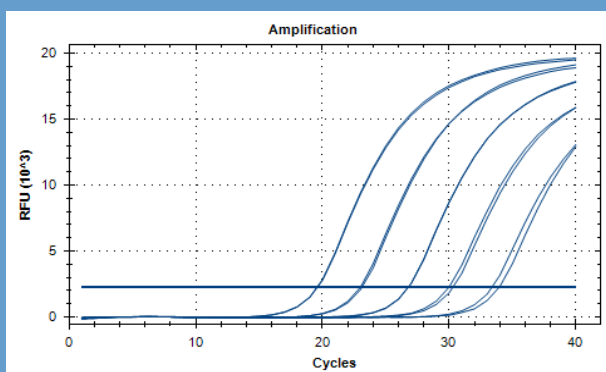


KWR 2015.036 | April 2015

Identificeren van de bron van fecale besmettingen

Verkenning van de mogelijkheden van nieuwe methoden voor het achterhalen van bron van fecale besmettingen.



Identificeren van de bron van fecale besmettingen

Verkenning van de mogelijkheden van nieuwe methoden voor het achterhalen van bron van fecale besmettingen.

KWR 2015.036 | April 2015

Opdrachtnummer

400607/001

Projectmanager

Edwin Kardinaal

Opdrachtgever

DPW

Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

Auteur(s)

Leo Heijnen

Verzonden aan

Jaar van publicatie
2015

Meer informatie

Leo Heijnen
T 030-6069743
E leo.heijnen@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

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



KWR 2015.036 | April 2015 © KWR

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

Samenvatting

In het grondwater in de waterwingebieden van de DPW bedrijven worden incidenteel aanwijzingen gevonden voor de aanwezigheid van fecale besmettingen. In de meeste gevallen is daarbij niet duidelijk wat de bron van besmetting is. Het kennen van mogelijke bron(nen) van deze besmettingen (recreanten, grazers of andere diersoorten) geeft beter inzicht in de mogelijke risico's en is van belang om gerichte maatregelen te kunnen nemen. Binnen het BTO programma zijn diverse qPCR-methoden ontwikkeld (1) waarmee het DNA van diergroep-specifieke fecale bacteriën (specifiek voor: mensen, herkauwers, runderen of vogels) of het DNA van de diergroep (honden) kan worden gekwantificeerd. Met deze methoden is het mogelijk om inzicht te krijgen in de bron van fecale besmettingen (source-tracking).

Om beter inzicht te krijgen in de toepassingsmogelijkheden van deze nieuwe methoden en in de relevante besmettingsbronnen van water van verschillende locaties van de DPW bedrijven zijn de methoden toegepast op 77 monsters afkomstig van 33 verschillende locaties. Uit de analyse van watermonsters, afkomstig van locaties waar fecale verontreinigingen te verwachten zijn (open water), blijkt dat de DNA-merkers die in het water van de verschillende locaties worden aangetoond vrijwel altijd overeen komen met de verwachting. Dit geeft aan dat de toegepaste DNA-merkers inzicht geven in de bron van fecale verontreinigingen. In watermonsters afkomstig van locaties waar geen fecale verontreinigingen te verwachten zijn maar waar incidenteel wel fecale verontreinigingen worden aangetoond (*E. coli* en enterococci in grote volumes) worden geen duidelijke aanwijzingen gevonden voor de aanwezigheid van DNA-merkers van de diergroep-specifieke fecale bacteriën. Dit kan betekenen dat de *E. coli*'s en/of enterococci die in deze situaties worden gedetecteerd afkomstig zijn van dieren waarvoor (nog) geen DNA-merker beschikbaar is (zoals konijnen, knaagdieren of misschien insecten?). Het is ook mogelijk dat de gevoeligheid van de toegepaste qPCR methoden niet voldoende is om merkers te detecteren en dat toepassing van de source-tracking methoden op grote volumes beter inzicht zal geven in de relevante besmettingsbronnen op deze locaties. De afwezigheid van diergroep-specifieke merkers sluit niet uit dat de *E. coli* en enterococci die worden aangetoond in de groot volume monsters niet afkomstig zijn van fecale verontreinigingen. Wel wijst de afwezigheid van deze merkers er op dat op de onderzochte locaties geen (recente) fecale besmetting van de onderzochte diergroepen is opgetreden. Mogelijk dat er op deze locaties milieuomstandigheden heersen waarin deze indicatorbacteriën zich in kunnen handhaven.

Dit onderzoek maakt duidelijk dat de toegepaste source-tracking methoden inzicht kunnen geven in de herkomst van fecale besmettingen. Maar, aanvullend onderzoek is nodig om inzicht te krijgen in de oorzaak van de incidentele aanwezigheid van fecale indicatororganismen (*E. coli* en/of enterococci) in water afkomstig van locaties waarin de aanwezigheid van fecale verontreinigingen niet te verwachten zijn.

Inhoud

Samenvatting	2
Inhoud	3
Voorwoord	4
1 Inleiding	5
2 Materiaal en methoden	6
2.1 Selectie van locaties voor monsternamen	6
2.2 Monsternamen	6
2.3 Kwantificatie van kweekbare <i>E. coli</i> en enterococci	6
2.4 DNA-extracties	6
2.5 Meting van het rendement van de DNA-extracties	6
2.6 qPCR analyses	7
2.7 Onderzoek van grote volumes water met qPCR	7
3 Resultaten en discussie	8
3.1 Metingen bij locaties van Waternet	8
3.2 Metingen bij locaties van PWN	10
3.3 Metingen bij locaties van Dunea	14
3.4 Integriteit van de merker voor verontreinigingen van vogels	16
4 Conclusies en aanbevelingen	19
5 Literatuur	21

Voorwoord

In dit rapport zijn de resultaten beschreven van het onderzoek naar de toepassingsmogelijkheden van DNA-merkers voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen. Dit onderzoek is uitgevoerd onder begeleiding van en in samenwerking met een contactgroep met hierin specialisten van de betrokken waterbedrijven: Ed van der Mark (Dunea), Jan Soons en later Bernadette Lohman (PWN), Yolanda Dullemont (Waternet) en Eric Penders van HWL.

1 Inleiding

In het grondwater in de waterwingebieden van de DPW bedrijven worden, met het aantonen van *E. coli* en enterococci, incidenteel aanwijzingen gevonden voor de aanwezigheid van fecale besmettingen. Deze besmettingen zijn mogelijk het gevolg van uitspoeling van fecaal materiaal van het maaiveld naar kwetsbare winputten. Bij het risicomanagement in dergelijke gebieden is het kennen van mogelijke bronnen van deze besmettingen (recreanten, grazers of andere diersoorten; “source-tracking”) van belang. Deze kennis maakt het mogelijk om gerichte maatregelen te nemen en geeft beter inzicht in de mogelijke risico's.

Door genetische en morfologische verschillen tussen zoogdiersoorten en variaties in het voedselpatroon is de samenstelling van de microbiologische darmflora zeer verschillend. Hierdoor bevat de darmflora van mensen, zoogdiersoorten en vogels verschillende DNA-merkers voor specifieke darmbacteriën (o.a. verschillende bacteroides merkers). Deze merkers kunnen relatief eenvoudig worden aangetoond en gekwantificeerd door toepassing van kwantitatieve PCR (qPCR). In 2012 en 2013 is uitgebreid onderzoek gedaan binnen het BTO programma (1) naar de ontwikkeling en implementatie van een aantal van deze qPCR-methoden waarmee deze diergroep-specifieke fecale merkers kunnen worden aangetoond. Met deze methoden kan fecale besmetting afkomstig van mensen, “herkauwers”, runderen en vogels worden onderscheiden. Aanvullend is er in 2013 een methode ontwikkeld voor het detecteren van fecale verontreinigingen van honden (2).

Met deze qPCR methoden is het mogelijk om direct een kenmerkend DNA-fragment (DNA-merker) te detecteren en kwantificeren zonder dat daarvoor een kweekstap nodig is. Er is aangetoond dat de concentraties van deze diergroep-specifieke merkers (voor fecale verontreinigingen van runderen, herkauwers en mensen maar niet voor vogels) in fecaal materiaal aanmerkelijk hoger zijn dan de concentratie DNA-merkers voor de traditionele indicatororganismen *E. coli* en enterococci (2). Daarnaast is aangetoond dat de DNA-merkers in water langer stabiel zijn dan kweekbare indicator bacteriën *E. coli* en enterococci (2). Hierdoor is te verwachten dat, met het toepassen van DNA-merkers, het mogelijk is om zeer lage concentraties fecale verontreinigingen te detecteren, waarschijnlijk lager dan met de traditionele indicatorbacteriën mogelijk is.

De methoden bleken toepasbaar voor het identificeren van de belangrijkste besmettingsbron(nen) bij zwemwaterlocaties die beheerd worden door Rijkswaterstaat (3, 4) en forensische watermonsters (in opdracht van Nederlands Forensisch Instituut). Een belangrijke vraag is dan ook in hoeverre de methoden geschikt zijn om toe te passen in onderzoek naar fecale verontreinigingen die een bedreiging kunnen vormen voor de productie van veilig drinkwater in kwetsbare waterwingebieden.

Het toepassen van deze “source tracking” methode op grond- en oppervlaktewatermonsters afkomstig uit de waterwingebieden van de DPW bedrijven met en zonder indicatie van een verontreiniging, geeft inzicht in toepassingsmogelijkheden van deze methoden en geeft informatie over de eventuele aanwezigheid en herkomst van lage concentraties fecale verontreinigingen.

2 Materiaal en methoden

2.1 Selectie van locaties voor monstername

De selectie van locaties voor het verzamelen van monsters t.b.v. dit onderzoek zijn, per bedrijf, gedaan door de leden van de contactgroep: Ed van der Mark (Dunea), Jan Soons en later Bernadette Lohman (PWN) en Yolanda Dullemont (Waternet). De criteria voor het selecteren van locaties waren:

- Locaties met fecaal besmet water waarvan de bron van de besmetting duidelijk is.
- Locaties waar fecale besmettingen (sporadisch) voorkomen maar waarvan de bron onduidelijk is.
- Ad-Hoc monsters van locaties waar (onverwacht) fecale besmettingen worden aangetroffen waarvan de bron onduidelijk is.

2.2 Monstername

Het verzamelen van de watermonsters is uitgevoerd door HWL (coördinatie door Sandra Strating en Eric Penders) en de monsters zijn vervolgens, volgens standaard gecertificeerde methoden, verzameld door de monsternemers van HWL en getransporteerd naar KWR.

2.3 Kwantificatie van kweekbare *E. coli* en enterococcen

De standaardmethoden voor kwantificatie van *E. coli* (gelijkwaardig aan NEN-EN-ISO 9308-1 (2008)) en enterococcen (NEN-EN-ISO 7899-2 (2000)) in watermonsters zijn toegepast door HWL.

2.4 DNA-extracties

Voor extractie van DNA uit watermonsters is eerst een volume water (maximale volume afhankelijk van de filtreerbaarheid van het water) gefiltreerd over membraanfilters (Ø 4,5 cm) van polycarbonaat ("Track-edge filters van Sartorius) met een poriegrootte van 0,2 µm. Voor isolatie van DNA is de PowerBiofilm Kit van de firma MoBio gebruikt. Eerst zijn de filters overgebracht naar bead-bead buisjes (met hierin keramische beads van verschillend formaat). Lysis buffer, met hierin een bekende hoeveelheid IC-DNA (Interne controle voor meten van opbrengst en inhibitie), is aan elk monster toegevoegd en de buisjes zijn 10 minuten bij 65°C geïncubeerd. Een bead-bead stap, waarbij de buisjes zeer krachtig worden geschud waardoor de keramische beads met grote snelheid door de vloeistof worden bewogen, zorgt in combinatie met de lysis buffer voor het openbreken van de cellen en het vrijkomen van (o.a.) het DNA. Na deze bead-bead stap zijn de buisjes ingevroren (-20°C) totdat verder gegaan werd met de zuivering van het DNA. Voor het zuiveren van het DNA is gebruik gemaakt de affiniteitszuivering met extractiekolommen van de PowerBiofilm Kit. Na een aantal "wasstappen" is het DNA uit elk monster geëluëerd in een volume van 200 µl. Voor de analyses met qPCR wordt 10 µl van het geïsoleerde DNA gebruikt (in duplo). De opbrengst van de isolatieprocedure is bepaald door meting van het IC-DNA.

2.5 Meting van het rendement van de DNA-extracties

Het rendement van de DNA-isolatie en de eventuele aanwezigheid van remmende stoffen in het DNA van de water- of fecesmonsters is bepaald door aan elk monster een interne controle (IC) toe te voegen en hiervan de opbrengst te bepalen.

Het IC-DNA bestaat uit een suspensie met een bekende hoeveelheid plasmide-DNA. Dit plasmide-DNA bevat een uniek DNA-fragment. Voor detectie van dit unieke fragment zijn primers en een probe ontworpen. Met deze primers en probe is het mogelijk om het unieke DNA-fragment te amplificeren en kwantitatief te detecteren. Door de concentratie van dit plasmide-DNA te bepalen na extractie van DNA en te vergelijken met eenzelfde hoeveelheid

plasmide-DNA dat geen extractiestap heeft ondergaan is het mogelijk om de opbrengst van de isolatie-procedure te bepalen en een indruk te krijgen van de eventuele aanwezigheid van stoffen die de PCR-reactie remmen. De, met het IC-DNA, gemeten opbrengst van de isolatie-procedure is gebruikt om de meetwaarden voor elk individueel monster te corrigeren voor verlies van DNA t.g.v. de extractiemethode. De gemiddelde efficiëntie van de extractie was voor de monsters in dit onderzoek 42,3% en varieerde van 5,0 tot 67,6%.

2.6 qPCR analyses

Bij de toegepaste qPCR methoden worden er, door toepassing van synthetische DNA moleculen (primers) specifieke DNA-merkers geamplificeerd. De, in dit onderzoek, gebruikte DNA-merkers zijn specifiek voor het DNA van fecale bacteriën van bepaalde diergroepen: mensen, "herkauwers", runderen, vogels. Een overzicht van de toegepaste primers voor de amplificatie van specifieke merkers is weergegeven in tabel 1.

Naam DNA-merker	Namen van Primers and probe	Gedetecteerd organisme	Fragment lengte (bp)	Referenties
Mensen				
HumBac	HF183F	Mensspecifieke	83	Bernhard <i>et al</i> , 2000 (5)
	HF183R	Bacteroidales		Seurinck <i>et al</i> , 2005 (6)
	Probe: SSHBac-Pr	(16S rRNA gen)		Haugland <i>et al</i> , 2010 (7) Shanks <i>et al</i> , 2010 (8)
Herkauwers				
RumBac2	BacB2-590F	Herkauwersspecifieke	99	Mieszkin <i>et al</i> , 2010 (9)
	Bac708Rm	Bacteroidales		Gourmelon <i>et al</i> , 2010 (10)
	Probe: BacB2-626P	(16S rRNA gen)		
Runderen				
CowBacM3	CowM3F	Onbekende familie van	131	Shanks <i>et al</i> , 2008 (11)
	CowM3R	rundspecifieke darmbacteriën		Shanks <i>et al</i> , 2010 (12)
	Probe: BacCowM3Pr			
Vogels				
Bird-GFD	GFD_F	Niet geclassificeerde	123	Green <i>et al</i> , 2012 (13)
	GFD_R	Helicobacter soort		
	Geen probe			
Honden				
Dog	DogFk	Mitochondriaal DNA specifiek		Caldwell <i>et al</i> . 2009 (14)
	DogRk	voor honden		en door Heijnen <i>et al</i> . (4)
	Probe: DogPr			verder ontwikkeld

Tabel 1. Overzicht van de toegepaste primers en probes.

2.7 Onderzoek van grote volumes water met qPCR

Voor het onderzoeken van grote volumes water met qPCR zijn van twee locaties watermonsters verzameld met een volume van 20 liter en getransporteerd naar KWR. De hemoflow ultrafiltratie-concentratiemethode (labprotocol microbiologisch laboratorium KWR) is gebruikt voor het terugbrengen van het volume tot ca. 500 ml. Aansluitend is membraanfiltratie (Ø 4,5 cm filter van polycarbonaat met een poriëgrootte van 0,2 µm) toegepast om de deeltjes vanuit het hemoflow concentraat verder te concentreren en is het DNA geïsoleerd van de, op het filter geconcentreerde, organismen (2.4).

3 Resultaten en discussie

3.1 Metingen bij locaties van Waternet

Watermonsters (n=25), afkomstig van negen verschillende locaties, uit de waterwinning van Waternet zijn op 3 momenten in het jaar (20 mei, 16 juni en 25 november) verzameld en geanalyseerd op de aanwezigheid en concentratie van diergroep-specifieke fecale DNA-merkers. De locaties zijn geselecteerd op basis van de fecale verontreinigingsbronnen die op deze locaties in meerdere of mindere mate te verwachten zijn. In tabel 2 wordt een korte beschrijving van de monsterlocaties en een overzicht van de mogelijke besmettingsbronnen op deze locaties gegeven.

WATERMONSTERS VAN LOCATIES WATERNET

Nummer				Datum
KWR	Locatiecode	Beschrijving Locatie	Mogelijke besmetting	Monstername
M141307	WBP-TK-001	Toevoerkanaal direct na het Bethunegemaal. Kwelwater Bethunepolder na verblijf in open watersysteem Bethunepolder.	Waarschijnlijk: Vogels en koeien Mogelijk: mensen en honden	20-5-2014
M141637				17-6-2014
M144268				24-11-2014
M141306	PLD-SF-INF002	Ruw/influent snelfiltratie Leiduin. Oppervlaktewater: mengsel van rivierwater en natuurlijk duinwater na bodempassage.	Waarschijnlijk: Vogels, herten/reeën, koeien. Mogelijk mensen	20-5-2014
M141652				17-6-2014
M144269				24-11-2014
M141300	WAW-VK-001	Monsterpunt Oranjekom, hetzelfde water als PLD-SF-INF002. Oppervlaktewater: mengsel van rivierwater en natuurlijk duinwater na bodempassage na verblijf in open winsysteem.	Waarschijnlijk: Vogels, herten/reeën, koeien. Mogelijk mensen	20-5-2014
M141650				17-6-2014
M144264				24-11-2014
M141301	WWL-TK-001	Einde waterleidingkanaal Bloklaan (voor coagulatie). Kwelwater Bethunepolder na verblijf in open watersysteem Bethunepolder en waterleidingkanaal.	Waarschijnlijk: Vogels, koeien, mogelijk honden. Waarschijnlijk geen mensen	20-5-2014
M141636				17-6-2014
M144262				25-11-2014
M141303	WAW-KWELPLAS-1	Kwelplas in 1e infiltratiegebied. Open water: rivierwater met een beperkte duinbodempassage+hemelwater.	Waarschijnlijk: Vogels, koeien, mogelijk honden. Waarschijnlijk geen mensen	20-5-2014
M141638				17-6-2014
M144263				24-11-2014
M141302	PLV-SB-001	Onttrekkingspunt Waterleidingplas. Kwelwater Bethunepolder na verblijf in open watersysteem Bethunepolder, waterleidingkanaal en -plas.	Waarschijnlijk: vogels. Besmetting door vee als het de coagulatie passeert, er is geen vee aanwezig. Besmetting door mensen en honden onwaarschijnlijk.	20-5-2014
M141654				17-6-2014
M144274				25-11-2014
M141304	WAW-WP-023 U-BAK 4	Uitstroombak van drains direct na duinbodempassage. Freatisch grondwater direct na bodempassage (rivier- + natuurlijk- duinwater)	Eventuele doorslag van fecaal materiaal van: vogels, herten/reeën.	20-5-2014
M141642				17-6-2014
M144265				26-11-2014
M141305	WAW-WP-024 U-BAK 5	Uitstroombak van drains direct na duinbodempassage. Freatisch grondwater direct na bodempassage (rivier- + natuurlijk- duinwater).	Eventuele doorslag van fecaal materiaal van: vogels, herten/reeën.	20-5-2014
M141643				17-6-2014
M144266				16-11-2014
M144270	PNG-VSF-001	Gemengd filtraat. WRK Nieuwegein, water uit lekkkanaal na coagulatie/sedimentatie en langzaam zandfilter.	Alle verontreinigingen mogelijk: vogels, koeien, honden, mensen.	24-11-2014

Tabel 2. Korte beschrijving van de locaties van Waternet waar monsters zijn verzameld en analyses zijn uitgevoerd, en een opsomming van de mogelijk fecale besmettingsbronnen die op deze locaties zijn te verwachten.

Op de watermonsters (tabel 2) zijn analyses uitgevoerd op de aanwezigheid en concentratie van DNA-merkers voor fecale bacteriën die specifiek voorkomen bij herkauwers, runderen, mensen, vogels en op merkers voor DNA van honden. De resultaten van deze analyses zijn samengevat in tabel 3.

MEETRESULTATEN OP WATERMONSTERS VAN LOCATIES WATERNET

Nummer	KWR	Locatiecode	Datum	Monsternaam	Onderzocht Volume per qPCR analyse (ml)	DNA merkers: DNA kopieën/100 ml					Kweek: KVE/100 ml	
						Rund	Herkauwer	Mens	Hond	Vogel	E.coli	Enterococci
M141307	WBP-TK-001		20-5-2014		35	2,3E+03	2,5E+05	N/A	1,3E+02	3,3E+04	420	240
M141637			17-6-2014	30	5,4E+02	4,0E+04	8,6E+01	N/A	1,3E+04	390	250	
M144268			24-11-2014	35	1,7E+03	2,2E+05	2,4E+02	N/A	3,0E+04	N/U	N/U	
M141306	PLD-SF-INF002		20-5-2014		25	N/A	1,9E+03	N/A	N/A	3,3E+02	1	4
M141652			17-6-2014	40	N/A	1,5E+03	N/A	N/A	1,8E+02	140	14	
M144269			24-11-2014	50	N/A	2,7E+03	N/A	N/A	8,5E+03	130	23	
M141300	WAW-VK-001		20-5-2014		25	N/A	4,7E+02	N/A	N/A	9,7E+01	10	7
M141650			17-6-2014	30	N/A	9,9E+01	1,1E+02	N/A	3,1E+02	280	18	
M144264			24-11-2014	75	N/A	5,2E+03	N/A	N/A	1,6E+04	N/U	N/U	
M141301	WWL-TK-001		20-5-2014		25	1,4E+02	1,2E+04	N/A	N/A	1,3E+03	49	35
M141636			17-6-2014	30	N/A	2,0E+03	N/A	N/A	7,8E+02	52	69	
M144262			25-11-2014	35	2,4E+02	5,2E+04	N/A	N/A	1,6E+04	180	100	
M141303	WAW-KWELPLAS-1		20-5-2014		15	N/A	N/A	N/A	N/A	4,8E+02	22	24
M141638			17-6-2014	16	N/A	N/A	N/A	N/A	1,5E+03	12	8	
M144263			24-11-2014	25	N/A	N/A	N/A	N/A	4,9E+03	N/U	N/U	
M141302	PLV-SB-001		20-5-2014		100	N/A	N/A	N/A	N/A	2,0E+01	N/A	1
M141654			17-6-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	7,5E+00	N/A	N/A	
M144274			25-11-2014	95	N/A	N/A	N/A	N/A	2,0E+03	5	2	
M141304	WAW-WP-023 U-BAK 4		20-5-2014		100	N/A	N/A	N/A	N/A	9,8E+00	N/A	N/A
M141642			17-6-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	4,9E+00	1	1	
M144265			26-11-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	7,1E+01	N/U	N/U	
M141305	WAW-WP-024 U-BAK 5		20-5-2014		100	N/A	1,9E+02	N/A	3,9E+01	3,9E+01	N/A	N/A
M141643			17-6-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	2,7E+00	N/U	N/U	
M144266			16-11-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	2	
M144270	PNG-VSF-001		24-11-2014		95	N/A	N/A	1,0E+04	N/A	2,5E+01	N/U	N/U
						Detectie van merker in slechts één van de duplo-reacties						
						Concentratie vogelmerker < 1,0E+02/100 ml						

Tabel 3. Resultaten van analyses van watermonsters afkomstig van locaties van Waternet op DNA-merkers voor diergroep-specifieke fecale verontreinigingen en resultaten van analyses met standaard kweektechnieken (*E. coli*/enterococci). Analyses waarbij in slechts één van de duplo-reacties merkers werden aangetoond zijn geaccentueerd met gestippelde cellen. N/A=Niet Aangetoond; N/U= Niet Uitgevoerd

De analyse van monsters van verschillende stadia uit het proces van drinkwaterbereiding door Waternet laat zien dat de fecale DNA-merkers die worden aangetoond, in vrijwel alle gevallen, overeen komen met de te verwachten fecale verontreinigingen. Hoewel het aantal monsters te gering is om statistisch significante correlaties aan te tonen lijkt er een verband tussen het aantonen van fecale merkers en de aanwezigheid van *E. coli* en enterococci. Zoals verwacht, is het water uit het beginstadium van het proces (WBP-TK-001) het meest fecaal verontreinigd (op basis van *E. coli* en enterococci metingen) en worden in dit water ook inderdaad de hoogste concentraties fecale DNA-merkers, afkomstig van verschillende bronnen (vogels, herkauwers en runderen en lage concentraties afkomstig van mensen en honden) aangetoond. Bij de open waters waar herkauwers (zoals runderen en herten/reeën) in de buurt kunnen komen (WBP-TK-

001, PLD-SF-INF002, WAW-VK-001 en WWL-TK-001) worden ook inderdaad DNA-merkers voor fecale bacteriën van herkauwers aangetoond. Bij deze locaties worden niet in alle gevallen (niet bij PLD-SF-INF002 en WAW-VK-001 en zeer lage concentraties bij WWL-TK-001) ook DNA-merkers voor runderen aangetoond. Dit kan betekenen dat herten en reeën (en niet runderen) de belangrijkste besmettingsbron vormen voor deze locaties maar het is waarschijnlijker dat dit het gevolg is van de lagere concentratie rund-specifieke DNA-merkers in de feces van runderen (1, 2) waardoor er een hogere concentratie fecaal materiaal van runderen nodig is om een detecteerbare concentratie DNA-merkers te krijgen. Hierdoor is het mogelijk dat runderen kunnen zorgen voor een detecteerbare concentratie herkauwer-merkers zonder dat merkers voor runderen gedetecteerd kunnen worden. Zoals verwacht, is de concentratie DNA-merkers voor mens-specifieke darmbacteriën het hoogst in water waarvan te verwachten is dat de concentratie rioolwater het hoogst is: water uit het lekkanaal na beperkte zuivering (PNG-VSF-001). Bij drie locaties (WAW-Kwelplas-1, PLV-SB-001 en WAW-WP-023 U-Bak4) worden alleen vogel-specifieke fecale DNA-merkers aangetoond, bij de locaties WAW-Kwelplas-1 en PLV-SB-001 was de aanwezigheid van fecale verontreiniging van vogels ook te verwachten. Bij WAW-WP-023 U-Bak4 en Bak 5 zijn fecale verontreinigingen alleen te verwachten als de bacteriën, die deze merkers bevatten, in staat zijn de bodem te passeren. De merkerconcentraties bij WAW-WP-023 U-Bak4 en Bak 5 zijn dan ook erg laag en soms alleen detecteerbaar in één van de duplomonsters. Bij locatie WAW-Kwelplas-1 werd mogelijk ook fecale verontreiniging van runderen en honden verwacht maar kennelijk zijn deze verontreiniging niet aanwezig of zijn de concentraties van deze verontreinigingen beneden de detectiegrens van de methode. Hond-specifieke DNA-merkers worden aangetoond in water afkomstig van twee locaties (WBP-TK-001 en WAW-WP-024 Bak 5). De merkerconcentratie is echter zeer laag en in beide monsters slechts detecteerbaar in één van de duploreacties. Deze DNA-merker is slechts zeer recent ontwikkeld (2) en niet alle kenmerken van deze merker zijn bekend. Aanvullend onderzoek (sequentieanalyse van de gevormde PCR-fragmenten) moet duidelijk maken of deze signalen daadwerkelijk afkomstig zijn van DNA van honden.

Samenvattende conclusies:

- *De DNA-merkers die op de verschillende locaties worden aangetoond komen in vrijwel alle onderzochte watermonsters overeen met de te verwachten fecale verontreinigingen.*

3.2 Metingen bij locaties van PWN

Watermonsters (n=31), afkomstig van 14 verschillende locaties, uit de waterwinning van PWN zijn op verschillende momenten in het jaar verzameld en geanalyseerd op de aanwezigheid en concentratie van diergroep-specifieke fecale DNA-merkers. Een deel van de locaties is geselecteerd om beter inzicht te krijgen van de fecale verontreinigingsbronnen die op deze locaties een rol spelen. Een ander deel van de monsters is afkomstig van "ad-hoc" monsternames die zijn uitgevoerd op momenten dat er fecale indicatorbacteriën (*E. coli* en enterococci met kweek) werden aangetoond in groot volume monsters (100 l) met water uit winstrangen waarin normaal gesproken geen fecale bacteriën aanwezig (horen te) zijn. In tabel 4 wordt een korte beschrijving van de monsterlocaties en een overzicht van de mogelijke besmettingsbronnen op deze locaties gegeven.

ONDERZOCHE LOCATIES PWN

KWR				Datum
Nummer	Locatiecode	Beschrijving Locatie	Mogelijke besmetting	Monstername
M141295 M141649 M144261	Kwal	Voorgezuiverd IJsselmeerwater (trommelzeven, coagulatie, upflow snelfiltratie, delstroom koolfiltratie, UV peroxide) water komt hier in infiltratiepanden.	Open water in recreatie gebied: Mensen, mogelijk vogels	20-5-2014 17-6-2014 24-11-2014
M141297 M141646 M144260	WWM-SEC-PAND-IX	Stijger Q100. Infiltratiepand 50 cm onder het oppervlak ter hoogte van put Q: Het water uit de Kwal is verdeeld over infiltratiepanden. Dit is een van de verst weggelegen infiltratiepanden t.o.v. de kwal.	In recreatiegebied. Veel vogels in omgeving, infiltratiepand niet zomaar toegankelijk voor recreanten en honden.	20-5-2014 17-6-2014 24-11-2014
M141840	PBG-VLZF-EFF1	Effluent van de snelfiltratie stap (zandfilters 1-6) op Bergen. Na bodempassage/cascadebeluchting/snelfiltratie.	Geen	3-7-2014
M141837	PBG-VLZF-EFF2	Effluent van de snelfiltratie stap (zandfilters 7-12) op Bergen. Na bodempassage/cascadebeluchting/snelfiltratie.	Geen	3-7-2014
M141838	PWM-VLZF-EFF2	Effluent van de snelfiltratie stap (zandfilters 7-12) op Mensink. Na bodempassage/cascadebeluchting/snelfiltratie.	Geen	3-7-2014
M141843	PWM-VLZF-EFF1	Effluent van de snelfiltratie stap (zandfilters 7-12) op Mensink. Na bodempassage/cascadebeluchting/snelfiltratie.	Geen	3-7-2014
M141841	WWM-SEC-Q-200	Strang 200 secundair Q: na bodempassage van de putten van strang Q200. Na 3-6 weken bodempassage.	Geen, maar er zijn coliformen en/of enterococci aangetoond in 100L monsters.	7-7-2014 11-7-2014 16-7-2014
M144256 M141298 M141644	WWM-SEC-Q-300	Strang 300 secundair Q: na bodempassage van de putten van strang Q300. Na 3-6 weken bodempassage.	Geen, maar er zijn coliformen en/of	24-11-2014 20-5-2014 17-6-2014
M141842 M141949 M141954 M141956 M144258	WWM-SEC-Q-400	Strang 400 secundair Q: na bodempassage van de putten van strang Q400. Na 3-6 weken bodempassage.	Geen, maar na werkzaamheden zijn er problemen met E.coli's /enterococci.	7-7-2014 11-7-2014 14-7-2014 16-7-2014 24-11-2014
M141948 M141952 M141957	WWM-SEC-Q-500	Strang 500 secundair Q: na bodempassage van de putten van strang Q500. Na 3-6 weken bodempassage.	Geen, maar er zijn coliformen en/of enterococci aangetoond in 100L monsters.	11-7-2014 14-7-2014 16-7-2014
M141299 M141645	WWM-SEC-Q-600	Strang 600 secundair Q: na bodempassage van de putten van strang Q600. Na 3-6 weken bodempassage.	Geen, maar er zijn coliformen en/of enterococci aangetoond in 100L monsters.	20-5-2014 17-6-2014
M141947 M141960	WWM-SEC-P-200	Strang 200 secundair P: na bodempassage van de putten van strang P200. Na 3-6 weken bodempassage.	Geen, maar er zijn coliformen en/of enterococci aangetoond in 100L monsters.	11-7-2014 16-7-2014
M141950 M141955	WWM-SEC-P-600	Strang 600 secundair P: na bodempassage van de putten van strang P600. Na 3-6 weken bodempassage.	Geen, maar er zijn coliformen en/of enterococci aangetoond in 100L monsters.	11-7-2014 16-7-2014
M141958	WWM-SEC-P-400	Strang 400 secundair P: na bodempassage van de putten van strang P400. Na 3-6 weken bodempassage.	Geen, maar er zijn coliformen en/of enterococci aangetoond in 100L monsters.	16-7-2014

Tabel 4. Korte beschrijving van de locaties van PWN waar monsters zijn verzameld en analyses zijn uitgevoerd, en een opsomming van de mogelijk fecale besmettingsbronnen die op deze locaties zijn te verwachten

Op de watermonsters (beschreven in tabel 4) zijn analyses uitgevoerd op de aanwezigheid en concentratie van diergroep-specifieke fecale DNA-merkers voor fecale bacteriën die specifiek voorkomen bij herkauwers, runderen, mensen, vogels en op merkers voor DNA van honden. De resultaten van deze analyses zijn samengevat in tabel 5.

de voorzuivering. In een groot aantal watermonsters van andere locaties worden zeer lage concentraties DNA-merkers voor fecale verontreinigingen van vogels aangetoond terwijl deze verontreinigingen op deze locaties niet verwacht worden. Mogelijk is dit het gevolg van vals-positieve reacties (zie 3.4 voor toelichting). Bij locatie WWM-SEC-PAND-IX worden in twee van de drie geanalyseerde monsters hogere concentraties vogel-specifieke DNA-merkers aangetoond. Vanwege de hoge dichtheid vogels bij dit infiltratiepand is de aanwezigheid van vogel-specifieke fecale verontreiniging op deze locatie te verwachten.

Bij één van de strangen WWM-SEC-Q400 worden in twee van de zeven onderzochte monsters lage concentraties DNA-merkers van honden aangetoond waarbij de concentratie in één van de monsters zo laag was dat slechts één van de duplo reacties een signaal gaf. Fecale verontreiniging t.g.v. honden is op deze locatie verklaarbaar door de aanwezigheid van een pad richting de duinen op korte afstand van Q400. Dit pad wordt intensief gebruikt door mensen met honden zodat de aanwezigheid van feces van honden op het maaiveld mogelijk is en transport van de DNA-merker naar het grondwater niet kan worden uitgesloten. Deze hond-specifieke DNA-merker is slechts zeer recent ontwikkeld (2) en nog niet alle kenmerken van deze merker zijn bekend, aanvullend onderzoek (sequentieanalyse van de gevormde PCR-fragmenten) moet duidelijk maken of deze signalen daadwerkelijk afkomstig zijn van DNA van honden. Hoewel dit niet experimenteel is vastgesteld is, op basis van de sequentie van de toegepaste primers, niet te verwachten dat met de toegepaste hond-specifieke methode ook het DNA van vossen gedetecteerd kan worden.

Een groot deel van de geanalyseerde monsters zijn genomen van verschillende locaties (strangen) rond momenten waarop er, met kweektechnieken, *E. coli* en/of enterococci aangetoond werden bij de analyse van grote volumes. Tijdens de aanwezigheid van *E. coli* en/of enterococci worden er echter, behalve lage concentraties fecale merkers voor vogels, geen herkauwer- mens- en rund-specifieke fecale DNA-merkers aangetoond. Eerder onderzoek heeft laten zien dat de gemiddelde concentraties herkauwer- mens- en rund-specifieke fecale DNA-merkers in feces veel hoger is dan de concentratie DNA-merkers voor *E. coli* en enterococci (2). Op basis daarvan is dus te verwachten dat, in gevallen waarin deze diergroepen de "veroorzakers" zijn van de fecale besmetting, deze merkers te detecteren zijn in monsters waarin *E. coli* en enterococci worden aangetoond. Het kleinere analysevolume dat met de qPCR methoden in behandeling wordt genomen zal ervoor kunnen zorgen dat de merkers in deze monsters niet worden aangetoond. Daarom zijn er op twee monsters (WWM-SEC-Q300 en WWM-SEC-Q400 van 24-11-2014) qPCR analyses uitgevoerd op (hemoflow) concentraten van grote volumes. In één van deze monsters (WWM-SEC-Q300) worden er wel *E. coli*'s en enterococci aangetoond maar worden er geen herkauwer- mens- en rund-specifieke fecale DNA-merkers aangetoond. Het is dus niet waarschijnlijk dat mensen, herkauwers of runderen een rol spelen bij de besmettingen die worden waargenomen in het water van deze strangen. Vanwege de lagere concentratie vogel- en hond-specifieke DNA-merkers in feces (2) van deze diergroepen is het mogelijk dat besmettingen t.g.v. deze diergroepen minder gevoelig kunnen worden aangetoond waardoor niet kan worden uitgesloten dat vogels of honden "veroorzakers" zijn van de fecale besmetting van de onderzochte strangen maar dat de concentratie lager is dan de detectiegrens van deze qPCR methoden. Er kan ook niet worden uitgesloten dat andere diergroepen (zoals b.v. knaagdieren) een rol spelen bij de besmetting van het water in de strangen. En recent worden, naast warmbloedige dieren, ook insecten zoals vliegen (15) muggen (16) genoemd als mogelijke verspreiders van fecale bacteriën (enterococci) waarmee mogelijk de aanwezigheid van enterococci en afwezigheid van DNA-merkers verklaard kan worden. Aanvullend onderzoek zal nodig zijn om beter inzicht te krijgen in de mogelijke rol van andere bronnen bij de verspreiding van fecale indicatorbacteriën en de relevantie voor de volksgezondheid.

Samenvattende conclusies:

- *De DNA-merkers die worden aangetoond op de twee locaties met "open water" (Kwal en WWM-SEC-Pand-IX) komen overeen met de verwachting.*
 - o *Opvallend is wel dat de vogel-specifieke DNA-merker niet wordt aangetoond bij locatie Kwal*
- *De bron van de fecale besmettingen (op basis van E. coli en enterococci metingen in grote volumes van 100 L) die worden aangetroffen in verschillende strangen kan met de toegepaste merkers niet direct worden achterhaald.*
 - o *Bij één locatie (strang WWM-SEC-Q-400) is er een mogelijke indicatie voor honden als bron van fecale verontreiniging. Maar, de gemiddelde concentratie DNA-merkers is zeer laag.*
 - o *Ook qPCR analyse van een beperkt aantal (2) grote volume monsters geeft geen duidelijke aanwijzing voor de bron van de fecale besmetting (van één locatie: WWM-SEC-Q-400).*
 - o *Mogelijk is er een andere bron van fecale besmetting: Insecten? Knaagdieren?*
 - o *Bij veel locaties worden lage, maar onbetrouwbare (3.4) concentraties fecale merkers van vogels aangetoond.*

3.3 Metingen bij locaties van Dunea

Watermonsters (n=21), afkomstig van 10 verschillende locaties, uit de waterwinning van Dunea zijn op verschillende momenten in het jaar verzameld en geanalyseerd op de aanwezigheid en concentratie van diergroep-specifieke fecale DNA-merkers. De locaties zijn geselecteerd omdat op deze locaties sporadisch fecale indicator bacteriën worden gedetecteerd terwijl de aanwezigheid van fecale verontreinigingen niet te verwachten is. Vanwege de te verwachten hoge gevoeligheid van DNA-merkers voor detectie en identificatie van fecale verontreinigingen kan toepassing van DNA-merkers mogelijk inzicht verschaffen in de fecale verontreinigingsbronnen die op deze locaties een rol spelen. In tabel 6 is een overzicht gegeven van de locaties waar watermonsters zijn verzameld en analyses zijn uitgevoerd.

ONDERZOCHE LOCATIES DUNEA

<i>KWR</i>				<i>Datum</i>
<i>Nummer</i>	<i>Locatiecode</i>	<i>Beschrijving Locatie</i>	<i>Mogelijke besmetting</i>	<i>Monstername</i>
M141292	WME-KONING-ZEE-EFF	Winning Meijendel koningsbos zeezijde effluent	Niet verwacht maar sporadisch indicaties voor fecale besmetting	20-5-2014
M141647				17-6-2014
M141287	PSC-VK-HA-EFF	Pompstation Scheveningen verzamelkom hoofdadereffluent	Niet verwacht maar sporadisch indicaties voor fecale besmetting	20-5-2014
M141640				17-6-2014
M144271				25-11-2014
M141291	PSC-VK-VOW	Pompstation Scheveningen verzamelkom verzameld onttrokken water	Niet verwacht maar sporadisch indicaties voor fecale besmetting	20-5-2014
M141523				11-6-2014
M144272				24-11-2014
M141293	WME-KONING-LAND-EFF	Winning Meijendel koningsbos landzijde effluent	Niet verwacht maar sporadisch indicaties voor fecale besmetting	20-5-2014
M141648				17-6-2014
M141288	PSC-VK-SPA-VEFF	Pompstation Scheveningen verzamelkom hoofdadereffluent	Niet verwacht maar sporadisch indicaties voor fecale besmetting	20-5-2014
M141639				17-6-2014
M144273				25-11-2014
M141524	WME-LV-EFF	Winning Meijendel	Niet verwacht maar sporadisch indicaties voor fecale besmetting	11-6-2014
M141651				17-6-2014
M141522	WME-PUT10-EFF	Put 10 effluent	Niet verwacht maar sporadisch indicaties voor fecale besmetting	11-6-2014
M144267				24-11-2014
M141641	PSC-VK-VOW	Verzameld uit Duin Verzamelkom	Niet verwacht maar sporadisch indicaties voor fecale besmetting	17-6-2014
M141653	PKW-WZ-LZF74-EFF	Langzame zandfilter	Niet verwacht maar sporadisch indicaties voor fecale besmetting	17-6-2014
M141296	WME-SPM-EFF	Verzameld effluent Sprang M	Niet verwacht maar sporadisch indicaties voor fecale besmetting	20-5-2014
M141635				17-6-2014

Tabel 6. Korte beschrijving van de locaties van Dunea waar monsters zijn verzameld en analyses zijn uitgevoerd.

Op de watermonsters (beschreven in tabel 6) zijn analyses uitgevoerd op de aanwezigheid en concentratie van diergroep-specifieke fecale DNA-merkers voor fecale bacteriën die specifiek voorkomen bij herkauwers, runderen, mensen, vogels en op merkers voor DNA van honden. De resultaten van deze analyses zijn samengevat in tabel 7.

MEETRESULTATEN OP WATERMONSTERS VAN LOCATIES DUNEA

KWR Nummer	Locatiecode	Datum Monstername	Onderzocht Volume per qPCR analyse (ml)	DNA kopieën/100 ml					KVE/100 ml	KVE/100 l
				Rund	Herkauwer	Mens	Hond	Vogel	E.coli	enterococci
M141292	WME-KONING-ZEE-EFF	20-5-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0
M141647		17-6-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	9,5E+00	0	4
M141287	PSC-VK-HA-EFF	20-5-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0
M141640		17-6-2014	80	N/A	N/A	N/A	N/A	2,1E+00	0	0
M144271		25-11-2014	90	N/A	N/A	N/A	N/A	3,5E+00	N/U	N/U
M141291	PSC-VK-VOW	20-5-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0
M141523		11-6-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	1,7E+00	0	0
M144272		24-11-2014	90	N/A	N/A	N/A	N/A	7,5E+00	0	0
M141293	WME-KONING-LAND-EFF	20-5-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	2,4E+00	0	0
M141648		17-6-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	1,8E+00	0	0
M141288	PSC-VK-SPA-VEFF	20-5-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	3,8E+00	0	0
M141639		17-6-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	8,0E-01	0	0
M144273		25-11-2014	90	N/A	N/A	N/A	N/A	5,2E+00	N/U	N/U
M141524	WME-LV-EFF	11-6-2014	75	N/A	N/A	N/A	N/A	2,2E+01	16	0
M141651		17-6-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	1,8E+00	0	0
M141522	WME PUT10-EFF	11-6-2014	60	N/A	N/A	N/A	N/A	7,0E+00	0	0
M144267		24-11-2014	50	N/A	N/A	N/A	N/A	6,8E+00	N/U	N/U
M141641	PSC-VK-VOW	17-6-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	2,8E+00	0	0
M141653	PKW-WZ-LZF7 4-EFF	17-6-2014	100	N/A	N/A	N/A	8,20E+00	N/A	28	4
M141296	WME-SPM-EFF	20-5-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0
M141635		17-6-2014	100	N/A	N/A	N/A	N/A	8,7E-01	0	0
									Detectie van merker in slechts één van de duplo-reacties	
									Concentratie vogelmerker <1,0E+02/100 ml	

Tabel 7. Resultaten van analyses van watermonsters afkomstig van locaties van Dunea op DNA-merkers voor diergroep-specifieke fecale verontreinigingen en resultaten van analyses met standaard kweektechnieken (*E. coli*/enterococci). Analyses waarbij in slechts één van de duplo-reacties merkers werden aangetoond zijn geaccentueerd met gestippelde cellen. N/A=Niet Aangetoond; N/U= Niet Uitgevoerd

In een groot deel van de onderzochte monsters worden zeer lage concentraties DNA-merkers voor vogel-specifieke helicobacter bacteriën aangetoond terwijl deze verontreinigingen op deze locaties niet verwacht worden. Mogelijk zijn deze lage concentraties het gevolg van vals-positieve reacties (zie 3.4 voor toelichting). Bij locatie PKW-WZ-LZF7 4-EFF wordt een indicatie (lage concentratie in één van de duplomonsters) voor de aanwezigheid van DNA van honden gevonden op een moment dat er ook *E. coli* en enterococci worden aangetoond bij de analyse van een groot volume (100 L) monster. Honden als bron van fecale besmetting kunnen op deze locatie niet geheel worden uitgesloten maar de eenmalige meting van een lage concentratie hond-specifieke DNA-merker is te beperkt om met zekerheid vast te stellen dat honden een rol spelen bij de fecale besmetting van dit water. Uitgebreider onderzoek waarbij meerdere metingen gedurende het jaar worden uitgevoerd kan beter inzicht geven.

Samenvattende conclusies:

- *In het water van een groot deel van de onderzochte worden lage, maar onbetrouwbare (3.4) concentraties fecale merkers van vogels aangetoond.*
- *Bij één locatie (PKW-WZ-LZF7 4-EFF) zijn mogelijk honden de bron van fecale besmetting van het water.*
 - o *Gebaseerd op slechts één meting met een lage meetwaarde, aanvullend onderzoek kan meer inzicht geven.*

3.4 Integriteit van de merker voor verontreinigingen van vogels

In dit onderzoek is aangetoond dat zeer lage concentraties van de vogel-specifieke merker worden aangetoond in een groot deel van de onderzochte watermonsters. Recent onderzoek laat ook zien dat de vogel-specifieke methode een laag signaal geeft bij een klein deel van de geanalyseerde drinkwatermonsters (2). Het is niet te verwachten dat in al deze monsters lage concentraties vogel-specifieke fecale bacteriën aanwezig zijn waardoor de waarde van het aantonen van zeer lage concentraties van deze merker in twijfel wordt getrokken. Het is onduidelijk of het meten van dergelijke lage concentraties vogel-specifieke merkers werkelijk een indicatie is voor fecale verontreiniging t.g.v. vogels of dat de vogel-specifieke methode zorgt voor een "ruis" van vals-positief signaal door amplificatie van een niet-specifiek DNA-fragment. Bij de mens-, herkauwer-, rund- en hond-specifieke methoden wordt er bij de qPCR gebruik gemaakt van een fluorescente probe waarmee het gevormde PCR-fragment wordt gedetecteerd en de integriteit van dit fragment wordt bevestigd. Bij de vogel-specifieke methode is er nog geen probe beschikbaar maar wordt het gevormde qPCR-fragment zichtbaar gemaakt m.b.v. een a-selectieve kleuring met SYBR-green. De specificiteit van deze methode berust dus vooral op de specificiteit van de toegepaste primers. Er kan echter niet geheel worden uitgesloten dat ook een DNA-fragment van een ander organisme met zeer lage efficiëntie (door suboptimale binding van de primers) kan worden vermeerderd en worden gedetecteerd waardoor vals-positieve reacties kunnen ontstaan. Door de DNA-sequentie te bepalen van de, tijdens de qPCR reacties, gevormde DNA-fragmenten is onderzocht of het signaal afkomstig is van amplificatie DNA van vogel-specifieke helicobacter bacteriën of dat het in deze monsters gaat om vals-positieve reacties. Sequentieanalyse is uitgevoerd op PCR-fragmenten afkomstig uit drinkwatermonsters en monsters uit dit project met verschillende concentraties vogel-specifieke merkers. De resultaten van de sequentieanalyses zijn samengevat in tabel 8.

SAMENVATTING VAN RESULTATEN VAN SEQUENTIEANALYSE

Monster nr.	Herkomst Monster	Merkerconcentratie (DNA kopieën/100 ml)	Meest verwante sequentie in database	% sequentie overeenkomst
Monsters uit dit DPW onderzoek				
M141307	WBP-TK-001 (Bethunepolder)	3,3E+05	Helicobacter (Vogels)	100%
M141637	WBP-TK-001 (Bethunepolder)	1,3E+05	Helicobacter (Vogels)	100%
M141947	WWM-SEC-P-200 (Strang PWN)	<1,0E+02	Uncultured Bacterium	95%
M141954	WWM-SEC-Q-400 (Strang PWN)	<1,0E+02	Uncultured Acidithiobacillales	94%
M141956	WWM-SEC-Q-400 (Strang PWN)	<1,0E+02	Desulfoma	96%
M141958	WWM-SEC-P-400 (Strang PWN)	<1,0E+02	Uncultured Bacterium	95%
M144260	WWM-SEC-PAND-IX	1,4E+04	Helicobacter (Vogels)	100%
Drinkwatermonsters				
M130428	Drinkwater	<1,0E+02	Uncultured Methylobacter	96%
M130429	Drinkwater	<1,0E+02	Uncultured Acidithiobacillales	94%
M130435	Drinkwater	<1,0E+02	Uncultured Acidithiobacillales	94%

Tabel 8. Resultaten van sequentieanalyses op PCR-fragmenten afkomstig van DNA uit monsters waarin verschillende concentraties vogel-specifieke fecale verontreinigingen worden gemeten.

Uit deze analyse blijkt dat het PCR signaal dat wordt verkregen in monsters waarin hogere concentraties vogel-specifieke DNA-merkers worden gemeten inderdaad afkomstig zijn door amplificatie van een DNA-fragment van helicobacter bacteriën. In monsters waarin lage concentraties (<1,0E+02 DNA kopieën/100 ml) vogel-specifieke merkers worden gemeten zijn de geamplificeerde DNA-fragmenten niet afkomstig van helicobacter bacteriën maar van verschillende andere bacteriesoorten ("vals positief"). Dit geeft aan dat de lage concentraties die worden gemeten in de monsters minder betrouwbaar zijn en waarschijnlijk niet afkomstig zijn van helicobacter bacteriën van vogels waardoor voor deze lage meetwaarden geen betrouwbare indicatie vormen voor de aanwezigheid van vogel-specifieke fecale verontreinigingen. Daarom zijn de lage meetwaarden (<1,0E+02 DNA kopieën/100 ml) in de tabellen geaccentueerd d.m.v. gestrepte cellen.

Voor vervolgonderzoek wordt geadviseerd om de methode waarmee vogel-specifieke fecale verontreinigingen kunnen worden gedetecteerd te optimaliseren. Dit is mogelijk door een probe te ontwikkelen waarmee het gevormde qPCR fragment specifiek kan worden zichtbaar gemaakt. Deze probe zal zo ontworpen kunnen worden zodat deze niet kan binden aan het DNA van de bacteriën die verantwoordelijk zijn voor de vals-positieve reacties waardoor de aanwezigheid van het DNA van deze bacteriën geen aanleiding meer zal geven voor een vals-positief signaal.

Samenvattende conclusies:

- *Sequentieanalyse toont aan dat in monsters met hogere concentraties vogel-specifieke merkers het qPCR signaal afkomstig is van DNA van vogel-specifieke helicobacter bacteriën.*
- *In monsters met lage concentraties vogel-specifieke merkers is het qPCR signaal afkomstig van DNA van andere bacteriën: vals-positieve reacties.*
- *In vervolgonderzoek kan de ontwikkeling van een specifieke probe, waarmee controle van de sequentie van het gevormde qPCR-fragment plaats vindt, zorgen voor een verbeterde methode waarmee ook lage concentraties fecale verontreinigingen van vogels betrouwbaar kunnen worden aangetoond.*

4 Conclusies en aanbevelingen

Om beter inzicht te krijgen in de toepassingsmogelijkheden van DNA-merkers waarmee de herkomst van fecale verontreinigen kan worden achterhaald zijn de methoden waarmee deze merkers kunnen worden gekwantificeerd toegepast op watermonsters afkomstig van de waterwingebieden van de DPW bedrijven. In het onttrokken grondwater van de DPW bedrijven worden, met het aantonen van *E. coli* en enterococci, incidenteel aanwijzingen gevonden voor de aanwezigheid van fecale besmettingen. Het kennen van de bronnen van deze besmettingen geeft beter inzicht in de mogelijke risico's en maakt het mogelijk om gerichte maatregelen te nemen.

De qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) methoden waarmee merkers voor het DNA van honden en het DNA van fecale bacteriën van mensen, herkauwers, runderen en vogels specifiek kunnen worden gedetecteerd zijn in dit onderzoek toegepast op watermonsters van verschillende locaties. Bij de selectie van de locaties is geselecteerd voor:

- Locaties waar fecale verontreinigingen te verwachten zijn (open water).
 - o Het was te verwachten dat deze analyses inzicht zouden geven in de mogelijkheden van de methoden om fecale besmettingsbronnen te identificeren.
- Locaties waar geen fecale verontreinigingen te verwachten (onttrokken grondwater) zijn maar incidenteel wel worden waargenomen bij de analyse van grote volumes.
 - o Het was te verwachten dat deze analyses inzicht zouden geven in de problemen die aan de basis liggen van de incidentele fecale verontreinigingen.

Op basis van de analyse van 77 monsters, afkomstig van 33 locaties, kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- De analyse van watermonsters afkomstig van locaties waar fecale verontreinigingen te verwachten zijn (open water) maakt duidelijk dat:
 - o Het aantonen van DNA-merkers specifiek voor fecale verontreinigingen door mensen, herkauwers, runderen en vogels komt op de verschillende locaties vrijwel altijd overeen komen met de verwachting.
 - Dit geeft aan dat het met de toegepaste DNA-merkers mogelijk is om een beeld te krijgen van de aanwezigheid van fecale verontreinigingen veroorzaakt door deze diergroepen.
 - o Merkers voor het DNA van honden wordt in water afkomstig van vier locaties in zeer lage concentraties (waarbij de merker in 3 monsters slechts werd aangetoond in één van de duplo-reacties) aangetoond.
 - Het is momenteel nog onduidelijk of in het water van deze locaties werkelijk DNA van honden aanwezig was. De prestatiekenmerken van deze recent ontwikkelde methode (2) zijn gedeeltelijk onbekend en de ervaringen met de methode zijn nog zeer beperkt. Aanvullend onderzoek zal duidelijk kunnen maken in hoeverre deze zeer lage concentraties werkelijk relevant zijn of dat deze meetwaarden het gevolg zijn van een suboptimaal werkende methode.
- De analyse van watermonsters afkomstig locaties waar geen fecale verontreinigingen te verwachten zijn (onttrokken grondwater) maar wel gevonden worden maakt duidelijk dat:

- In de geanalyseerde monsters waarbij, in dit of in eerder onderzoek, *E. coli* en/of enterococci zijn aangetoond in grote volumes geen duidelijke aanwijzingen worden gevonden voor de aanwezigheid van DNA-merkers van de diergroep-specifieke fecale bacteriën.
 - Dit kan betekenen dat de fecale verontreinigingen afkomstig zijn van dieren waarvoor (nog) geen DNA-merker beschikbaar is (konijnen, knaagdieren of misschien insecten?). Mogelijk dat uitbreiding van de beschikbare set DNA-merkers kan zorgen voor een compleet beeld.
 - Het is ook mogelijk dat, vanwege het relatief kleine volume (ca. 100 ml) dat is onderzocht met qPCR, de gevoeligheid van de toegepaste qPCR methoden niet voldoende is, om merkers in deze monsters te detecteren. In vervolgonderzoek kan de analyse van fecale DNA-merkers in grotere volumes mogelijk meer inzicht geven in de herkomst van de fecale besmettingen.
 - Er kan ook niet geheel uitgesloten worden dat de *E. coli* en enterococci die worden aangetoond in de groot volume monsters niet afkomstig zijn van fecale verontreinigingen. Mogelijk dat deze bacteriën zich in lage concentraties in het milieu kunnen handhaven (17).
- Veel van de gemeten lage concentraties vogel-specifieke fecale verontreinigingen zijn het gevolg van vals-positieve reacties. Dit lijkt vooral het gevolg van het ontbreken van een DNA-probe tijdens de qPCR reacties. Het is te verwachten dat de ontwikkeling van een geschikte probe de specificiteit van deze methode zal verbeteren waardoor ook lage concentraties vogel-specifieke fecale verontreinigingen betrouwbaar kunnen worden aangetoond.

5 Literatuur

1. L. Heijnen, K. Learbuch, Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen *BTO rapport BTO 2013.014*, (2013).
2. L. Heijnen, Eigenschappen van DNA-merkers voor fecale verontreiniging. *BTO rapport BTO 2014.053* (2015).
3. L. Heijnen *et al.*, Fecale verontreiniging in zwemwater identificeren met DNA-merkers. *H2O April 2014*, (2014).
4. L. Heijnen, E. Kardinaal, DNA analyse fecale verontreinigingen: 2013. *KWR Rapport i.o.v. RWS KWR 2014.005*, (2013).
5. A. E. Bernhard, K. G. Field, A PCR assay To discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* **66**, 4571 (Oct, 2000).
6. S. Seurinck, T. Defoirdt, W. Verstraete, S. D. Siciliano, Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environ Microbiol* **7**, 249 (Feb, 2005).
7. R. A. Haugland, S. C. Sieftring, L. J. Wymer, K. P. Brenner, A. P. Dufour, Comparison of *Enterococcus* measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis. *Water Res* **39**, 559 (Feb, 2005).
8. O. C. Shanks *et al.*, Performance of PCR-based assays targeting *Bacteroidales* genetic markers of human fecal pollution in sewage and fecal samples. *Environ Sci Technol* **44**, 6281 (Aug 15, 2010).
9. S. Mieszkin, J. F. Yala, R. Joubrel, M. Gourmelon, Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. *J Appl Microbiol* **108**, 974 (Mar, 2010).
10. M. Gourmelon *et al.*, Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. *Water Res* **44**, 4812 (Sep, 2010).
11. O. C. Shanks *et al.*, Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution. *Applied and environmental microbiology* **74**, 745 (Feb, 2008).
12. O. C. Shanks *et al.*, Performance assessment PCR-based assays targeting *bacteroidales* genetic markers of bovine fecal pollution. *Applied and environmental microbiology* **76**, 1359 (Mar, 2010).
13. H. C. Green, L. K. Dick, B. Gilpin, M. Samadpour, K. G. Field, Genetic markers for rapid PCR-based identification of gull, Canada goose, duck, and chicken fecal contamination in water. *Applied and environmental microbiology* **78**, 503 (Jan, 2012).
14. J. M. Caldwell, J. F. Levine, Domestic wastewater influent profiling using mitochondrial real-time PCR for source tracking animal contamination. *J Microbiol Methods* **77**, 17 (Apr, 2009).
15. A. Ghosh, M. Akhtar, C. Holderman, L. Zurek, Significance and Survival of *Enterococci* During the House Fly Development. *Journal of Medical Entomology* **51**, 63 (2014/01/01, 2014).
16. M. Hügler, H. Petzoldt, R. Nitsche, B. Hambsch, A. Korth, Mosquitoes as source for enterococci in drinking water samples. *IWA World Water Congress & Exhibition 2014, Lisbon, Portugal, September 21* (2014).
17. S. Ishii, W. B. Ksoll, R. E. Hicks, M. J. Sadowsky, Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds. *Applied and environmental microbiology* **72**, 612 (2006).