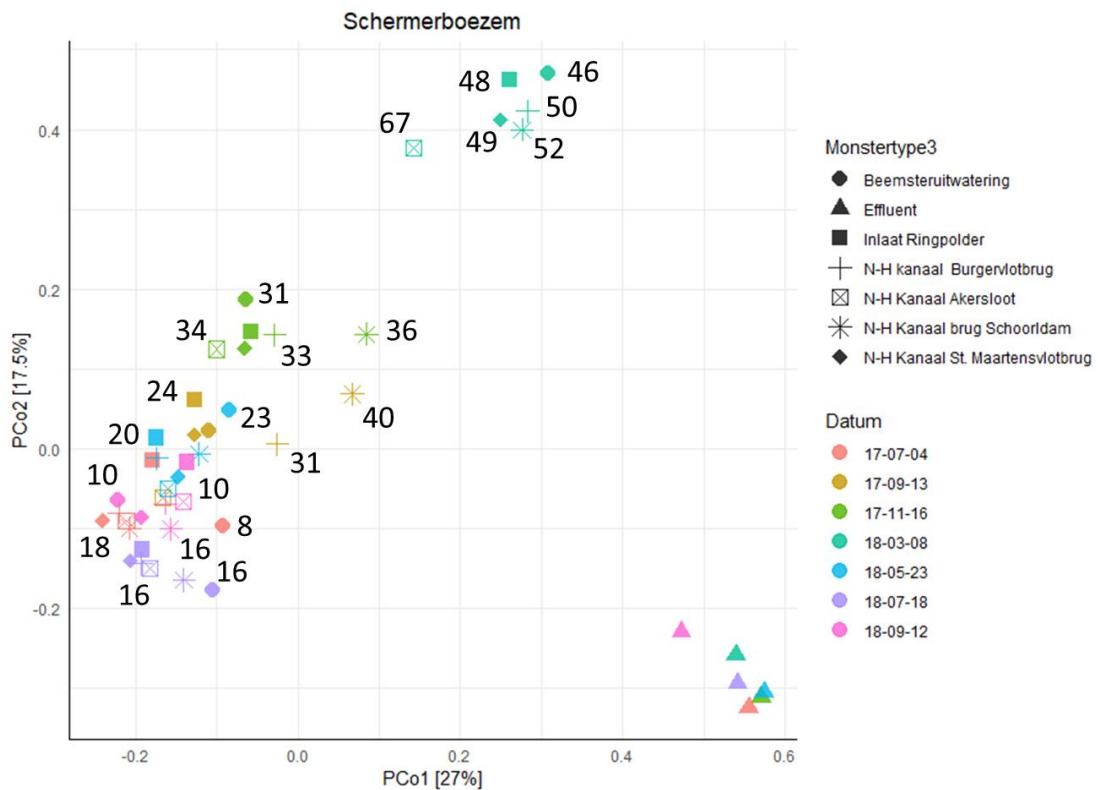


FIGUUR 3-40: DE DIVERSITEIT (SHANNON INDEX) VAN DE VERSCHILLENDE MONSTERS VAN CASE 6 HOLLANDS NOORDERKWARTIER

Om te beoordelen in welke mate de verschillende bacteriepopulaties op elkaar lijken is in Figuur 3-41 een PCoA opgesteld. In de PCoA zijn per bemonsteringspunt de afzonderlijke populaties weergegeven waardoor de spreiding in de populaties inzichtelijk wordt. Op basis van de PCoA kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- Het effluent van de RWZI Geestmerambacht wijkt duidelijk af van de oppervlaktewatermonsters

- De bacteriepopulatie in het RWZI effluent is stabiel vergeleken met de oppervlaktewater monsters
- De bacteriepopulaties in de oppervlaktewater monsters variëren voornamelijk in de tijd en niet over de verschillende meetlocaties, zoals bij de meeste cases het geval is. De monsters van 8-3-18 wijken het meest af van de rest en vormen een apart cluster, ongeacht locatie.
- De monsters van het RWZI effluent vertonen geen patroon aan de hand van de zomer -of wintermaanden.



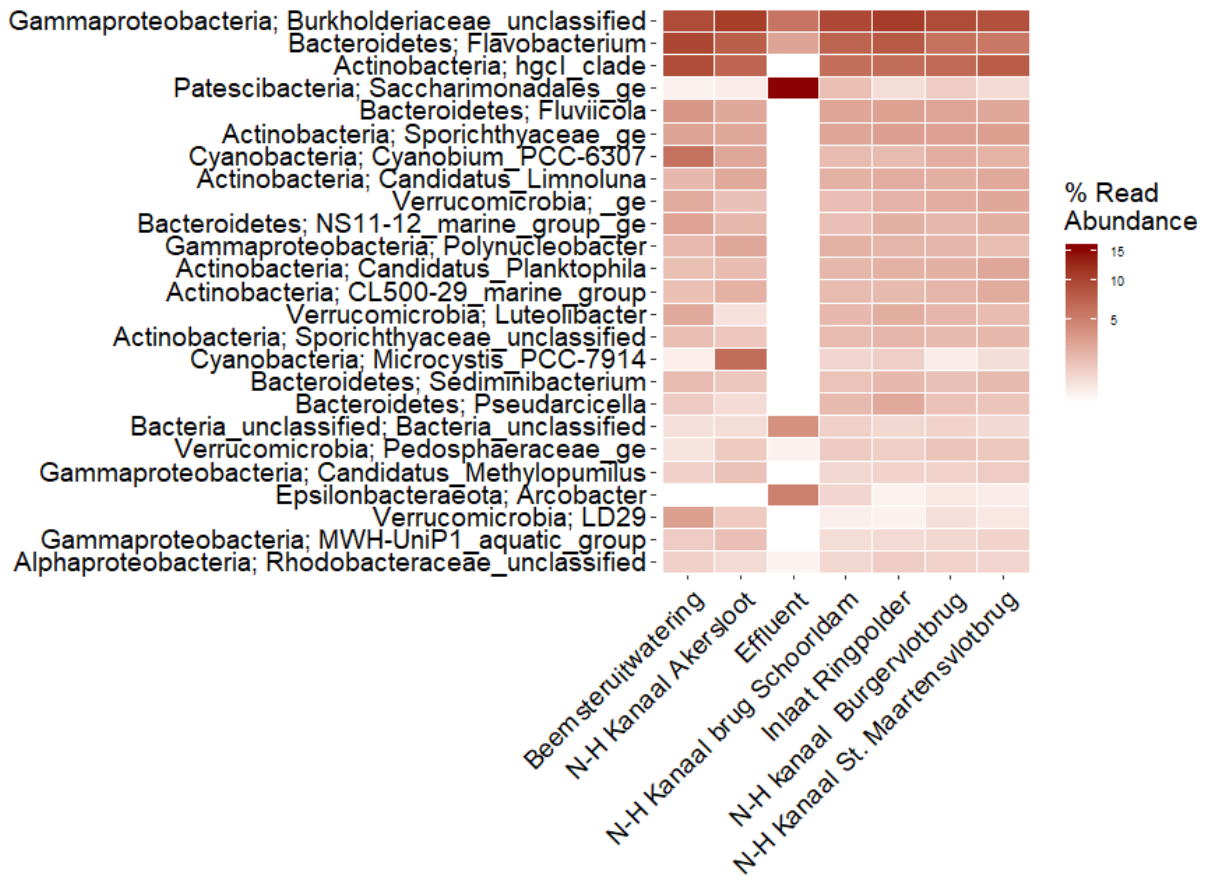
FIGUUR 3-41: PCOA VAN ALLE OTU'S VAN ALLE MONSTERS (VERSCHILLENDE SYMBOLEN) EN DATUMS (VERSCHILLENDE KLEUREN) VAN CASE 6 SCHERMERBOEZEM (GEBASEERD OP BRAY-CURTIS DISTANCE). DE GETALLEN BIJ DE PUNTEN ZIJN HET PERCENTAGE MICROBIELE POPULATIE VAN EFFLUENT, BEPAALD MET SOURCE TRACKER.

In FIGUUR 3-42 is de relatieve aanwezigheid van de 25 meest voorkomende bacteriegroepen per monster weergegeven. Dit is ook weergegeven waarbij de monsters gescheiden zijn per monsterdatum (Figuur 3-43). Deze bacteriegroepen zouden verklarend kunnen zijn voor de verschillen die we zien in Figuur 3-41. De twee linker kolommen betreffen referentiemonsters (zonder RWZI effluent). De vier rechter kolommen liggen stroomafwaarts (noordelijk) van de lozingspunten van de RWZI's in het N-H kanaal.

Enkele zaken die opvallen:

- De oppervlaktewater monsters vertonen soortgelijke dominante bacteriegroepen
- De invloed van de lozingspunten van de RWZI's Alkmaar en Geestmerambacht lijkt beperkt zichtbaar te zijn in de dominante bacteriegenera.
- De relatieve hoeveelheid *Saccharimonadales* en *Arcobacter* nemen toe na de lozingspunten van de RWZI's Alkmaar en Geestmerambacht. *Saccharimonadales*

en *Arcobacter* zijn typische RWZI bacteriegroepen en komen daarom veel voor in het effluent.



FIGUUR 3-42: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE MICROBIËLE GROEPEN IN ALLE MONSTERS VAN CASE 6 SCHERMERBOEZEM. GETOOND ZIJN DE GEMIDDELDE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA PER MONSTERLOCATIE. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS. DE TWEE LINKER KOLOMMEN BETREFFEN REFERENTIEMONSTERS (ZONDER RWZI EFFLUENT). DE VIER RECHTER KOLOMMEN LIGGEN STROOMAFWAARTS (NOORDELIJK) VAN DE LOZINGSPUNTEN VAN DE RWZI'S IN HET N-H KANAAL.



FIGUUR 3-43: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE MICROBIËLE GROEPEN IN ALLE MONSTERS VAN CASE 6 SCHERMERBOEZEM. GETOOND ZIJN DE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS. A-06= BEEMSTERUITWATERING, B-06= N-H KANAAL AKERSLOOT, C-06= EFFLUENT, D-06= N-H KANAAL BRUG SCHOORLDAM, E-06= INLAAT RINGPOLDER, F-06= N-H KANAAL BURGERSLOOT, G-06= N-H KANAAL ST. MAARTENSLOOT.

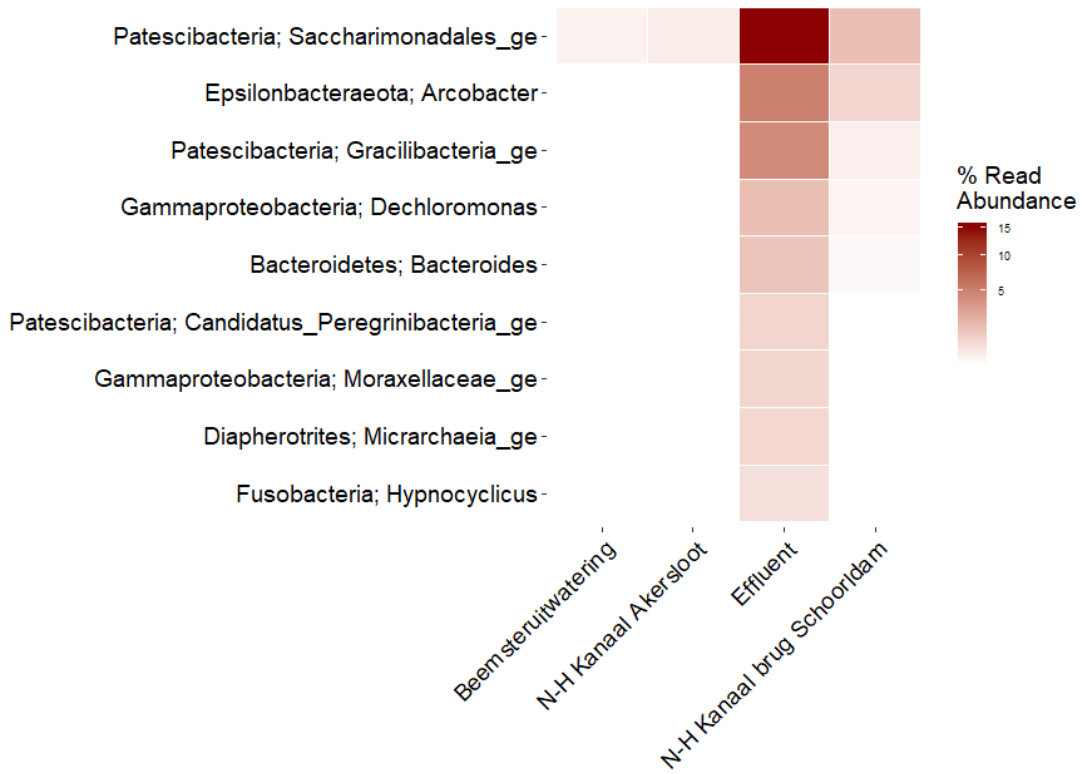
In FIGUUR 3-44 zijn de top 25 dominante bacteriën van het effluent weergegeven voor alle monsters. Dit is ook weergegeven waarbij de monsters gescheiden zijn per monsterdatum (FIGUUR 3-45). Het effluent van de RWZI Geestmerambacht heeft effect op het N-H kanaal. Bacteriegroepen die in hoge mate aanwezig zijn in het effluent (*Saccharimonadales*, *Bacteria\_unclassified*, *Arcobacter*, *Gracilibacteria*, *Absoconditabacteriales*, *Actinobacteria\_peM15*, *Malikia*, *Saccharimonadaceae*, *Dechloromonas*, etc) zijn na het lozingspunt van de RWZI aanwezig in het oppervlaktewater. Deze aanwezigheid neemt stroomafwaarts geleidelijk af. Ondanks dat *Saccharimonadales* een mogelijke indicator-bacteriegroep voor RWZI effluent is, komt deze ook in lage aantallen voor in water dat geen directe invloed heeft van effluent, zoals de referentie monsters Beemsteruitwatering en N-H Kanaal Akersloot. Mogelijk wordt dit veroorzaakt door effluentlozingen van andere RWZIs die uiteindelijk in het Markermeer/N-H kanaal terecht komen. Andere bacteriegroepen die veel in RWZI effluent voorkomen zijn in deze monsters echter niet aanwezig (Figuur 3-46). De meeste invloed van RWZI effluent-bacteriën lijkt op de data 13-09-17 en 16-11-2017 en deze invloed zien we stroomafwaarts maar dus ook in de referentiemonsters (Figuur 3-43). Vooral 13-09-2017 was ook een piekdag bij de andere cases en heeft hoogstwaarschijnlijk te maken met de piek in regenval die maand. Daardoor zal er extra transport van effluent naar de kanalen plaatsvinden.



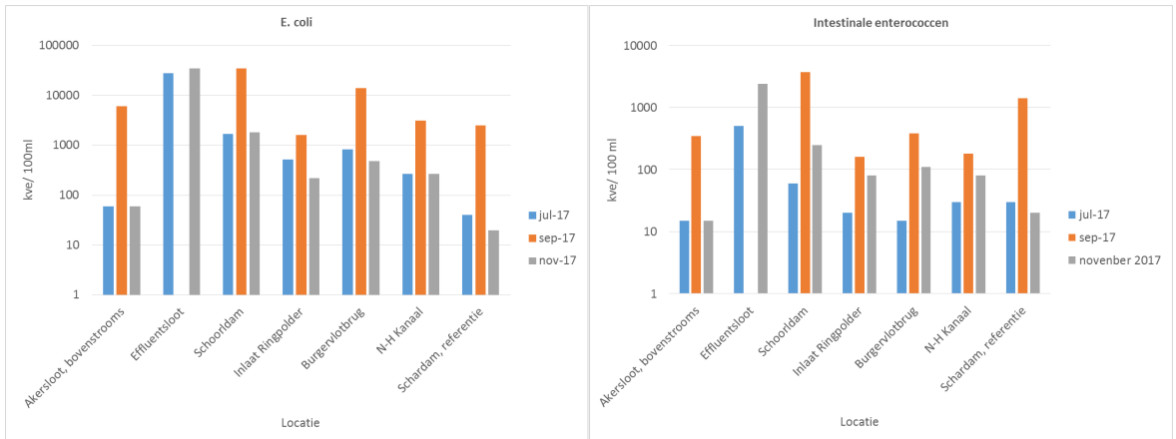
FIGUUR 3-44: RELatieve ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE MICROBIËLE GROEPEN IN HET EFFLUENT, WEERGEVEN VOOR ALLE MONSTERS VAN CASE 6 SCHERMERBOEZEM. GETOOND ZIJN DE GEMIDDELDE RELatieve ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA PER MONSTERLOCATIE. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS.



FIGUUR 3-45: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE MICROBIËLE GROEPEN IN HET EFFLUENT, WEERGEVEN VOOR ALLE MONSTERS VAN CASE 6 SCHERMERBOEZEM. A-06: BEEMSTERUITWATERING, B-06: N-H KANAAL AKERSLOOT, C-06: EFFLUENT, D-06: N-H KANAAL BRUG SCHOORLDAM, E-06: INLAAT RINGPOLDER, F-06: N-H KANAAL BURGERSLOTBRUG, G-06: N-H KANAAL ST MAARTENSLOTBRUG. GETOOND ZIJN DE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS.



FIGUUR 3-46: RELatieve ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE MICROBIËLE GROEPEN IN 4 LOCATIES EN 9 SPECIEKE BACTERIEGROEPEN (GENERA) VAN CASE 6 SCHERMERBOEZEM. GETOOND ZIJN DE GEMIDDELDE RELatieve ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA PER MONSTERLOCATIE. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS.



FIGUUR 3-47: METINGEN VAN *E. coli* EN INTESTINALE ENTEROCOCCEN IN DE VERSCHILLENDE MONSTERS (LOGARITMISCHE SCHAAL)

Figuur 3-47 laat zien dat er gemiddeld meer *E. coli* en intestinale Enterococci in het water aanwezig zijn in september dan in juli en november 2017. De metingen van juli en november laten zien dat concentraties *E. coli* en intestinale Enterococci in de effluentsloot het hoogst zijn, maar in noordelijke richting snel afnemen, nabij Schoorldam zijn de concentraties al circa een factor 10 lager. De gemeten waarden zijn in september hoog en komen veelal boven vastgestelde signaalwaarden van 1800



kve/100 ml voor *E. coli* en 400 kve/100 ml voor intestinale Enterococcen. Deze verhoogde waarden zijn goed toe te schrijven aan afspoeling en overstorten aangezien de monstername uitgevoerd is tijdens neerslagpieken. Tijdens de september meting zijn concentraties gemeten die vergelijkbaar zijn met die van de effluentsloot bij drogere condities. Opvallend zijn de eveneens verhoogde concentraties nabij het referentiepunt Schardam in september.

### Source Tracker

Om een indruk te krijgen van het bestanddeel bacteriën uit het RWZI Geesterambacht in het oppervlaktewater van de verschillende locaties zijn er source tracker analyses uitgevoerd. Het microbioom van RWZI Geesterambacht is bij deze analyses gebruikt als "source" en het oppervlaktewater van de verschillende locaties als "sink". De resultaten zijn in Figuur 3-41 weergegeven als getallen bij de monsterpunten. De getallen staan voor het percentage RWZI bacteriën in de oppervlaktewater monsters. In deze resultaten is weer te zien dat het aandeel RWZI bacteriën erg verschilt per datum. Wat niet eerder opviel, is dat alle monsters op 08-03-2018 het meeste RWZI effluent-bacteriën bevat, waarvan Akersloot de uitschieter is. Het was al te zien in Figuur 3-41 dat deze datum zich duidelijk scheidt van alle andere monsters, maar het wordt pas duidelijk met source tracker analyse dat dit kwam door de overeenkomsten met RWZI effluent bacteriën. Schoorldam heeft in het algemeen het hoogste percentage RWZI bacteriën (Figuur 3-41). Schoorldam heeft gemiddeld ook de meeste indicator soorten voor RWZI invloed (Figuur 3-46), en ook de hoogste *E. coli* en Enterococcen koloniegetallen (Figuur 3-47), dus dat komt overeen. Ook Burgervlotbrug toont in het algemeen veel indicator soorten (FIGUUR 3-44) en hoge koloniegetallen in 2017 (Figuur 3-47). Source tracker geeft algemeen een hoog aandeel RWZI effluent-bacteriën op 13-09-2017, 16-11-2017 en 08-03-2018 (Figuur 3-41), dat overeenkomt met de gelijkenis van de microbiële profielen met RWZI effluent en veel RWZI indicatorgenera op die data (FIGUUR 3-45).

### 3.6.3 Conclusies

- De grootste verschillen in microbiële gemeenschappen van het oppervlaktewater liggen in het tijdstip van bemonstering, en niet in locatie (Figuur 3-41). Er lijkt geen verband tussen zomer -of wintermaanden en de mate van invloed van RWZI effluent.
- De microbiële gemeenschap van het RWZI effluent wijkt sterk af van die van het oppervlaktewater en is maar weinig gevoelig voor seizoen veranderingen
- Er is een aantoonbaar effect van RWZI effluent op de microbiële gemeenschap van het N-H kanaal (FIGUUR 3-44 en FIGUUR 3-45).
- Er zijn indicator-bacteriegroepen voor RWZI effluent die goed te detecteren zijn in oppervlaktewater monsters (Figuur 3-46).
- Het eerste meetpunt na lozing, NH kanaalbrug Schoorldam, bevat de meeste indicator-bacteriegroepen voor RWZI effluent en deze groepen nemen in het algemeen geleidelijk stroomafwaarts af, maar op sommige data is dit effect groter dan op andere data (Figuur 3-41).
- De concentraties van *E. coli* en intestinale Enterococcen komen goed overeen met het voorkomen van indicator-bacteriegroepen voor RWZI effluent en de geschatte mate van RWZI invloed door source tracker. Er is wel meer data nodig om te valideren of DNA fingerprinting gebruikt kan worden om aan de hand van de mate van invloed van RWZI effluent te bepalen wat de waterkwaliteit is.

### 3.7 HH van Rijnland: Effect van S-Select® in AWZI

#### 3.7.1 Casebeschrijving

In het innovatieve EssDe® concept wat Rijnland op Velsen gaat toepassen wordt gebruik gemaakt van hydrocyclonen in het spuislib om Anammox bacteriën selectief vast te houden in de zuivering. Het gebruik van hydrocyclonen resulteert in een verbetering en stabilisatie van de Slib Volume Index (SVI). Toepassing van hydrocyclonen zonder EssDe® resulteert naar verwachting eveneens in een verbetering en stabilisatie van de SVI en eveneens in verhoging van het aantal bacteriën voor biologische P-verwijdering ('meer korrelachtig slib i.p.v. meer vlokkig slib'). Deze toevallige ontdekking is door Sweco S-Select® genoemd.

Het S-Select® concept kan voor de AWZI Nieuwe Wetering (Figuur 3-48) een interessante techniek zijn omdat er door de toepassing van S-Select® mogelijk geen extra nabezinktank bijgebouwd hoeft te worden indien het afvalwater van AWZI Leimuiden in de toekomst op AWZI Nieuwe Wetering gezuiverd gaat worden. DNA fingerprinting biedt mogelijk meer inzicht in de werking van S-Select®, door de vaststelling en mogelijke kwantificering/ verandering van draadvormende bacteriën (*Microthrix Parvicella*) en bio-P bacteriën (*Acinetobacter*).

Ter vergelijking worden ook monsters verzameld van het actief slib en influent van de AWZI Nieuwveen (Figuur 3-49) Deze AWZI is qua configuratie gelijk aan Nieuwe Wetering maar is niet uitgerust met een S-Select systeem. AWZI Nieuwveen en Nieuwe Wetering ontvangen afvalwater van een vergelijkbare samenstelling.



FIGUUR 3-48: OVERZICHTSFOTO VAN AWZI NIEUWE WETERING



FIGUUR 3-49: OVERZICHTSFOTO VAN AWZI NIEUWVEEN

**Hoofdvraag:** Verbetert en stabiliseert door toepassing van de cycloon de slibvolume index (SVI) en neemt het aantal bacteriën voor biologische P-verwijdering toe (minder draadvormende bacteriën (*Microthrix parvicella*) en meer bio-P bacteriën (*Acinetobacter*)?)

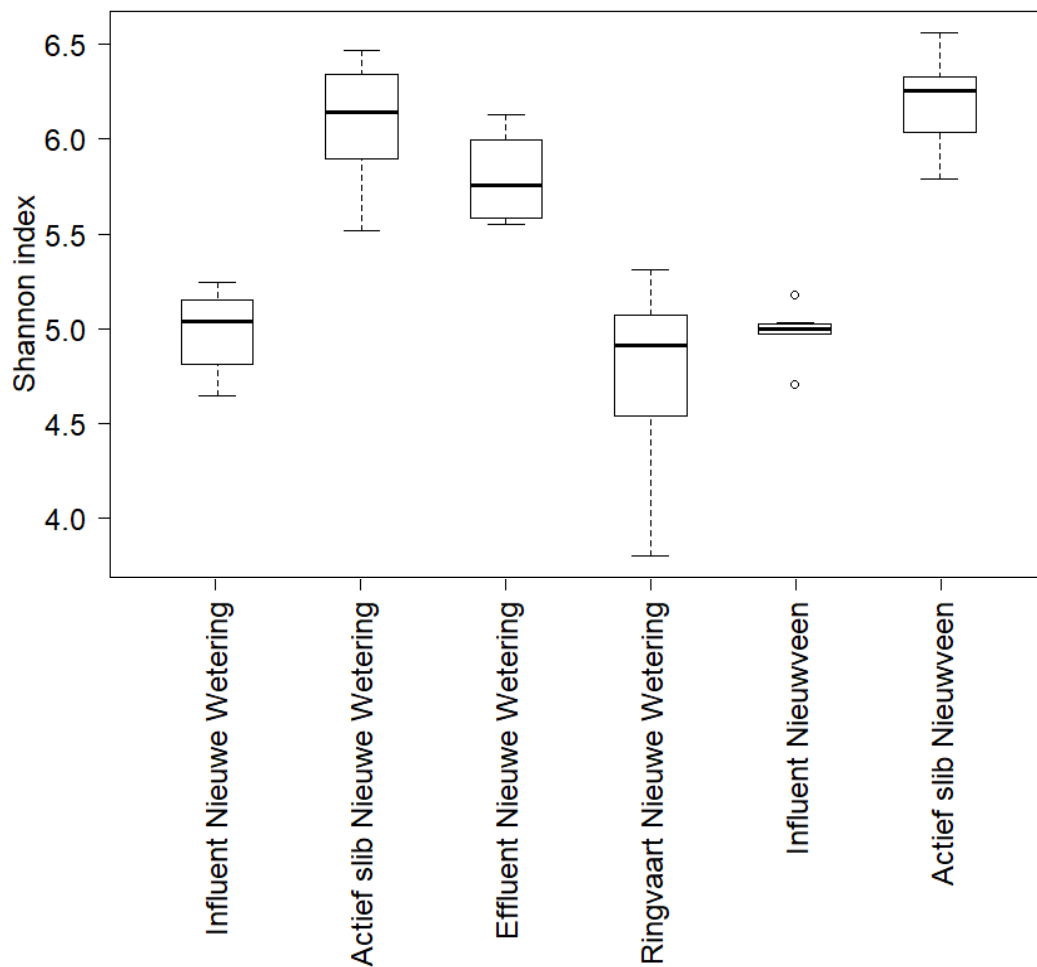
Om de hoofdvraag te beantwoorden is op de volgende punten bemonsterd:

1. Influent Nieuwe Wetering
2. Actief slib Nieuwe Wetering
3. Effluent Nieuwe Wetering
4. Ringvaart Nieuwe Wetering
5. Influent Nieuwveen
6. Actief slib Nieuwveen

Het monsterschema is opgenomen in bijlage 1.

### 3.7.2 Resultaten

In Figuur 3-50 is de diversiteit (Shannon index) van de verschillende monsters weergegeven. Opvallend is de lage variatie in diversiteit van het influent van de RWZI Nieuwveen t.o.v. het influent van de RWZI Nieuwe Wetering. Op de een of andere manier zorgt het influent van de RWZI Nieuwe Wetering voor hogere variatie in microbiële diversiteit. De oorzaak hiervan is niet bekend, maar kan komen door grotere fluctuaties van samenstelling. De diversiteit in slib is hoog omdat daar de meeste bacteriën voorkomen die het water zuiveren. Het effluent van de zuivering is ook hoger in diversiteit dan het influent, mogelijk door uitspoeling van de bacteriële populatie van het slib.

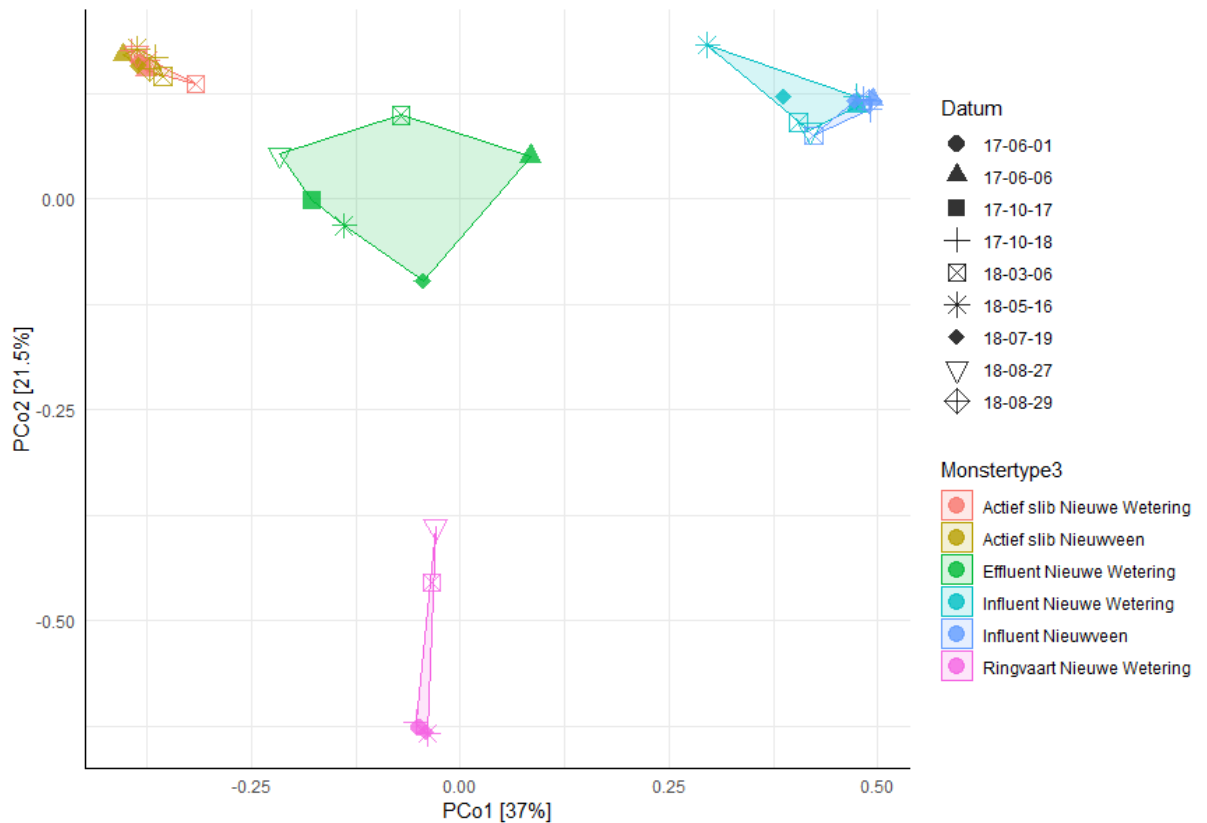


FIGUUR 3-50: DIVERSITEIT (SHANNON INDEX) VAN DE VERSCHILLENDE MONSTERS

Om te beoordelen in welke mate de verschillende bacteriepopulaties op elkaar lijken is in Figuur 3-51 is een PCoA opgesteld. In de PCoA zijn per bemonsteringspunt de afzonderlijke microbiële profielen/fingerprints weergegeven waardoor de dissimilariteit tussen de monsters inzichtelijk wordt. Op basis van de PCoA kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

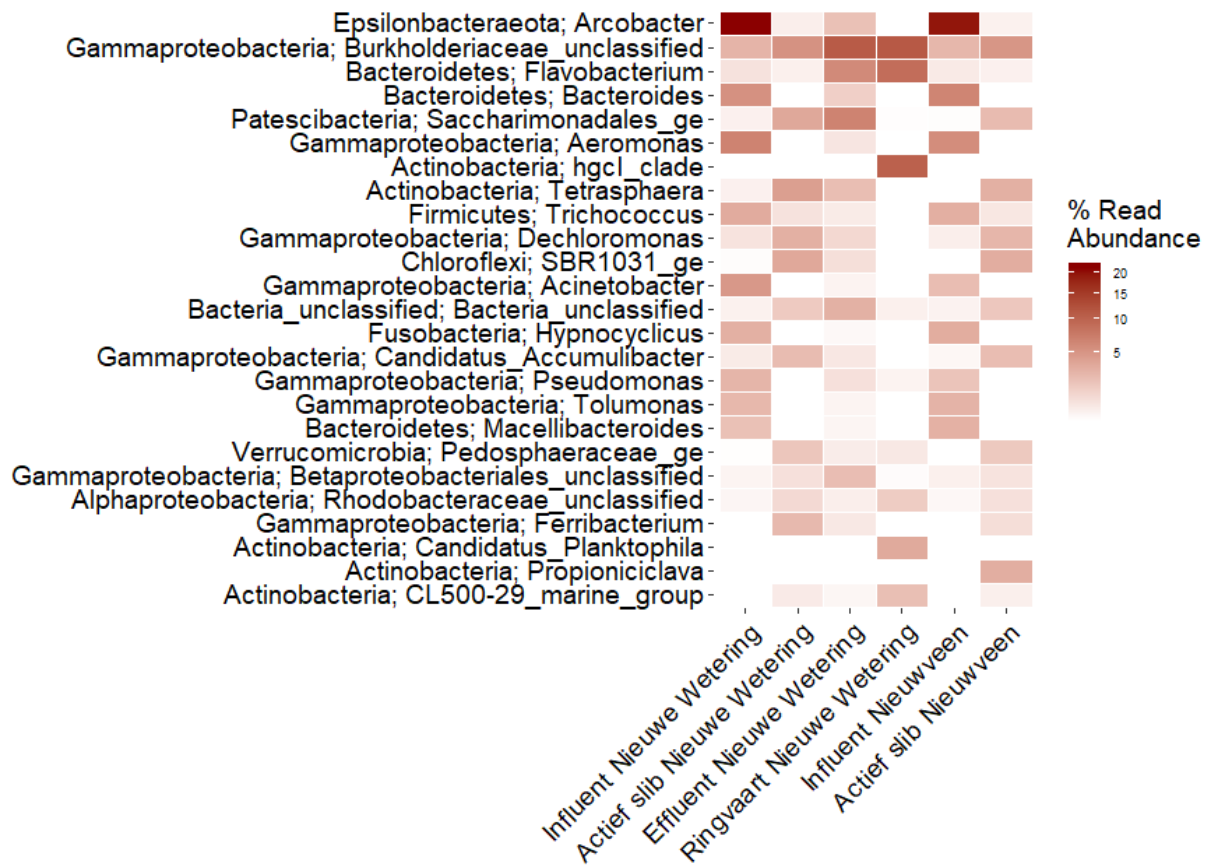
- De bacteriepopulaties in het actief slib van beide RWZI's lijken veel op elkaar t.o.v. de andere monsters en vertonen weinig variatie over de meetdagen

- De influenten van beide RWZI's clusteren samen en vertonen weinig variatie over de meetdagen. Een uitzondering hierop is het monster dat op 16-5-2018 genomen is van het influent van Nieuwe Wetering
- De Ringvaart heeft een heel ander profiel dan het effluent van de RWZI. Op 6-3-2018 en 27-8-2018 lijkt de Ringvaart meer onder invloed gestaan te hebben van het effluent dan op de andere meetdagen.

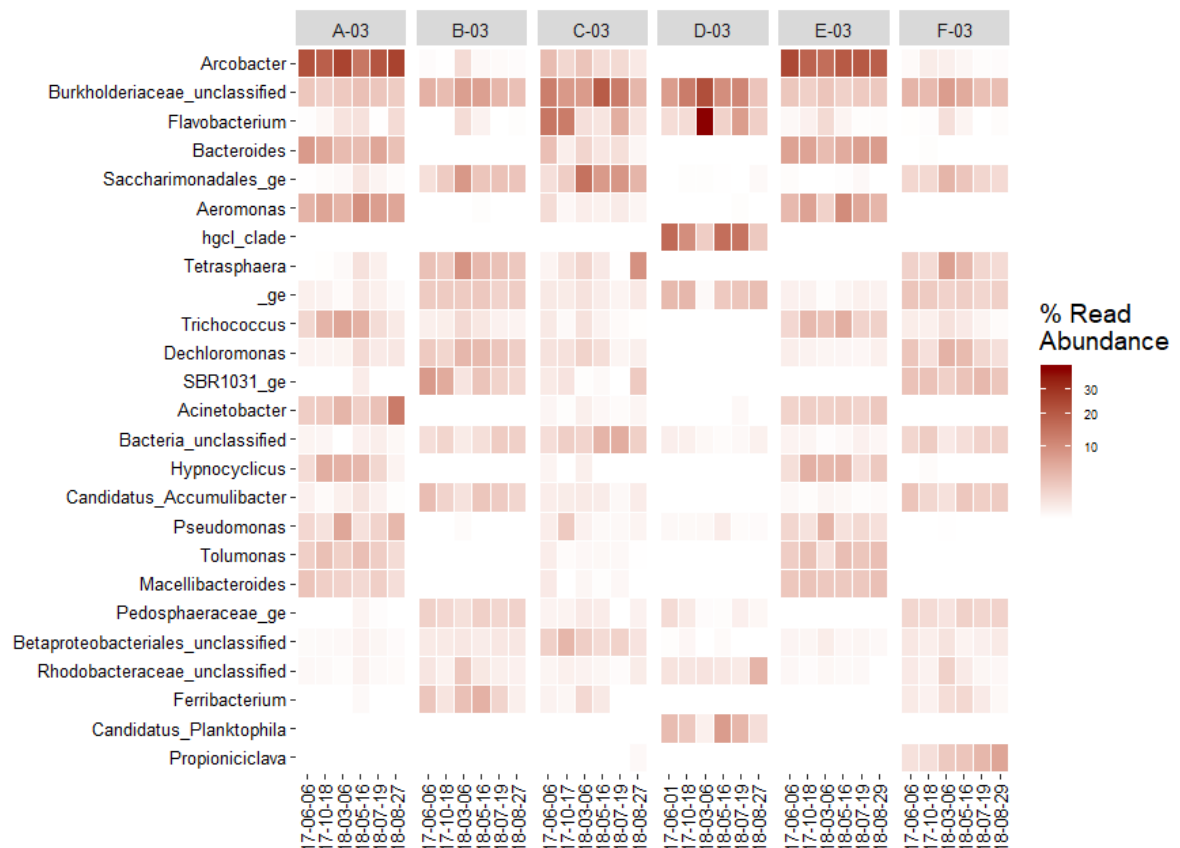


FIGUUR 3-51: PCOA PLOT VAN ALLE MONSTERS VAN NIEUWE WETERING EN NIEUWEVEEN

In Figuur 3-52 is de relatieve aanwezigheid van de 25 meest voorkomende bacteriegroepen per monster weergegeven. Diezelfde data is weergegeven per monsterdatum in Figuur 3-53. Deze bacteriegroepen zouden verklarend kunnen zijn voor de verschillen die we zien in Figuur 3-51. Te zien is dat er duidelijk dominante genera voor influent bestaan, zoals *Arcobacter*, *Bacteroides*, *Aeromonas*, *Trichococcus*, *Acinetobacter*, *Hypnocyclicus*, *Pseudomonas*, *Tolomonas*, en *Macellibacteroides*. Ook actief slib heeft een fingerprint in dominante genera zoals *Burkholderiaceae*, *Saccharimonadales*, *Tetrasphaera*, *Dechloromonas*, *Chloroflexi*, *Accumulibacter*, *Pedospaeraceae*, en *Ferribacterium*. De Ringvaart en het effluent van de RWZI vertonen enkele sterke overeenkomsten in abundante bacteriegroepen, zoals *Burkholderiaceae*, en *Flavobacterium*, waaruit af te leiden is dat het effluent van de RWZI de bacteriepopulatie in het oppervlaktewater beïnvloed.



FIGUUR 3-52: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE OTU'S IN ALLE MONSTERS VAN CASE 3 NIEUWE WETERING. GETOOND ZIJN DE GEMIDDELDE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA PER LOCATIE. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS.



FIGUUR 3-53: RELATIEVE ABUNDANTIE VAN DE 25 MEEST DOMINANTE OTU'S IN IN ALLE MONSTERS VAN CASE 3 NIEUWE WETERING. GETOOND ZIJN DE RELATIEVE ABUNDANTIES VAN ALLE MONSTERDATA. OTU'S ZIJN GEGROEPEERD PER GENUS. A-03= INFLUENT NIEUWE WETERING, B-03= ACTIEF SLIB NIEUWE WETERING, C-03= EFFLUENT NIEUWE WETERING, D-03= RINGVAART NIEUWE WETERING, E-03= INFLUENT NIEUWVEEN, F-03= ACTIEF SLIB NIEUWVEEN.

### Focus op fosfaatbinders en draadvormers

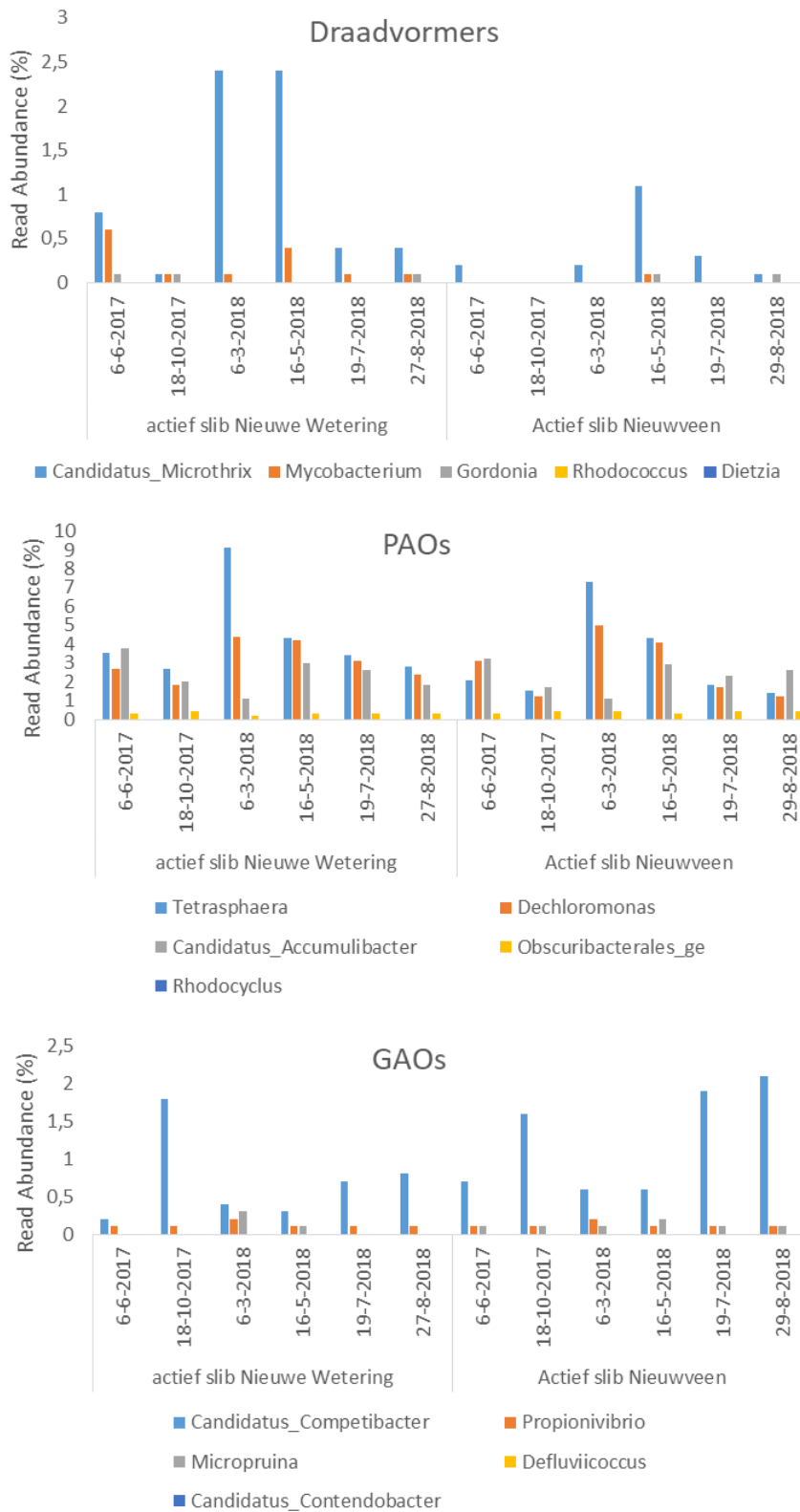
Op de RWZI Nieuwe Wetering wordt een pilot uitgevoerd met het S-select proces waarbij actief slib door een hydrocycloon geleid wordt en er in theorie een selectie plaats zou moeten vinden van specifieke bacteriën. De hypothese is dat het aandeel draadvormende bacteriën (*Microthrix parvicella*) hierdoor gereduceerd wordt en het aandeel bio-P bacteriën (PAO's) juist toeneemt. Om deze hypothese te staven zijn in Figuur 3-54 de populaties van verschillende PAOs (*Tetrasphaera*, *Rhodocyclus*, *Accumulibacter*, *Dechloromonas*, *Obscuribacterales*), GAOs (*Competibacter*, *Propionivibrio*, *Micropruina*, *Candidatus Contendobacter*, *Defluviococcus*) en draadvormers (*Candidatus Microthrix*, *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Dietzia*) weergegeven in de verschillende stromen. Ter referentie zijn ook metingen uitgevoerd op de RWZI Nieuwveen, die qua configuratie overeen komt met de RWZI Nieuwe Wetering, zonder S-select proces. Zoals verondersteld, blijkt uit de DNA fingerprinting data dat het influent en het slib van beide RWZI's op elkaar lijken (Figuur 3-51). Dat is een mooi uitgangspunt om eventuele veranderingen in slibsamenstelling te kunnen volgen in de tijd. De verwachting is vooral dat de slibsamenstelling op termijn gaat verschillen van elkaar en dat er minder draadvormers en meer PAOs zullen voorkomen door het S-select proces.



Op basis van Figuur 3-54 kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- Het aandeel PAO's (*Accumulibacter*) vertoont voor de RWZI's Nieuwe Wetering en Nieuwveen nagenoeg hetzelfde patroon. Dit was ook te zien in Figuur 3-52 en Figuur 3-53 voor *Accumulibacter*, welke zeer dominant aanwezig is in beide zuiveringen. Geconcludeerd wordt dat het S-select proces geen bijdrage levert aan het aandeel PAOs. Een andere P-bindende bacterie *Acinetobacter* komt niet voor bij beide RWZI's.
- De GAOs (o.a. *Competibacter*) concurreren met PAOs voor voedsel en zijn daarom ongewenst. Het aandeel *Competibacter* ligt op de RWZI Nieuwe Wetering significant lager dan op de RWZI Nieuwveen. Of dit een gevolg is van het S-select proces kan niet worden vastgesteld omdat initieel het aandeel *Competibacter* op de RWZI Nieuwe Wetering al lager lag dan op Nieuwveen. Wel is te zien dat het aandeel *Competibacter* op beide locaties afnam op 6-3-2018 maar lijkt daarna vooral op RWZI Nieuwveen meer toegenomen te zijn. Een mindere toename bij RWZI Nieuwe Wetering zou kunnen komen door het S-select proces.
- Het aandeel draadvormende bacteriën (*Microthrix spp.*) in de RWZI Nieuwe Wetering ligt aanzienlijk hoger dan op de RWZI Nieuwveen. In maart en mei 2018 lag het aandeel *Microthrix* op Nieuwe Wetering rond de 2% terwijl ze op de RWZI Nieuwveen nauwelijks aanwezig waren. Er is over de meetperiode geen dalende trend te zien in het aandeel *Microthrix* op de RWZI Nieuwe Wetering, deze fluctueert nogal. Geconcludeerd wordt dat de hydrocycloon niet bij lijkt te dragen aan een afname van draadvormers, maar door de fluctuaties kunnen we geen harde conclusies trekken.

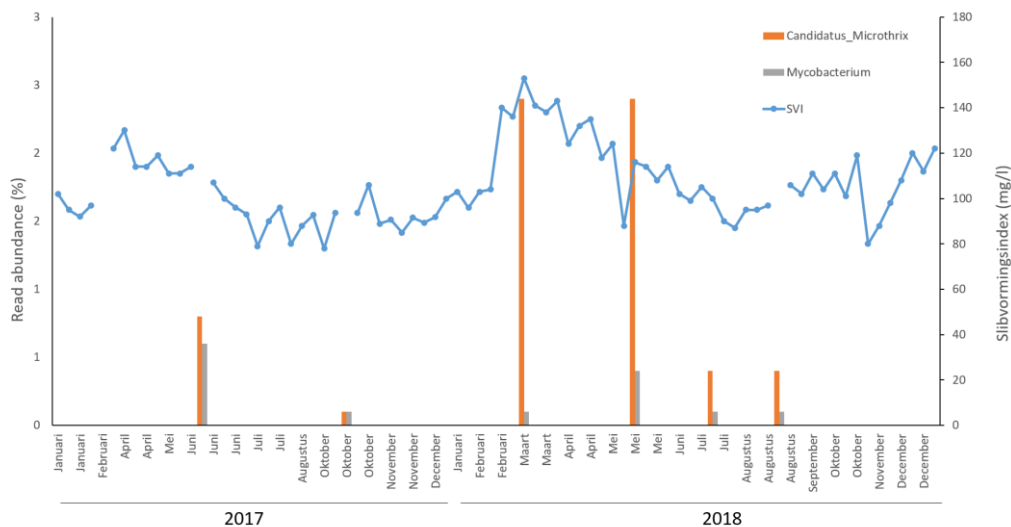




FIGUUR 3-54: RELATIEF AANDEEL VAN SPECIFIEKE OTU'S IN DE VERSCHILLENDE MONSTERS VAN ACTIEF SLIB VAN NIEUWE WETERING EN NIEUWEVEEN

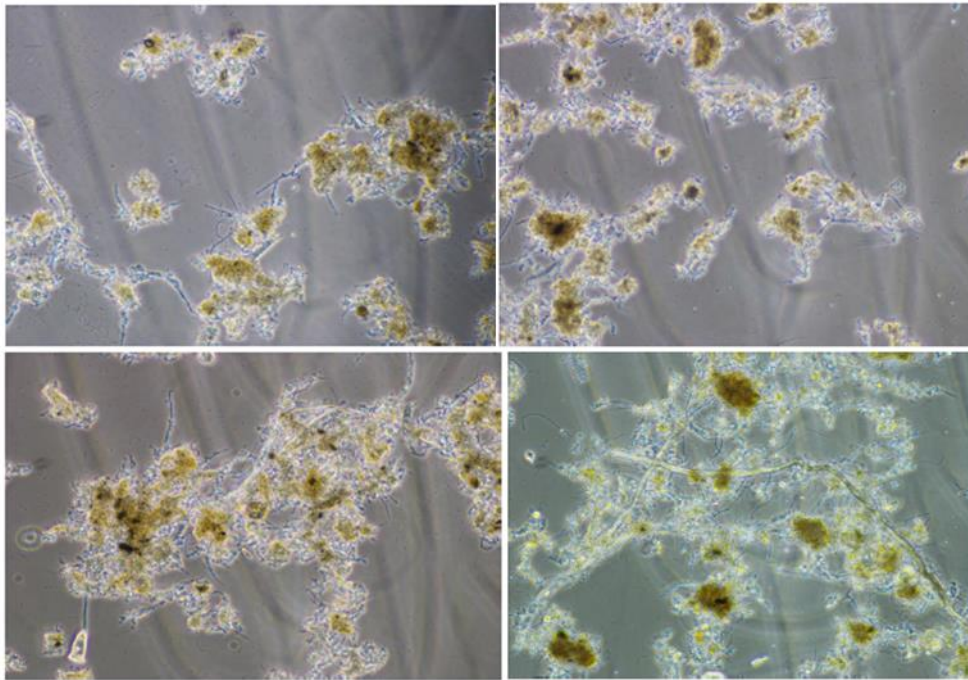
### Slibvolume-index en slibanalyses

Om meer inzicht te krijgen in de ontwikkeling van de populatie *Microthrix sp.* zijn tevens slibanalyses en de slibvolume-index (SVI) van de RWZI's Nieuwe Wetering en Nieuwveen beoordeeld. De ontwikkeling van de SVI van de RWZI Nieuwe Wetering is weergegeven in Figuur 3-55. Er is te zien dat de SVI in de loop van 2017 aan de onderkant van de bandbreedte ligt. Dit kan een aanwijzing zijn dat het aantal draadvormers sinds in gebruik name van de hydrocycloon omlaag gaat. De NGS data laat zien dat draadvormers zoals *Microthrix spp.* en *Mycobacterium* in totaal nogal fluctueren, met een kleine piek in juni 2017 en een piek van 2% in maart-mei 2018. Deze piek komt overeen met een piek in de SVI, en er lijkt dus een correlatie te zijn tussen de aanwezigheid van draadvormers en de SVI. Verder is het opvallend dat de SVI in beide jaren het hoogst is in Maart-Mei.



FIGUUR 3-55: DE SLIBVOLUME-INDEX (ML/G) VAN DE RWZI'S NIEUWE WETERING EN HET AANTAL READS (%) VAN DRAADVORMERS CANDIDATUS MICROTHRIX EN MYCOBACTERIUM GEDURENDE DE TIJD.

Sinds het in gebruik name van de hydrocycloon worden er op de RWZI Nieuwe Wetering microscopische slibanalyses uitgevoerd. Aan de hand van slibanalyses kunnen conclusies getrokken worden over de gesteldheid van het slib en de aanwezigheid van bijvoorbeeld draadvormers. Figuur 3-56 geeft de gesteldheid van het slib van de RWZI Nieuwe Wetering weer voor de periode 7-8-2017 t/m 6-2-2018. Te zien is dat het aantal draadvormers in het slib geleidelijk toeneemt, DNA fingerprinting geeft relatieve waarden van *Microthrix* en geen absolute, welke erg fluctueren in de tijd. De slibkwaliteit neemt af van de classificatie 'goed' op 20 juli 2017 tot 'matig' op 28 augustus 2018. Dit komt overeen met het profiel van de SVI waarbij in de periode van 2017 een lagere SVI gemeten wordt dan in de eerste periode van 2018.



FIGUUR 3-56: MICROSCOPISCHE SLIBANALYSES VAN 07-08-2017 (LINKSBOVEN), 17-10-2017 (RECHTSBOVEN), 06-11-2017 (LINKSONDER) EN 06-02-2018 (RECHTSONDER).

### 3.7.3 Conclusies

Op basis van de analyseresultaten kan niet vastgesteld worden of een hydrocycloon een verbetering oplevert van de SVI. De SVI is niet significant lager dan voorgaande jaren en ook uit slibanalyses volgt nog geen afname van het aandeel *Microthrix parvicella*. DNA fingerprinting laat grote fluctuaties zien van *Microthrix* en *Mycobacterium* en daar kan daarom ook niet uit geconcludeerd worden of er een toe- of afname is. Wel lijkt de SVI gecorreleerd te zijn aan de aanwezigheid van draadvormers. Ook ten aanzien van de biologische fosfaatverwijdering kunnen geen conclusies getrokken worden. Uit de analyses volgt dat er geen verbetering te zien is in de populatie PAOs maar dat het aandeel GOAs zoals *Competibacter* zich op de RWZI Nieuwe Wetering minder snel ontwikkelen dan op de RWZI Nieuwveen. Of dit veroorzaakt wordt door het S-select proces is niet te zeggen. Om sterke conclusies te kunnen trekken zijn meer DNA metingen, SVI metingen en slibanalyses noodzakelijk gedurende meerder jaren om de grote fluctuaties statistisch op te vangen.

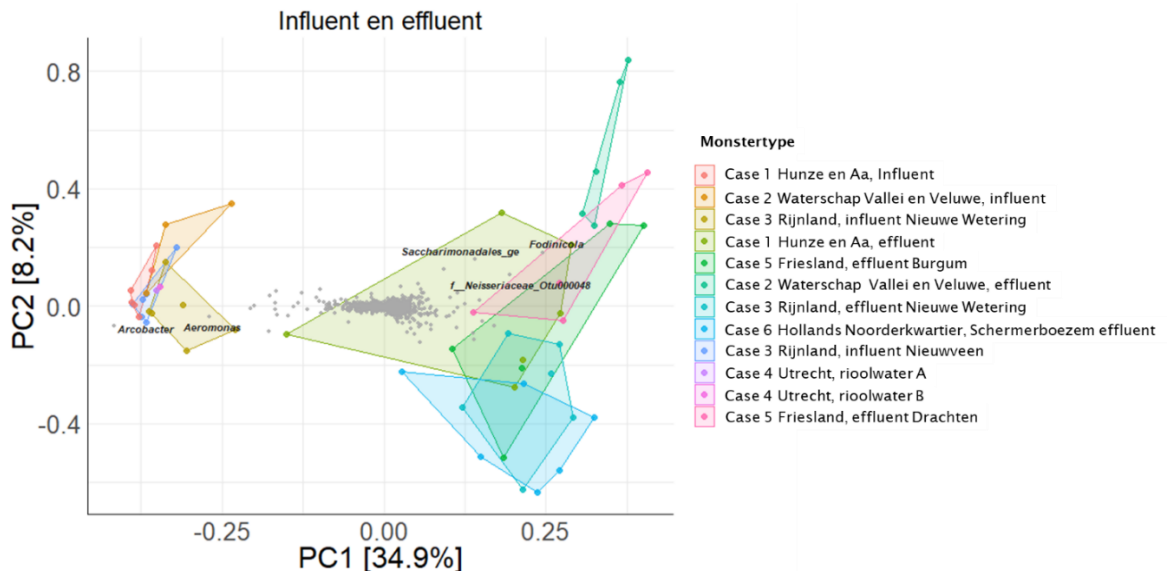
## 4 Algemene discussie

### 4.1 Traceerbaarheid en herkomst van RWZI effluent, rioolwater en oppervlaktewater

#### 4.1.1 Opbrengsten

##### 4.1.1.1 Traceerbaarheid RWZI effluent en rioolwater

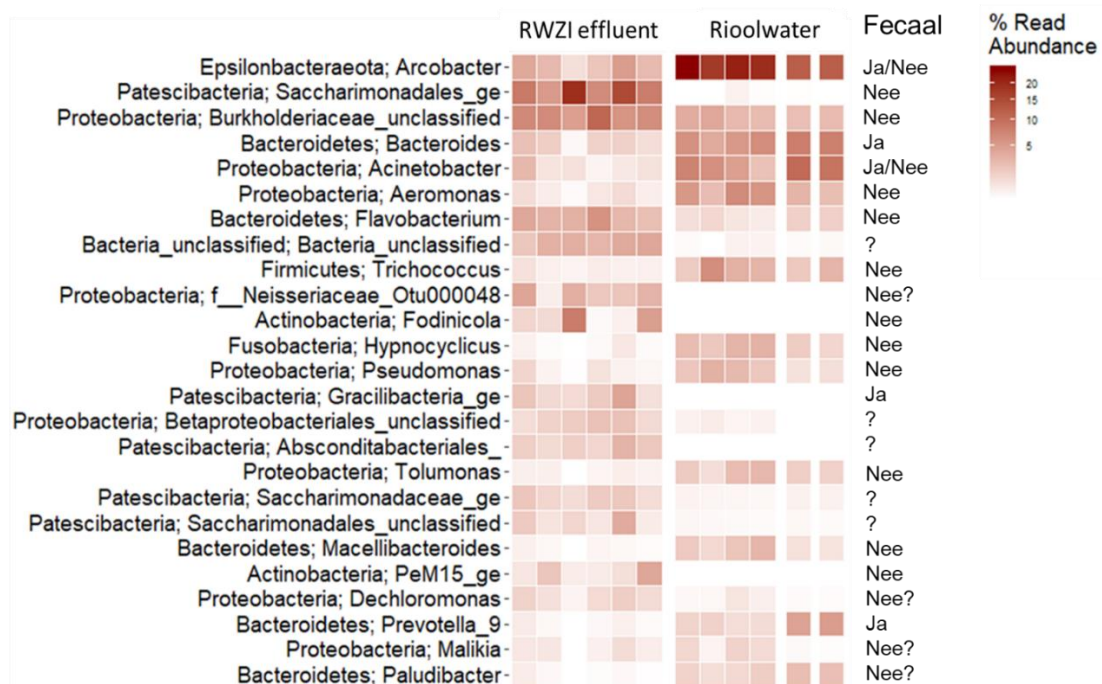
Voor de meeste cases was traceerbaarheid van RWZI effluent of rioolwater een belangrijk onderdeel van de vragen betreft riool overstort, effluentlozing en waterkwaliteit (case Vallei & Veluwe, gemeente Utrecht & HDSR, Wetterskip Fryslân, HH Hollands Noorderkwartier) en lekkage in grondwater (case Hunze en Aa's). In dit project is duidelijk geworden dat de microbiële gemeenschappen van de verschillende bronnen zich sterk onderscheidt (rioolwater, actief slib, RWZI effluent, oppervlaktewateren en grondwater). Om duidelijk te hebben wat de opbrengsten zijn van alle cases waar we DNA fingerprinting als source tracker gebruikt hebben, hebben we de karakteristieke microbiële gemeenschap (het 'microbioom') van rioolwater en RWZI effluent bepaald. Van alle cases zijn de rioolwater, RWZI influent, en RWZI effluent monsters samen geanalyseerd. Hieruit valt af te leiden dat rioolwater en RWZI effluent een ander microbioom hebben en dat rioolwater minder variatie vertoont dan RWZI effluent (Figuur 4-1). Een aantal genera die verklarend zijn voor de scheiding van rioolwatermonsters en RWZI effluent monsters zijn ook in Figuur 4-1 weergegeven; dit zijn de dominante soorten die indicatororganismen zijn voor riool of RWZI effluent, zoals *Arcobacter* en *Aeromonas* voor riool of *Saccharimonadales*, *Fodinicola*, en *Neisseriaceae\_OTU00048* voor RWZI effluent.



FIGUUR 4-1: PCOA VAN ALLE OTU'S VAN ALLE RWZI INFLUENT, RIOOLWATER, EN RWZI EFFLUENTMONSTERS (GEBASEERD OP BRAY-CURTIS DISTANCE).

Van de top 25 meest abundante soorten in riool en RWZI effluent samen kan een lijst opgesteld worden van indicatorsoorten voor beide typen monsters (Figuur 4-2). In alle

cases zagen we een sterke variatie van microbiële compositie in de tijd. In de literatuur zijn niet veel spatio-temporale verschillen bekend in de abundantie van deze bacteriën, behalve dat *Trichococcus* meer voor lijkt te komen bij lagere temperaturen (McLellan et al., 2019). Verder is aangetoond dat microbiële fluctuaties vooral gedreven worden door stochastische processen (drift en dispersie) en deterministische factoren (temperatuur en aanvoer van organisch materiaal) (Wu et al., 2019). De stromingssnelheid van afvalwater schijnt ook een belangrijke parameter te zijn die variatie in de microbiële gemeenschap veroorzaakt (Guo et al., 2019). Dispersie, drift en de stromingssnelheid van afvalwater worden o.a. bepaald door regenval. In veel van de cases is te zien dat de microbiële gemeenschap in RWZI effluent erg fluctueert, afhankelijk van de monsterdatum. In case 4 (Wetterskip Fryslân) zien we zelfs dat de beide RWZI's twee duidelijke profielen laten zien in de tijd; *Mycobacterium* en *Actinobacteria\_PeM15* komen meer voor op 05-06-18 en 03-07-18 in beide effluenten, en *Arcobacter* komt meer voor op 13-09-17, dat ook weer terug te zien is in de oppervlaktewateren. Omdat dit voor beide RWZI's geldt, lijken hier bepaalde parameters verantwoordelijk voor te zijn, maar welke parameters dat zijn is niet duidelijk. Wat zeer opvallend is, is dat de typische bacteriën die dominant voorkomen in rioolwater, zoals *Arcobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* en *Trichococcus* in verschillende landen zoals de Verenigde Staten, Australië, Brazilië, China, en Spanje ook de dominante micro-organismen in rioolwater zijn (McLellan et al., 2019). Dit geeft aan dat het rioolwater microbioom dat we in dit onderzoek vinden niet alleen in Nederland deze samenstelling heeft, maar waarschijnlijk in de hele wereld. Dit maakt het waarschijnlijk dat rioolwater overal te traceren is aan de hand van deze indicator bacteriën.



FIGUUR 4-2: HEATMAP VAN DE TOP 25 MEEST ABUNDANTE BACTERIEGROEPEN IN ALLE RWZI EFFLUENT EN RWZI INFLUENT EN RIOOLWATER MONSTERS VAN ALLE CASES EN OF DEZE BACTERIEGROEPEN VAN FECALE AFKOMST ZIJN. WANNEER 'JA/NEE' VERMELD WORDT BETEKENT HET DAT DE LITERATUUR BEIDE ONDERSTEUNDE. EEN VRAAGTEKEN GEEFT ONZEKERHEID IN DE LITERATUUR AAN.

Veel genera van het rioolwater microbioom maken deel uit van dierlijke en het humane microbioom, en komen dus via feces in het riool terecht. Opvallend is dat veel van de

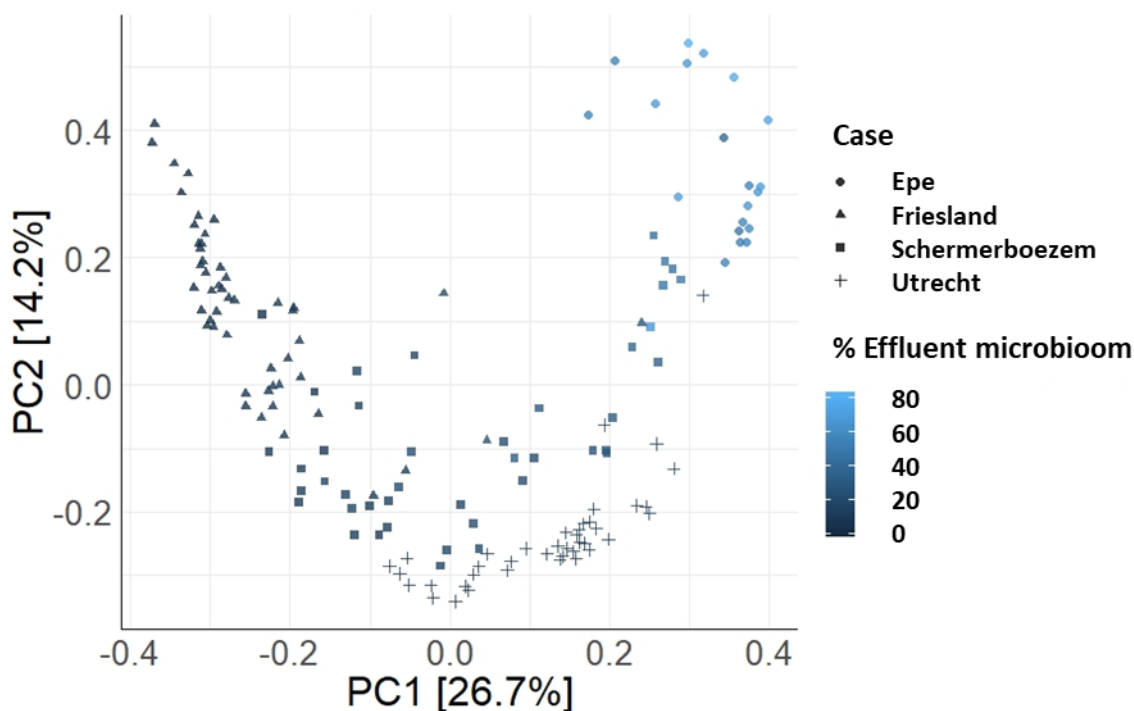
meest abundante genera in rioolwater niet fecaal zijn. Het is daarom aannemelijk dat deze genera een grote rol hebben in het zuiveren van het rioolwater voordat dit bij het RWZI terechtkomt. Veel genera die in het rioolwater voorkomen, zien we ook terug in het RWZI effluent. Het kan zijn dat deze organismen ook in de RWZI's bijdragen aan de zuivering, maar het kan ook dat deze niet actief zijn terwijl ze de afvalwaterzuivering doorlopen. Dit toont aan dat deze bacteriën dus specifiek zijn voor rioolwater en niet voor feces en maakt ze uitermate geschikt als tracer voor rioolwaterinvloed. Dit geldt ook voor genera die specifiek zijn voor RWZI effluent; deze zijn meestal niet van fecale origine of dit is niet bekend, en zijn waarschijnlijk betrokken bij de zuiveringsprocessen.

Rioolwater bacteriën betreffen vaak opportunistische pathogenen en worden vaak geassocieerd met fecale verontreiniging en antibiotica resistentie (Auguet et al., 2017). *Arcobacter* en *Acinetobacter* zijn zeer dominant in rioolwater en worden vaak geassocieerd met verspreiding van antibiotica resistentie (McLellan et al., 2019). Riool overstorten en lekkages van riolering en RWZI's vormen daarom een directe bedreiging voor de waterkwaliteit en de volksgezondheid. Door de klimaatsverandering waarbij hevige regenval momenten steeds meer voor zullen komen, zal riooloverstort een steeds groter probleem worden. Tijdens toekomstige langdurige droge periodes zal juist de invloed van RWZI effluent op oppervlaktewater prominenter kunnen zijn. Het is daarom zaak om de invloed van rioolwater en RWZI effluent op oppervlaktewater goed te monitoren. NGS biedt hiervoor goede mogelijkheden.

#### 4.1.1.2 Traceerbaarheid oppervlaktewater

Voor een aantal cases was ook een onderdeel van de vraag of de herkomst van oppervlaktewater te traceren is, zoals bij case Gemeente Utrecht & HSDR, Wetterskip Fryslân en HH Hollands Noorderkwartier). Het antwoord op deze vraag is minder eenduidig. In alle cases leken de temporale verschillen (monstername) tussen oppervlaktewater monsters een grotere invloed te hebben dan spatiele verschillen (monsterlocatie). Het onderscheid tussen locaties in de onderzochte case studies is daarom niet voldoende voor het traceren van de herkomst. Wanneer bij een bepaald oppervlaktewater RWZI effluent geloosd wordt is de verdunning benedenstrooms wel goed te traceren. In Figuur 4-3 zijn alle monsterdata van de oppervlaktewateren van alle cases samengebracht om wellicht een trend te ontdekken die door het scheiden van de cases niet te zien was. Hier wordt onderstreept dat de microbiële profielen van verschillende locaties van oppervlaktewater monsters overlappen en dat er grote spreiding is per locatie, afhankelijk van de monsterdatum. Ook is te zien dat clustering naast locatie, ook gedeeltelijk lijkt plaats te vinden op basis van de source tracker output: het percentage RWZI effluent microbioom in de monsters. Dit maakt het aannemelijk dat het aandeel RWZI bacteriën bepalend is voor de variatie in oppervlaktewater in de tijd. Als dit het geval is, betekent dit dat lozing van RWZI effluent de microbiële variatie dicteert en dat andere parameters zoals locatie minder van belang zijn. Er is echter meer bewijs nodig om dit te concluderen.





FIGUUR 4-3: PCOA VAN ALLE OTU'S VAN ALLE OPPERVLAKEWATER MONSTERS VAN ALLE CASES WAARBIJ DE RESULTATEN VAN SOURCE TRACKER (% EFFLUENT-MICROBIOOM) ZIJN GEINTEGREERD (GEBASEERD OP BRAY-CURTIS DISTANCE).

#### 4.1.2 Aanbevelingen en vervolg

Uit dit onderzoek volgt dat de rioolwater bacteriën en RWZI effluent bacteriën traceerbaar zijn in grond- en oppervlaktewater en dat er specifieke bacteriën geïdentificeerd zijn die als tracer gebruikt kunnen worden. Het traceren lijkt tot ver van de bron te kunnen, maar de mate van traceerbaarheid is niet bepaald. De source tracker data (% invloed van microbiële gemeenschap van een 'source' op bepaalde 'sinks') hebben we ook getracht te koppelen aan riooloverstort data, seizoensinvloeden, mate van regenval en waterkwaliteit. Er is een trend waarneembaar waarbij de invloed van rioolwater bacteriën groter is bij riooloverstort momenten of hevige regenval. Ook lijkt bij een bepaalde mate van invloed van RWZI bacteriën, dat de kolonietallen van *E. coli* of *enterococcon* omhoog gaan, zoals in case 4 van Wetterskip Fryslân (Figuur 3-37). Om beter vast te stellen hoe deze data gekoppeld is, zouden de NGS analyses gecombineerd moeten worden met seizoenensinvloeden zoals overstort momenten, hevige regenval en langdurige droogte, en *E. coli* en *enterococcon* kolonietallen. Een 'pilotstudie' waarbij dit goed in kaart wordt gebracht voor één gebied (dus 1 case) gedurende een jaar zal betrouwbaardere data geven. Hiermee kunnen beter gevalideerde uitspraken gedaan kunnen worden over de kracht van NGS op het monitoren van oppervlaktewater. Dit zou ook kunnen helpen bij het bepalen van het percentage invloed van microbiële populatie van riool of RWZI effluent dat zorgt voor overschrijdingen van *E. coli* of *Enterococcon*.

Bovenstaande zou bij kunnen dragen aan de vraag welke microbiologische samenstelling ecologisch gezond water moet hebben en wanneer het aan de KRW eisen voldoet. Daarvoor moet eerst de samenstelling van het water dat aan de KRW eisen

voldoet in kaart gebracht worden met NGS gedurende een langere tijd. DNA fingerprinting zou daarna kunnen helpen om te evalueren of maatregelen voor verschuivingen richting 'goed KRW water' voldoende zijn geweest in andere wateren.

Verder zou het nuttig zijn (maar wellicht onmogelijk) om wateren die niet onder invloed staan van overstorten/RWZIs te bemonsteren om te zien of de indicatororganismen voor riool en RWZI effluent echt afwezig zijn en dat source tracker als output een 0% invloed van het microbiële profiel van riool of RWZI effluent genereert. Dit geldt ook voor het vaststellen van de samenstelling van grondwater zonder lekkage van RWZIs.

Alhoewel de technologie in DNA fingerprinting zich blijft ontwikkelen en steeds goedkoper en sneller wordt, is een gerichte analyse methode zoals qPCR nog steeds sneller en goedkoper en daarnaast kwantificeerbaar. Een qPCR methode om bijvoorbeeld *Arcobacter* als rioolwater indicator te gebruiken zou bijdragen aan een snelle diagnose voor het opsporen van riool invloed op oppervlaktewater. Dit kan bijdragen aan een snelle detectie van bijvoorbeeld lekkage van riolering of van riooloverstort momenten. Als indicator voor RWZI effluent lijken *Saccharimonadales* of *Fodinicola* goede kandidaten. Deze kunnen ingezet worden om lekkage van RWZI's of invloed van effluent sneller te traceren.

De resultaten van Source Tracker geven een indicatie welk deel van een bacteriepopulatie afkomstig is van afzonderlijke waterstromen (bijvoorbeeld RWZI effluent). Een interessant aspect voor vervolgonderzoek is om te beoordelen in welke mate de resultaten van Source Tracker te correleren zijn aan de feitelijke hoeveelheden water. Deze correlatie kan gemaakt worden als van een watersysteem de afzonderlijke debieten bekend zijn zoals effluënten en debieten van afzonderlijke poldergemalen. Wetterskip Fryslân heeft recent een studie uit laten voeren waarin aan de hand van een SOBEK model de Waterkwaliteit in de Friese Boezem gemodelleerd is (Tauw, 2017). Het doel van de studie was voornamelijk om het effect van RWZI effluent op de waterkwaliteit in de Friese Boezem te voorspellen. Aanbevolen wordt om in een vervolgfase voor Wetterskip Fryslân de debietgegevens en nutriëntenvrachten naast de NGS resultaten te leggen om de resultaten van Source Tracker te verifiëren.

## 4.2 Proces veranderingen in RWZI's

### 4.2.1 Opbrengsten

Voor de case van HH van Rijnland was de vraag belangrijk of NGS ook kan worden ingezet om de dynamiek van organismen in RWZI's in kaart te brengen. In dit onderzoek blijkt dit mogelijk te zijn geweest, waarbij bijvoorbeeld draadvormers, PAOs en GAOs in kaart zijn gebracht. NGS kan veel inzicht geven in de dynamiek van RWZI's in de tijd. In deze case was het niet mogelijk om een sterke link te leggen tussen operationele parameters en microbiële profielen, maar dat kwam voornamelijk door het klein aantal monsters. Wanneer RWZIs op regelmatige basis met NGS gemonitord zouden worden, zou een link hiertussen wel degelijk gemaakt kunnen worden.



#### 4.2.2 Aanbevelingen en vervolg

Om duidelijk te krijgen welke factoren de dynamiek van microbiële populaties in RWZI's bepalen, is een breder onderzoek die dit in kaart brengt essentieel. Een combinatie van DNA fingerprinting met gegevens over de samenstelling van het inkomend influent en de prestatie van de zuivering (debiet, P en N verwijdering), kan bijdragen aan het begrip hiervan. NGS zou met deze inzichten in de toekomst ingezet kunnen worden om een totaalbeeld te krijgen van de microbiële populatie in de zuivering en zo te achterhalen waarom een bepaalde zuivering beter of minder goed functioneert. Ook kunnen dan aanbevelingen worden gedaan om de prestaties van RWZI's te verbeteren. Het is in dit onderzoek bijvoorbeeld al gebleken dat de populatie draadvormers, PAOs en GAOs erg dynamisch is. Wanneer men de groei van deze micro-organismen wil stimuleren of remmen, is meer kennis over operationele parameters en samenstelling van het influent essentieel.

Om de dynamiek van deze specifieke groepen gericht te traceren en te kwantificeren, zijn ook hiervoor qPCR methoden wellicht nuttig. Er zijn voor fosfaatverwijderaars zoals PAOs in het verleden al qPCR methoden ontwikkeld om deze populaties te kwantificeren die hiervoor ingezet kunnen worden (rapport KWR 2015.106). Verder zou de ontwikkeling van qPCR methoden voor draadvormers of andere sleutelsoorten in de zuivering van belang zijn om nog gericht de prestatie van een zuivering te achterhalen.

## 5 Literatuur

- Andersen K., Kirkegaard R.H., Karst S.M., Albertsen M. (2018). Ampvis2: an R package to analyse and visualise 16S rRNA amplicon data. bioRxiv.
- Auguet O., Pijuan M., Borrego C.M., Rodriguez-Mozaz S., Triadó-Margarit X., Varela Della Giustina S., Gutierrez O. (2017). Sewers as potential reservoirs of antibiotic resistance. *Sci Tot Environ*, 605-606: 1047-1054.
- Bing Guo, Chenxiao Liu, Claire Gibson, Dominic Frigon. (2019). Wastewater microbial community structure and functional traits change over short timescales. *Sci Tot Environ*, 662: 779-785
- Heijnen, L. and Learbuch, K. (2013). Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen. BTO rapport BTO 2013.014.
- Jørgensen, V. R., Dueholm, M. S., Knutsson, S., Nierychlo, M., Kristensen, J. M., Petriglieri, F., ... Nielsen, P. H. (2018). Global database of microbes in wastewater treatment systems. Poster session presented at 17th International Symposium on Microbial Ecology, Leipzig, Germany.
- Lee C, Agidi S, Marion JW, Lee J. (2012). *Arcobacter* in Lake Erie beach waters: an emerging gastrointestinal pathogen linked with human-associated fecal contamination. *Appl Environ Microbiol*, 78: 5511-5519.
- McLellan S. L., Roguet A. (2019). The unexpected habitat in sewer pipes for the propagation of microbial communities and their imprint on urban waters. *Curr Opin Biotechnol*, 57: 34-41.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 41(D1): D590-D596.
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 62(2): 142-160.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Sahl, J. W. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 75(23): 7537-7541.
- Tauw. (2017). Waterkwaliteit in de Friese Boezem; Modellering van de waterkwaliteit in de Friese Boezem met Sobek.
- Wu, L., Ning, D., Zhang, B., Li, Y., Zhang, P., & Shan, X. et al. (2019). Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nature Microbiology*, 4(7), 1183-1195. doi: 10.1038/s41564-019-0426-5.

## Bijlage I Monsternameschema per case (wanneer bekend)

### Monstername Rijnland

Iedere drie maanden een monster op dezelfde dagen dat microscopisch slib en chemische analyse wordt uitgevoerd. De chemisch analyse loopt al en microscopisch slibanalyse is aangevraagd bij laboratorium Aquon. Datumplanning (in geel wordt ook slib bekeken):

Datum	Nieuwe Wetering
vrijdag 5 mei 2017	NWT10
zaterdag 20 mei 2017	NWT12
zondag 4 juni 2017	NWT10
maandag 19 juni 2017	NWT12
dinsdag 4 juli 2017	NWT2
woensdag 19 juli 2017	NWT12
donderdag 3 augustus 2017	NWT10
vrijdag 18 augustus 2017	NWT12
zaterdag 2 september 2017	NWT10
zondag 17 september 2017	NWT12
maandag 2 oktober 2017	NWT10
dinsdag 17 oktober 2017	NWT12
zaterdag 4 november 2017	NWT10
zondag 19 november 2017	NWT12
maandag 4 december 2017	NWT10
vrijdag 22 december 2017	NWT12

Nw Wetering	In route		
RZ057BEG	NWT12	NWT10	NWT2
RZ057INF	NWT12	NWT10	NWT2
RZ057EFF	NWT12	NWT10	NWT2
RZ057AKS1		NWT10	NWT2

### Bestaande monsterpunten

Op 5-6 juni 2017 zijn onderstaande monsterpunten bemonsterd:

RZ057INF influent awzi Nieuwe Wetering

RZ057AKS1 actief slib awzi Nieuwe Wetering

RZ057EFF effluent awzi Nieuwe Wetering

RO836 Ringvaart ter hoogte van awzi Nieuwe Wetering

RZ047AKS1 actief slib awzi Nieuwveen

RZXXXINF influent awzi Nieuwveen

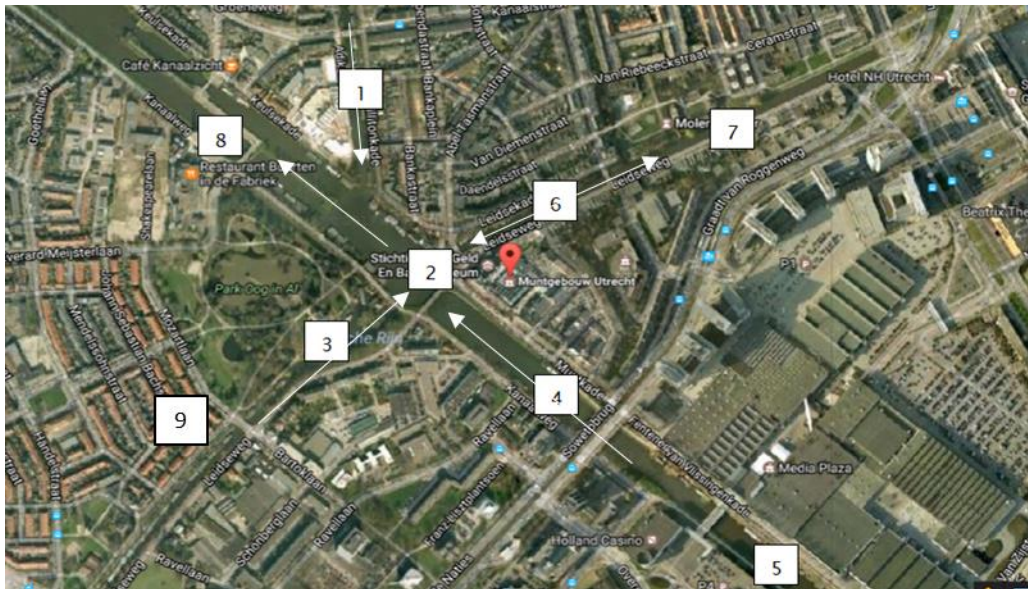
### Monstername Vallei Veluwe

In 2018 zijn er monsters gehaald op 4 april en op 13 augustus aan het einde van de dag omdat er toen een overstort situatie was, zie overstortrapportage in Excel. De monsters zijn op dezelfde dag binnen twee uur uit elkaar genomen. Niet tegelijk want dezelfde monsternemer kan niet op 4 plekken tegelijk zijn. Het water in de Dorpse Beek Epe stroomt niet zo hard dat het binnen een uur weg is.

In 2018 4 keer een overstortgebeurtenis bij Neustrinkweg en De Pal (beiden gelegen vòòr de RWZI). Dat is de reden geweest dat er op 13 augustus 2018 aan het einde van de dag twee monsters zijn gehaald terwijl de overstorten nog werkten. Feitelijk zijn die beide monsters representatief voor meetlocatie 1 in het schema. Er zijn toen geen monsters op andere meetlocaties gehaald.

### Monstername Utrecht

Hieronder een kaartje met de locatie waar de monsters zijn genomen.



Bureau RPS heeft daarnaast op deze opgegeven coördinaten de monstername uitgevoerd:

1. Oppervlaktewater Oude Rijn. Bovenstreams bevindt zich een gemengde riooloverstort (NL14\_21348 134845.0 455781.0)
2. Oppervlaktewater Vlonder de Munt (zwemwaterlocatie) (NL14\_21349 134975.0 455526.0)
3. Oppervlaktewater Leidsche Rijn Bovenstreams bevinden zich twee gemengde riooloverstorten (NL14\_21350 134811.0 455403.0)
4. Oppervlaktewater Merwedekanaal (benedenstreams riooloverstort Sowetobrug) (NL14\_21351 135158.0 455315.0)

5. Oppervlaktewater Merwedekanaal (bovenstrooms riooloverstort Sowetobrug)  
(NL14\_21352 135413.0 455062.0)
6. Oppervlaktewater Leidse weg (benedenstrooms riooloverstort J.P. Coenstraat)  
(NL14\_21353 135133.0 455590.0)
7. Oppervlaktewater Leidse weg (bovenstrooms riooloverstort J.P. Coenstraat)  
(NL14\_21354 135435.0 455739.0)
8. Sluiskom bij de Muntsluis, naast meetpunt 2 de meest populaire zwemlocatie  
bij de Munt (NL14\_21355 134642.0 455706.0)

De bemonstering is uitgevoerd d.m.v. een schone emmer met touw, waarbij vanuit de emmer de monsterflessen gevuld zijn.

#### **Monstername Wetterskip Fryslân**

De monstername is in de jaren 2017 en 2018 uitgevoerd volgens het voorschrift behandeling voor microbiologische analyses (NEN-EN-ISO 19458) overeenkomstig het publicatieblad van de Zwemwaterrichtlijn van de Europese Unie (Richtlijn 2006/7/EG)

In onderstaand schema zijn de bemonsteringsdata weergegeven.

Datum	Meetpunt
20-6-2017	0034, 0045, 0052, 0817, 0822, 2037, 9008, 9041, 9036
12-9-2017	0034, 0045, 0052, 0817, 0822, 2037, 9008, 9041, 9036
5-6-2018	0034, 0045, 0052, 0817, 0822, 2037, 9008, 9041
3-7-2018	0034, 0045, 0052, 0817, 0822, 2037, 9008, 9041
31-7-2018	0034, 0045, 0052, 0817, 0822, 2037, 9008, 9041