

DNA bronopsporing op vier zwemwaterlocaties in Midden-Nederland in 2019

KWR 2019.104

Datum

9 december 2019

Opdrachtgever

RWS-WVL

Meer informatie

dr.ir. Michiel Hootsmans

T 0622951843

E michiel.hootsmans@kwrwater.nl

Auteur(s)

M.J.M. Hootsmans

Opdrachtnummer

402887

Kwaliteitsborger(s)

L. Heijnen (gedelegeerd namens G. Medema)

Projectmanager

M.J.M. Hootsmans

Pagina

1/14

Inhoud

1	Inleiding	3
2	Methode en aanpak	3
2.1	Verzamelen van watermonsters	3
2.2	Filtratie	4
2.3	DNA analyse	4
3	Resultaten en discussie	5
3.1	De opbrengst van de inhibitie en rendementscontrole	5
3.2	Resultaten DNA analyse en kweek	5
3.2.1	Oude Pol extra meetpunt B Bijsselsebeek	5
3.2.2	Badstrand Edam	8
3.2.3	Andijk Zwemstrand	10
3.2.4	Woldstrand	11
4	Conclusies	13
5	Referenties	14

1 Inleiding

In het beheergebied van RWS liggen diverse zwemwaterlocaties. De zwemwaterkwaliteit van deze locaties valt niet altijd in de categorie uitstekend of goed zoals vastgelegd in de Europese zwemwaterrichtlijn. Voor de waterbeheerder is het van belang om de belangrijkste bronnen die bijdragen aan de overschrijdingen in concentraties *E. coli* en intestinale enterococcen in beeld te krijgen. Deze indicatorbacteriën komen algemeen voor in darmen van warmbloedige dieren en de concentratie van deze bacteriën in oppervlaktewater geeft daarom een indruk van de concentratie fecaal materiaal in het water en daarmee van de potentiële aanwezigheid van ziekteverwekkende micro-organismen, zoals virussen en bacteriën.

Fecale verontreiniging in oppervlaktewater kan afkomstig zijn van een heel scala aan bronnen. Te denken valt aan de aanwezigheid van (water)vogels, vervuiling door recreanten, afspoeling van agrarisch gebied, effluentlozing door RWZI's, overstorten uit rioolwater- of hemelwaterriolering, aanwezigheid van wilde fauna en afspoeling van honden- en/of paardenfeces. Welk van dergelijke bronnen nu bijdraagt aan de verminderde (zwem)waterkwaliteit is op basis van alleen de indicator bacteriën (*E. coli* en intestinale enterococcen) niet te achterhalen. Sinds enkele jaren maakt men daarvoor gebruik van specifieke DNA-methoden. Met dergelijke technieken is onderscheid te maken tussen diergroepspecifieke bacteriën met fecale herkomst (Heijnen & Learbuch 2013, Heijnen et al. 2014). Met behulp van DNA technieken (qPCR) kunnen dergelijke bacteriën gedetecteerd en gekwantificeerd worden. De meest relevante diergroepen die momenteel in het laboratorium van KWR met DNA merkers onderscheiden kunnen worden zijn: mensen, vogels, varkens, herkauwers (als groep), runderen (uit de groep van herkauwers), paarden en honden.

De potentiële bronnen van fecale verontreiniging zijn met de bestaande zwemwaterprofielen redelijk in beeld. Met de resultaten van de DNA analyse in de hand kan de (water)beheerder gericht maatregelen nemen. Deze zijn erop gericht om de invloed van aangetoonde bronnen (zoals vogels, varkens, honden, runderen en overige herkauwers, mensen en paarden) te minimaliseren en zo de (zwem)waterkwaliteit te verbeteren dan wel te garanderen. RWS-WVL heeft eerder met behulp van de DNA technieken onderzoek laten uitvoeren naar de oorzaken van beperkte zwemwaterkwaliteit van een aantal locaties in rijkswateren. Het doel van dit DNA-onderzoek is om te achterhalen wat de voornaamste bron van fecale verontreiniging is die bijdraagt aan de concentraties van de fecale parameters *E. coli* en intestinale enterococcen gedurende het zwemseizoen.

In 2019 heeft het onderzoek zich gericht op vier zwemwaterlocaties in het beheergebied van RWS Midden-Nederland waarvan de zwemwaterkwaliteit is ingedeeld in de categorie 'slecht' of 'aanvaardbaar': Oude Pol - Bijsselsebeek, Badstrand Edam, Andijk Zwemstrand en Woldstrand.

2 Methode en aanpak

2.1 Verzamelen van watermonsters

Op de vier onderzochte zwemwaterlocaties is tijdens de reguliere bemonstering in het zwemseizoen 2019 voor de bepaling van indicator bacteriën (*E. coli* en intestinale enterococcen) steeds ook extra water verzameld voor de

DNA bronanalyse. In totaal ging het om 12 monsters voor bacteriekweek van de Oude Pol - Bijsselsebeek, 14 van Badstrand Edam, 13 van Andijk Zwemstrand en 12 van Woldstrand. Bij eventuele herhalingsmonsters zijn geen monsters voor DNA analyse genomen.

De monstername is op alle locaties uitgevoerd door Intertek in opdracht van RWS-WVL. Alle monsters voor de latere DNA analyse zijn binnen 48 uur afgeleverd bij het laboratorium van Intertek, waar de filtratie van de monsters en conservering/voorbehandeling van de filters is uitgevoerd. Om een goede vergelijking van DNA-resultaten met kweekgegevens van *E. coli* en intestinale enterococcen mogelijk te maken, zijn door Intertek in opdracht van RWS parallel aan de watermonsters voor DNA analyse ook monsters verzameld voor de bepaling van deze zwemwaterparameters.

2.2 Filtratie

Binnen 48 uur na monstername is een volume van 100 ml van een monster, onder vacuüm, gefiltreerd over een polycarbonaat membraanfilter (Track-edge filters, Sartorius) met een porie-grootte van 0,2 µm en een doorsnede van 4,5 cm. In één geval (Andijk Zwemstrand, 23 juli 2019) is er 50 ml van het veldmonster gefiltreerd (vanwege de hoeveelheid zwevend materiaal). Bij elke monsternameronde is tevens een blanco filter (DNA vrij water) geprepareerd. Na het filtreren van het monster is dit nog gespoeld met 10 ml van een 0,5 M ammonium-oxalaat oplossing om ijzer te onttrekken uit ijzerhoudende monsters. Dit verbetert het rendement van de DNA extractie van dergelijke monsters aanzienlijk. Na filtratie met ammonium-oxalaat zijn de filters nagespoeld met 20-30 ml PBS oplossing (1 tablet in 500 ml, Gibco – Life Technologies) om restanten ammonium-oxalaat te verwijderen en de pH te neutraliseren.

Gedurende de monsternamecampagne zijn de filters ingevroren totdat de verdere DNA analyses plaatsvonden. Uit de, per zwemwaterlocatie, beschikbare watermonsters zijn er steeds drie gekozen voor de DNA analyse. Deze keuze is, in overleg met RWS-WVL, met name bepaald door de resultaten voor zowel *E. coli* als de intestinale enterococcen zoals die gedurende het zwemseizoen verkregen werden met de MPN-methode (hierna uitgedrukt als kolonievormende eenheden (kve) per 100 ml). Deze bacterie gegevens zijn door RWS-WVL aan KWR ter beschikking gesteld. Bij de selectie van de drie te analyseren monsters is steeds gekozen voor tenminste één datum met verhoogde bacteriewaarden, en één datum met lage bacteriewaarden (als referentie voor de waarden van de DNA merkers bij lage bacteriewaarden).

2.3 DNA analyse

De DNA-analyse is op te splitsen in een aantal stappen: DNA-isolatie, DNA-analyse (m.b.v. qPCR) en kwaliteitscontrole. Zowel voor de DNA-isolatie als voor de qPCR-analyses is gebruik gemaakt van KWR-werkvoorschriften.

Voor dit onderzoek is voor de locatie Oude Pol op verzoek van RWS-WVL gebruik gemaakt van qPCR methoden gericht op de detectie van de bronnen mens, rund, paard en varken. Hier konden nog de merkers voor herkauwer, hond en vogel worden toegevoegd vanwege analyse efficiëntie in het laboratorium. Voor Badstrand Edam zijn mens, herkauwer, rund en vogel gebruikt, en kon de merker hond als extra worden toegevoegd. Voor Andijk zwemstrand en Woldstrand ging het om mens, herkauwer, hond en vogel. Voor deze beide locaties is de merker rund als extra toegevoegd, opnieuw vanwege analyse efficiëntie.

Voor het bepalen van het voorkomen van DNA indicatief voor bronnen afkomstig van mens, herkauwer, rund, varken en paard is gebruik gemaakt van groepspecifieke bacteriën uit de bacteriegroep *Bacteroides*. Voor het

identificeren van de aanwezigheid van fecale verontreinigingen van vogels is gebruik gemaakt van de, veelvuldig in vogel uitwerpselen voorkomende, *Helicobacter* bacterie. Voor het aantonen van verontreinigingen van honden is een methode gebruikt die zich richt op DNA uit hondencellen in plaats van fecaal gerelateerd bacterie materiaal. Fecaliën van honden bevatten veel van dergelijke cellen afkomstig van de darmwand. De resultaten worden hierna weergegeven op een loglineaire schaal als DNA-kopieën/l.

De kwaliteitscontrole bevat drie onderdelen:

- In de analyse wordt gebruik gemaakt van een interne controle zodat zicht ontstaat op het rendement van de DNA-extractie en het verloop de qPCR-analyse.
- De analyse van een blanco monster om inzicht te krijgen in het eventueel optreden van contaminaties.
- Een controle van de juistheid van alle gerapporteerde uitkomsten door een collega-laborant.

3 Resultaten en discussie

3.1 De opbrengst van de inhibitie en rendementscontrole

Om te bepalen of alle oppervlaktewatermonsters geschikt waren voor qPCR-analyses is de opbrengst van de interne controle (IC) bepaald in elk monster. Door het toevoegen van een bekende hoeveelheid IC is, aan de hand van de hoeveelheid DNA die men na DNA extractie en analyse terug meet, berekend hoe goed de extracties verlopen zijn: het rendement. Het rendement wordt uitgedrukt als percentage van de bekende hoeveelheid DNA die aan de monsters toegevoegd is. Dit rendement wordt gebruikt om de gevonden hoeveelheden van het target DNA te corrigeren. Rendementen kunnen negatief beïnvloed worden door de aanwezigheid van stoffen die extractie of de PCR reactie verstoren, dat noemen we remming van de PCR analyse.

De rendementen van de DNA-extracties bleken voor alle geanalyseerde monsters + de blanco's goed (rendement van 31% of hoger). Deze uitkomst geeft aan dat de watermonsters afkomstig van deze zwemwaterlocaties zich goed lieten behandelen.

3.2 Resultaten DNA analyse en kweek

3.2.1 Oude Pol extra meetpunt B Bijsselsebeek

In onderstaande Tabel 1 zijn de DNA concentraties van de onderzochte bronnen van fecale herkomst aangegeven voor locatie Oude Pol. Van de veldmonsters is het monster van 16 september positief, en wel voor DNA afkomstig van hond en mens- of vogel-specifieke fecale bacteriën.

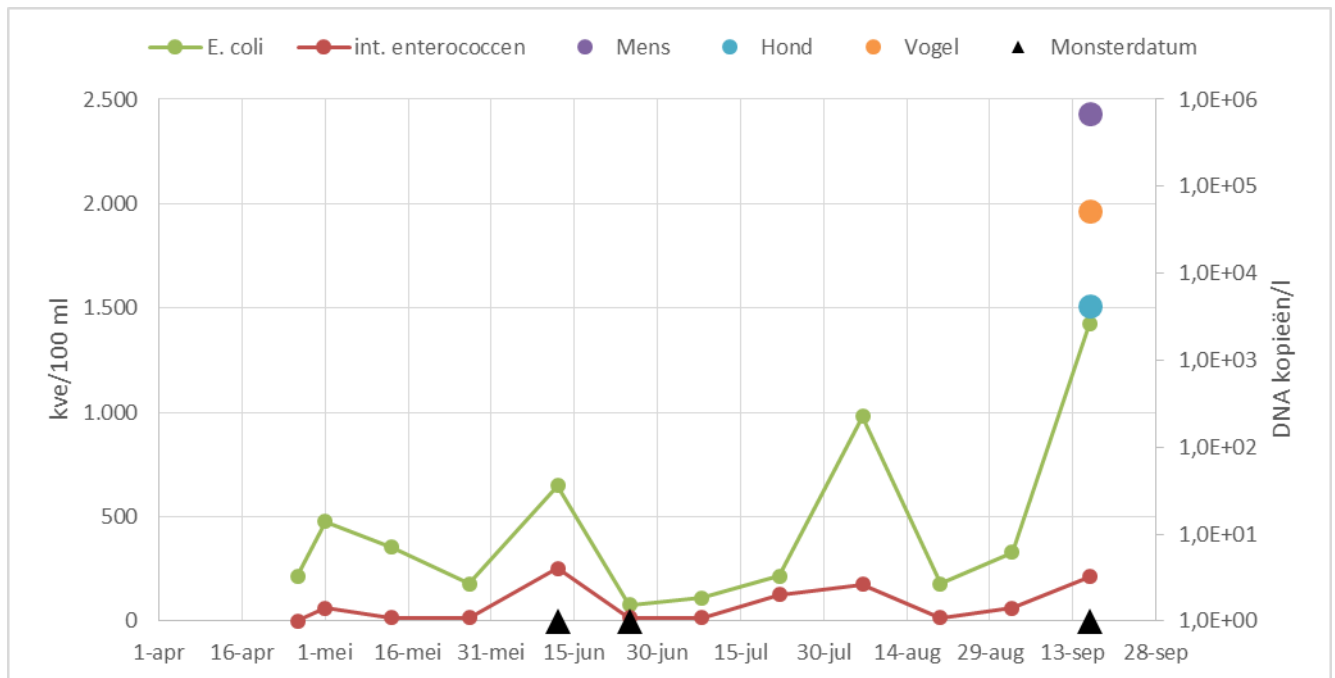
In Figuur 1 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococcon gedurende het zwemseizoen 2019 in de Oude Pol. Ook de resultaten voor de op de drie geanalyseerde datums vastgestelde DNA waarden voor de fecale merkers voor hond en vogels worden hier weergegeven. Conform de Europese zwemwaterrichtlijn is voor de zwemwaterkwaliteitsklasse 'goed' de bovengrenswaarde voor *E. coli* 1000 kve/100 ml, voor intestinale enterococcon is dit 400 kve/100 ml. In Nederland wordt de grens van 1800 kolonievormende eenheden (kve)/100 ml met betrekking tot *E. coli* aangehouden als signaalwaarde voor overschrijding van het acute risico (Stuurgroep Water, 2013). Voor intestinale enterococcon ligt die grens bij 400 kve /100 ml. Uit de dataset met bacterie gegevens zoals die ontvangen is van RWS-WVL blijkt dat in 2019 de signaalwaarden niet zijn overschreden. De waarden voor *E. coli* en intestinale enterococcon zijn beide

Tabel 1. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor de drie onderzochte veldmonsters uit de Oude Pol, extra meetpunt B Bijsselsebeek en bijbehorende blanco's. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens.

monster code	datum monster	omschrijving	rendement (%)	DNA kopieën/l			
				mens	herkauwer	hond	rund
LMB-83333-OW	12-jun	De oude Pol extra meetpt B	37,1	<2,7E+03	<2,7E+03	<2,7E+03	<2,7E+03
LMB-83329-UW		Blanco	36,9	<2,7E+03	<2,7E+03	<2,7E+03	<2,7E+03
LMB-83338-OW	25-jun	De oude Pol extra meetpt B	49,8	<2,0E+03	<2,0E+03	<2,0E+03	<2,0E+03
LMB-83334-UW		Blanco	31,7	<3,2E+03	<3,2E+03	<3,2E+03	<3,2E+03
LMB-83368-OW	16-sep	De oude Pol extra meetpt B	45,6	7,0E+05	<2,2E+03	4,2E+03	<2,2E+03
LMB-83364-UW		Blanco	35,9	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03

Tabel 1. Vervolg. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor de drie onderzochte veldmonsters uit de Oude Pol, extra meetpunt B Bijsselsebeek en bijbehorende blanco's. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens.

monster code	datum monster	omschrijving	rendement (%)	DNA kopieën/l		
				paard	vogel	varken
LMB-83333-OW	12 juni	De oude Pol extra meetpt B	37,1	<2,7E+03	<1,3E+04	<1,3E+04
LMB-83329-UW		Blanco	36,9	<2,7E+03	<1,4E+04	<1,4E+04
LMB-83338-OW	25 juni	De oude Pol extra meetpt B	49,8	<2,0E+03	<1,0E+04	<1,0E+04
LMB-83334-UW		Blanco	31,7	<3,2E+03	<1,6E+04	<1,6E+04
LMB-83368-OW	16 sept	De oude Pol extra meetpt B	45,6	<2,2E+03	5,3E+04	<1,1E+04
LMB-83364-UW		Blanco	35,9	<2,8E+03	<1,4E+04	<1,4E+04



Figuur 1. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococcen in de Oude Pol, extra meetpunt B Bijsselsebeek in 2019 en de op drie momenten vastgestelde DNA-resultaten van potentiële fecale bronnen. *E. coli* en intestinale enterococcen zijn uitgedrukt in een lineaire schaal in kve (kolonievormende eenheden) per 100 ml; de DNA-merkers zijn uitgedrukt op een loglineaire schaal in DNA-kopie aantallen / l. De drie datums met DNA analyses zijn weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as.

enigszins verhoogd op 1 mei en 12 juni; met name *E. coli* wat meer op 6 augustus en vooral op 16 september. Op de referentie datum van 25 juni met lage bacteriewaarden blijkt er ook geen achtergrond niveau van DNA merkers te worden gedetecteerd. De vastgestelde DNA merkers mens, hond en vogel corresponderen op 16 september met de dan verhoogde waarden voor met name *E. coli* (het monster voldoet op deze datum niet aan de kwaliteitsklasse 'goed'). Deze drie fecale bronnen kunnen dan ook worden geïdentificeerd als de mogelijke oorzaken voor de gemeten bacteriewaarden. Op 12 juni worden geen merkers gedetecteerd. De dan wel wat verhoogde bacteriewaarden liggen echter ook nog steeds ruim binnen de kwaliteitsklasse 'goed'. Bij deze relatief lage bacteriewaarden worden fecale merkers wel vaker niet aangetroffen. Niet alle in oppervlaktewater voorkomende enterococcen blijken overigens van intestinale herkomst (Wubbels et al., 2014). Het zou dus (deels) ook kunnen gaan om een populatie van natuurlijke enterococcen, die met de gebruikte bacterie analyse mogelijk niet wordt onderscheiden van intestinale enterococcen. Alleen de laatste kunnen fungeren als indicatoren voor de mogelijke aanwezigheid van pathogene organismen van fecale herkomst.

Bij eerder onderzoek met DNA merkers werden voor dezelfde locatie eveneens mens, hond en vogel als bron aangewezen; in 2015 en 2016 kwam ook herkauwer voor (zie Tabel 2; Kardinaal & Heijnen, 2014; Kardinaal, 2015, 2016). Het beeld is over de jaren niet constant. In 2019 kan er geen voornaamste bron worden aangeduid.

Tabel 2. Overzicht van de bronnen zoals gemeten in de periode 2014 t/m 2016 en 2019 op locatie Oude Pol extra meetpunt Bijsselse beek. De **vetgedrukte** tekst in de kolommen geeft aan welke bron in een meetjaar als voornaamste aangemerkt is.

omschrijving	Aangetoonde fecale verontreinigingsbronnen			
	2014	2015	2016	2019
De oude Pol extra meetpt B	mens	vogel, mens, herkauwer, hond	mens, herkauwer, vogel	mens, hond, vogel

3.2.2 Badstrand Edam

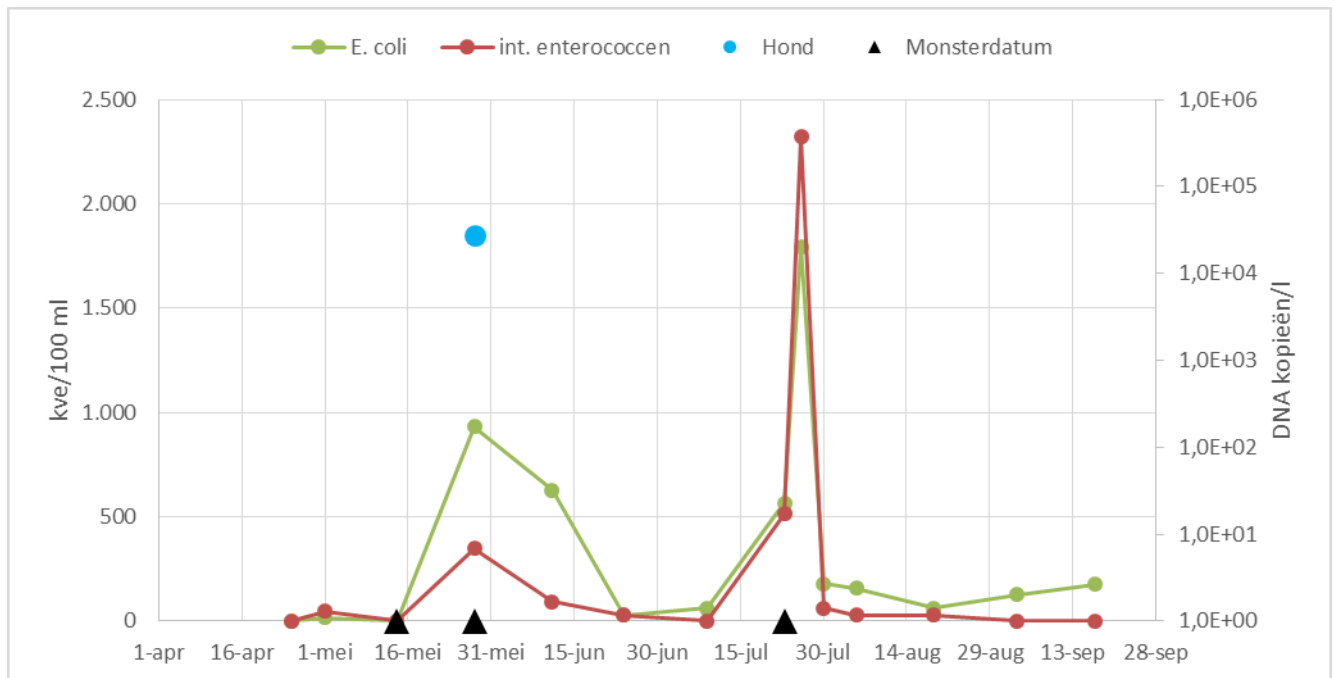
In onderstaande Tabel 3 zijn de DNA concentraties van de onderzochte bronnen van fecale herkomst aangegeven voor locatie Badstrand Edam. Van de veldmonsters is het monster van 28 mei positief, en wel voor DNA afkomstig van hond.

Tabel 3. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor de drie onderzochte veldmonsters uit Badstrand Edam en bijbehorende blanco's. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens.

monster code	datum monster	omschrijving	rendement (%)	mens	herkauwer	hond	rund	vogel
				DNA kopieën/l				
LMB-83320-OW	14 mei	Badstrand Edam	45,4	<2,2E+03	<2,2E+03	<2,2E+03	<2,2E+03	<1,1E+04
LMB-83319-UW		Blanco	39,3	<2,5E+03	<2,5E+03	<2,5E+03	<2,5E+03	<1,3E+04
LMB-83325-OW	28 mei	Badstrand Edam	46,0	<2,2E+03	<2,2E+03	2,7E+04	<2,2E+03	<1,1E+04
LMB-83324-UW		Blanco	30,7	<3,3E+03	<3,3E+03	<3,3E+03	<3,3E+03	<1,6E+04
LMB-83345-OW	23 juli	Badstrand Edam	53,1	<1,9E+03	<1,9E+03	<1,9E+03	<1,9E+03	<9,4E+03
LMB-83344-UW		Blanco	36,2	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<1,4E+04

In Figuur 2 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococci gedurende het zwemseizoen 2019 in Badstrand Edam. Ook de resultaten voor de op de drie geanalyseerde datums vastgestelde DNA waarden voor de fecale merkers voor hond en vogels worden hier weergegeven. Uit de dataset met bacterie gegevens zoals die ontvangen is van RWS-WVL blijkt dat in 2019 op 23 juli de signaalwaarde voor *E. coli* werd overschreden. De signaalwaarde voor intestinale enterococci werd overschreden op 23 en 26 juli. Van die laatste datum is helaas geen monster voor DNA analyse genomen. Op 28 mei en 11 juni zijn de waarden voor *E. coli* ook verhoogd. De enterococci vertonen op 28 mei ook een verhoogde waarde.

Op de referentie datum van 14 mei met lage bacteriewaarden blijkt er ook geen achtergrond niveau van DNA merkers te worden gedetecteerd. De vastgestelde DNA merker hond correspondeert op 28 mei met de dan verhoogde bacteriewaarden. Deze bron kan dan ook worden geïdentificeerd als de mogelijke oorzaak voor de gemeten bacteriewaarden. Op 23 juli worden geen merkers gedetecteerd, terwijl er dan wel verhoogde bacteriewaarden zijn. Het rendement van de IC is op deze datum heel goed, wat er op wijst dat er geen duidelijke remming van DNA extractie of replicatie kan zijn opgetreden. De bacteriewaarden voor *E. coli* liggen echter nog



Figuur 2. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci in Badstrand Edam in 2019 en de op drie momenten vastgestelde DNA-resultaten van potentiële fecale bronnen. *E. coli* en intestinale enterococci zijn uitgedrukt in een lineaire schaal in kve (kolonievormende eenheden) per 100 ml; de DNA-merkers zijn uitgedrukt op een loglineaire schaal in DNA-kopie aantallen /l. De drie datums met DNA analyses zijn weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as.

steeds ruim binnen de kwaliteitsklasse 'goed'. Bij deze relatief lage bacteriewaarden worden fecale merkers wel vaker niet aangetroffen. En net als hierboven besproken bij de Oude Pol, kan voor de enterococci nog gelden dat deze van natuurlijke herkomst zijn, en dus geen fecale oorsprong hebben.

Bij eerder onderzoek met DNA merkers werden voor dezelfde locatie naast hond ook nog mens, herkauwers en vogels als bron aangewezen (zie Tabel 4; Kardinaal, 2016, 2017, 2018). Het beeld is over de jaren niet constant.

Tabel 4. Overzicht van de bronnen zoals gemeten in de periode 2016 t/m 2019 op locatie Badstrand Edam. De **vetgedrukte tekst** in de kolommen geeft aan welke bron in een meetjaar als voornaamste aangemerkt is.

omschrijving	Aangetoonde fecale verontreinigingsbronnen			
	2016	2017	2018	2019
Badstrand Edam	mens , hond, vogel	mens , herkauwer	vogel , herkauwer, hond, mens	hond

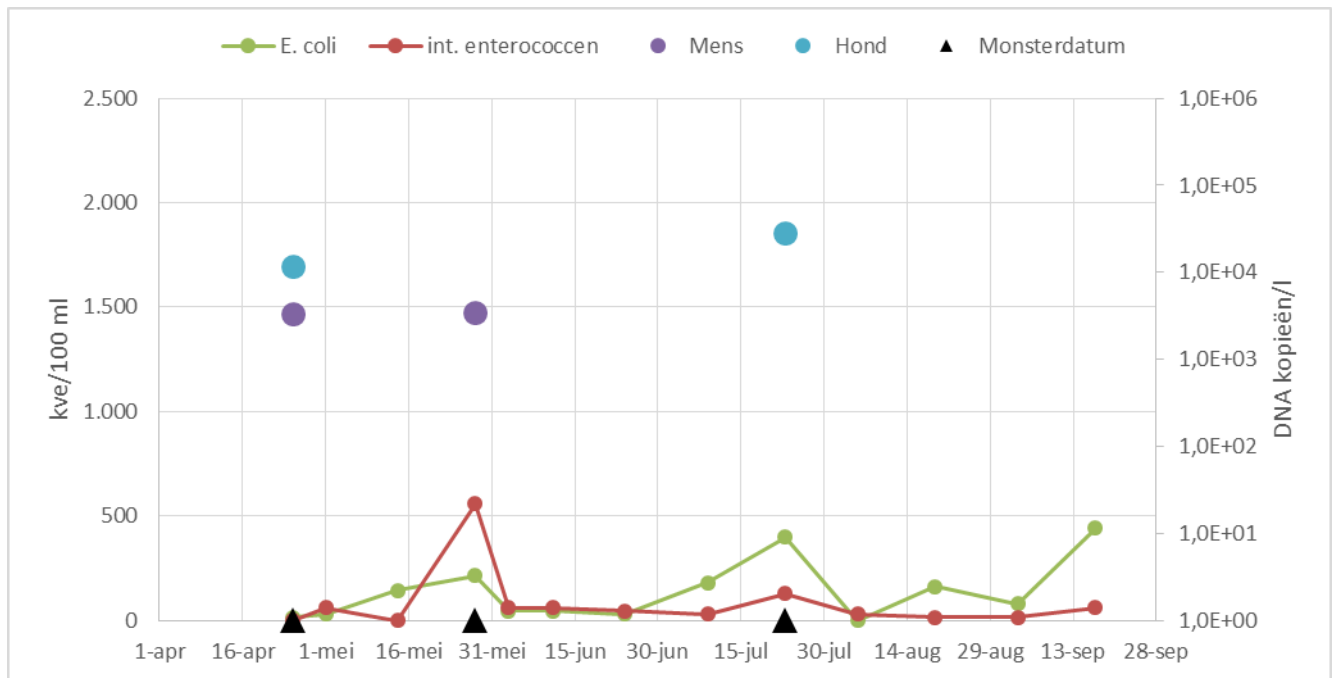
3.2.3 Andijk Zwemstrand

In onderstaande Tabel 5 zijn de DNA concentraties van de onderzochte bronnen van fecale herkomst aangegeven voor locatie Andijk Zwemstrand. Van de veldmonsters is het monster van 25 april positief voor DNA afkomstig van mens en hond. Op 28 mei is de merker voor mens gevonden, en op 23 juli weer de merker voor hond.

Tabel 5. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor de drie onderzochte veldmonsters uit Andijk Zwemstrand en bijbehorende blanco's. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens.

monster code	datum monster	omschrijving	rendement (%)	mens	herkauwer	DNA kopieën/l		
						hond	rund	vogel
LMB-83311-OW	25 april	Andijk Zwemstrand	37,0	3,4E+03	<2,7E+03	1,2E+04	<2,7E+03	<1,4E+04
LMB-83309-UW		Blanco	33,8	<3,0E+03	<3,0E+03	<3,0E+03	<3,0E+03	<1,5E+04
LMB-83326-OW	28 mei	Andijk Zwemstrand	36,0	3,5E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<1,4E+04
LMB-83324-UW		Blanco	30,7	<3,3E+03	<3,3E+03	<3,3E+03	<3,3E+03	<1,6E+04
LMB-83346-OW	23 juli	Andijk Zwemstrand	46,1	<2,2E+03	<2,2E+03	2,9E+04	<2,2E+03	<1,1E+04
LMB-83344-UW		Blanco	36,2	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<1,4E+04

In Figuur 3 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococci gedurende het zwemseizoen 2019 in Andijk Zwemstrand. Ook de resultaten voor de op de drie geanalyseerde datums vastgestelde DNA waarden voor de fecale merkers voor hond en vogels worden hier weergegeven. Uit de dataset met bacterie gegevens zoals die ontvangen is van RWS-WVL blijkt dat in 2019 op 28 mei de signaalwaarde voor intestinale enterococci werd overschreden. De enterococci vertonen op 23 juli ook een wat verhoogde waarde. Op 28 mei, 23 juli en 17 september zijn de waarden voor *E. coli* licht verhoogd. Alle waarden voor *E. coli* vallen nog ruim binnen de kwaliteitsklasse 'goed'.



Figuur 3. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci in Andijk Zwemstrand in 2019 en de op drie momenten vastgestelde DNA-resultaten van potentiële fecale bronnen. *E. coli* en intestinale enterococci zijn uitgedrukt in een lineaire schaal in kve (kolonievormende eenheden) per 100 ml; de DNA-merkers zijn uitgedrukt op een loglineaire schaal in DNA-kopie aantallen / l. De drie datums met DNA analyses zijn weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as.

Op de referentie datum van 25 april met lage bacteriewaarden wordt er een achtergrond niveau van de DNA merkers mens en hond gedetecteerd. De waarde voor de DNA merker voor mens is van dezelfde orde van grootte als deze waarde op 28 mei. De merker hond is op 23 juli licht verhoogd ten opzichte van 25 april. Op grond van deze resultaten kan er geen duidelijke fecale bron worden aangewezen voor de verhoogde bacteriewaarden op 28 mei. De verdenking gaat op 23 juli wel uit naar honden, gezien de verhoogde waarde van de merker ten opzichte van 25 april. Het rendement van de IC is op alle meetdatums heel goed, wat er op wijst dat er geen duidelijke remming van DNA extractie of replicatie kan zijn opgetreden. Wellicht zijn in 2019 ook nog andere bronnen, zoals paarden, van belang geweest. Bij eerder onderzoek met DNA merkers werden voor dezelfde locatie mens en vogels als voornaamste bron aangewezen (Kardinaal & Heijnen, 2014).

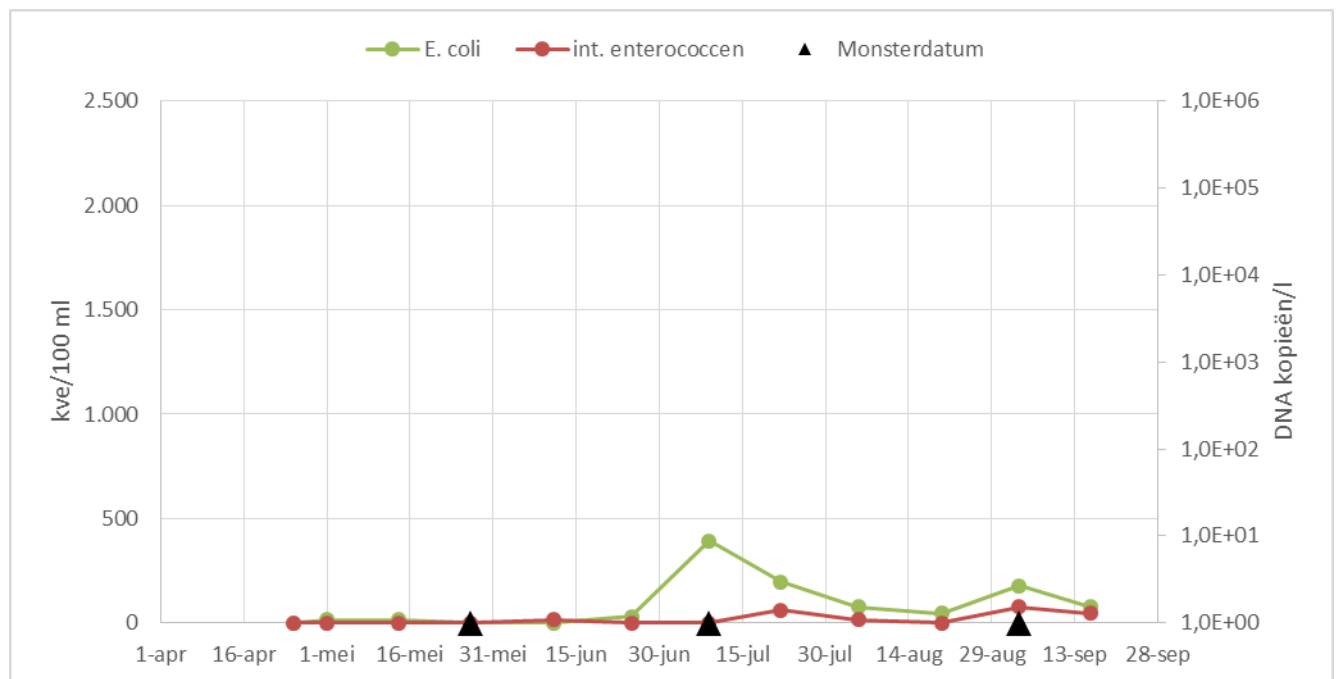
3.2.4 Woldstrand

In onderstaande Tabel 6 zijn de DNA concentraties van de onderzochte bronnen van fecale herkomst aangegeven voor locatie Woldstrand. In alle veldmonsters bleken de DNA merkers beneden de detectielimiet te liggen. Het rendement van de IC is op alle meetdatums heel goed, wat er op wijst dat er geen duidelijke remming van DNA extractie of replicatie kan zijn opgetreden.

Tabel 6. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor de drie onderzochte veldmonsters uit Woldstrand en bijbehorende blanco's. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens.

monster code	datum monster	omschrijving	rendement (%)	DNA kopieën/l				
				mens	herkauwer	hond	rund	vogel
LMB-83327-OW	27 mei	Woldstrand	34,0	<2,9E+03	<2,9E+03	<2,9E+03	<2,9E+03	<1,5E+04
LMB-83324-UW		Blanco	30,7	<3,3E+03	<3,3E+03	<3,3E+03	<3,3E+03	<1,6E+04
LMB-83342-OW	9 juli	Woldstrand	35,7	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<1,4E+04
LMB-83339-UW		Blanco	37,5	<2,7E+03	<2,7E+03	<2,7E+03	<2,7E+03	<1,3E+04
LMB-83362-OW	3 sept	Woldstrand	41,0	<2,4E+03	<2,4E+03	<2,4E+03	<2,4E+03	<1,2E+04
LMB-83359-UW		Blanco	39,5	<2,5E+03	<2,5E+03	<2,5E+03	<2,5E+03	<1,3E+04

In Figuur 4 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococci gedurende het zwemseizoen 2019 in Woldstrand. De drie monsterdatums voor de DNA bepalingen waarden zijn ook aangegeven. Uit de dataset met bacterie gegevens zoals die ontvangen is van RWS-WVL blijkt dat er in 2019 geen signaalwaarden voor *E. coli* of intestinale enterococci werden overschreden. Op 9 juli en 3 september zijn de waarden voor *E. coli* wat verhoogd. De enterococci vertonen op 22 juli en op 3 en 16 september een licht verhoogde waarde. In alle gevallen is de kwaliteitsklasse 'goed'. Er kan op grond van deze resultaten geen duidelijke fecale bron worden aangewezen.



Figuur 4. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci in Woldstrand in 2019 en de op drie momenten vastgestelde DNA-resultaten van potentiële fecale bronnen. *E. coli* en intestinale enterococci zijn uitgedrukt in een lineaire schaal in kve (kolonievormende eenheden) per 100 ml; de DNA-merkers zijn uitgedrukt op een loglineaire schaal in DNA-kopie aantallen /l. De drie datums met DNA analyses zijn weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as.

4 Conclusies

De DNA-analyses zijn naar behoren verlopen, zonder enige indicatie van remming die van invloed zou kunnen zijn op de betrouwbaarheid van de hier gerapporteerde resultaten. Voor de Oude Pol kunnen de bronnen mens, hond en vogel worden geïdentificeerd als de meest waarschijnlijke oorzaken voor de gemeten bacteriewaarden op 16 september. Bij de hier op 12 juni ook wat verhoogde bacteriewaarden werden geen merkers gedetecteerd. De bacteriewaarden liggen dan echter ook nog steeds ruim binnen de kwaliteitsklasse 'goed'. Bij deze relatief lage bacteriewaarden worden fecale merkers wel vaker niet aangetroffen. Bij eerder onderzoek met DNA merkers werden voor dezelfde locatie eveneens mens, hond en vogel als bron aangewezen; in 2015 en 2016 kwam ook herkauwer voor. Het beeld is over de jaren niet constant, maar mens wordt als bron wel steeds gevonden. Voor Badstrand Edam kunnen honden worden geïdentificeerd als de meest waarschijnlijke oorzaak voor de op 28 mei gemeten bacteriewaarden. Op 23 juli worden geen merkers gedetecteerd, terwijl er dan wel verhoogde bacteriewaarden zijn. De bacteriewaarden voor *E. coli* liggen dan nog steeds ruim binnen de kwaliteitsklasse 'goed'. Voor zowel de Oude Pol als voor Badstrand Edam kan voor de enterococci gelden dat deze (deels) van natuurlijke herkomst zijn, en dus geen fecale oorsprong hebben. Bij eerder onderzoek met DNA merkers werden voor Badstrand Edam naast hond ook nog mens, herkauwers en vogels als bron aangewezen. Het beeld is over de jaren niet constant. Voor Andijk Zwemstrand kan geen duidelijke fecale bron worden aangewezen voor de verhoogde bacteriewaarden op 28 mei. De verdenking gaat op 23 juli wel uit naar honden, gezien de verhoogde waarde van de merker hond ten opzichte van de waarde van deze merker op de referentie datum 25 april met lage bacteriewaarden. Voor Woldstrand werden geen fecale merkers vastgesteld. Er kan op grond van deze resultaten voor Woldstrand in 2019 geen duidelijke fecale bron worden aangewezen, en in alle gevallen is de kwaliteitsklasse hier ook 'goed'.

5 Referenties

- Heijnen, L., & Learbuch, K. (2013). Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen BTO rapport 2013.014.
- Heijnen, L., Learbuch, K., Kardinaal, E., Rotteveel, S., Ruiten, H., & Leenen, I. (2014). Fecale verontreiniging in zwemwater identificeren met DNA-merkers. H2O April 2014.
- Kardinaal, E., & Heijnen, L. (2014). Bronopsporen fecale verontreiniging in zwemwater 2014. Rapport KWR 2014.098.
- Kardinaal, E., (2015). Bronopsporen fecale verontreiniging in zwemwater 2015. Rapport KWR 2015.079.
- Kardinaal, E., (2016). Bronopsporen fecale verontreiniging in zwemwater 2016. Rapport KWR 2016.118.
- Kardinaal, E., (2017). Bronopsporen fecale verontreiniging in zwemwater 2017. Rapport KWR 2017.077.
- Kardinaal, E., (2018). Bronopsporen fecale verontreiniging in Rijkswateren 2018. Rapport KWR 2018.129.
- Stuurgroep Water (2013). Beslisnotitie werkwijze individuele metingen en meetfrequentie microbiologische parameters zwemwaterrichtlijn, vastgesteld op 14 maart 2013.
- Wubbels, G. , Veenendaal, G., Schaap, M., Lijzenga, T. & A. Douma. (2015). Snelle analyse van fecale verontreiniging in drinkwater. H2O-Online (2 januari 2015).

Jaar van publicatie
2019

Meer informatie
dr.ir. Michiel Hootsmans
T 0622951843
E michiel.hootsmans@kwrwater.nl

Keywords

fecale verontreiniging, DNA bronopsporing,
zwemwater

Groninghaven 7
Postbus 1072
3430 BB Nieuwegein

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl

2019.104 | 9 december 2019 ©KWR

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevens bestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.