

KWR 2018.005 | Januari 2018

**Overleving van  
*Escherichia coli* en  
*Enterococcus  
moraviensis* in  
duinzand**



## Overleving van *Escherichia coli* en *Enterococcus moraviensis* in duinzand

KWR 2018.005 | Januari 2018

### Opdrachtnummer

401742/012

### Projectmanager

Edwin Kardinaal

### Opdrachtgever

DPWE onderzoek 2017

### Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

### Auteur(s)

Dr. Luc Hornstra, Dr. ir. Gijsbert Cirkel

### Verzonden aan

DPWE werkgroep Bronnen en Kwaliteit

Jaar van publicatie  
2018

### Meer informatie

Dr. Luc Hornstra  
T 0306069628  
E luc.hornstra@kwrwater.nl

Postbus 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

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



KWR | Januari 2018 © 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.



# Inhoud

<b>1</b>	<b>Introductie</b>	<b>4</b>
1.1	Inleiding	4
1.2	Groei en overleving van bacteriën in zand, de huidige stand van zaken.	5
1.3	Doel van het onderzoek	6
<b>2</b>	<b>Materiaal en Methoden</b>	<b>7</b>
2.1	Proefopzet	7
2.2	Karakterisatie van de bodem.	7
2.3	Het bepalen van de vochtigheid van de aangeleverde bodem monsters.	8
2.4	Het bepalen van het organische stof gehalte van de aangeleverde bodem monsters.	8
2.5	Bacteriën	8
<b>3</b>	<b>Resultaten en Discussie</b>	<b>11</b>
3.1	Resultaten van de bodemanalyse	11
3.2	Afsterving van <i>E. coli</i> en <i>E. moraviensis</i> in duinzand	11
3.3	Afsterving van <i>E. coli</i> en <i>E. moraviensis</i> in water	13
3.4	De onverzadigde zone als barrière en als reservoir voor bacteriën	14
3.5	Incubatie van zandmonster bij 22°C na 150 dagen.	14
3.6	Groei van <i>E. coli</i> en <i>E. moraviensis</i> in duinzand.	16
3.7	Retentie en remobilisatie van fecale microorganismen in de onverzadigde zone	16
<b>4</b>	<b>Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>20</b>
4.1	Conclusies.	20
4.2	Aanbevelingen	20
<b>5</b>	<b>Referenties</b>	<b>22</b>

# 1 Introductie

## 1.1 Inleiding

In de praktijk worden met enige regelmaat coliformen en enterococci gevonden bij infiltratiewinningen, waarbij het vermoeden bestaat dat deze bacteriën vanaf maaiveld, in de nabijheid van de winmiddelen, via passage door de onverzadigde zone in het water terecht zijn gekomen. Van enterococci soort *E. moraviensis* is recentelijk aangetoond dat deze aanwezig zijn in uitwerpselen van ganzen, die zich vaak vlakbij de winningen ophouden. Verder liet dit onderzoek zien dat in onttrokken water aangetroffen *E. moraviensis* soorten het best overeenkomen met de soorten die worden aangetroffen in ganzenfeces (Taucer-Kapteijn, 2017). Dit is een indicatie dat bacteriën onder bepaalde omstandigheden van het maaiveld, door de onverzadigde zone, naar het onttrokken water kunnen reizen. Omdat ganzen ook drager kunnen zijn van ziekteverwekkende micro-organismen, kan de aanwezigheid van *E. moraviensis* als fecale indicator bacterie duiden op een gezondheidsrisico. Van *E. coli* en coliformen is deze route naar onttrokken water minder goed onderzocht, en is de vraag waar deze bacteriën vandaan komen is niet eenduidig te beantwoorden, en daarmee wordt het moeilijker om de gezondheidkundige betekenis te beoordelen. Het effect van de onverzadigde zone als barrière tegen micro-organismen vanaf het maaiveld is niet onder alle omstandigheden duidelijk. Onderzoek bij Solleveld heeft geresulteerd in informatie over de verwijdering van micro-organismen die op maaiveld worden 'opgebracht' door de onverzadigde zone Nobel and Cirkel, 2005. Door heterogeniteit in de bodem wijkt de praktijk echter vaak af van de situatie bij Solleveld. Recent onderzoek heeft daarom het reisgedrag van *E. coli* en *E. moraviensis* in verschillende bodemtypes onderzocht in het duingebied van PWN, met als doel het effect van heterogeniteit op bacterieverwijdering te bepalen. Deze studie heeft laten zien dat bacteriën als gevolg van hevige regenval via preferente stromingen ver in de onverzadigde zone kunnen doordringen (Hornstra et al, 2018). Er is een bepaalde mate van stroming noodzakelijk om de bacteriën te mobiliseren. Hevige regenval resulteert in plaatselijk veel water, waardoor bacteriën snel en ver door de onverzadigde zone kunnen reizen. Geringe neerslag resulteert in minder watertransport en een lagere stroomsnelheid. Eerder BTO-SPO onderzoek laat zien dat er een minimum stroomsnelheid of waterhoeveelheid noodzakelijk is om de bacterie mobiel te laten zijn (Hornstra et al, 2018). Onder deze stroomsnelheid kan er nog wel watertransport plaatsvinden, maar worden bacteriën niet meer getransporteerd. Deze waarneming geeft aan dat een groot deel van de jaarlijkse neerslag mogelijk resulteert in een klein beetje transport van de bacteriën in de onverzadigde zone. Gedurende een langere tijd worden dan bacteriën "verzameld" in de onverzadigde zone. Deze waarneming resulteert in twee belangrijke vervolgvragen:

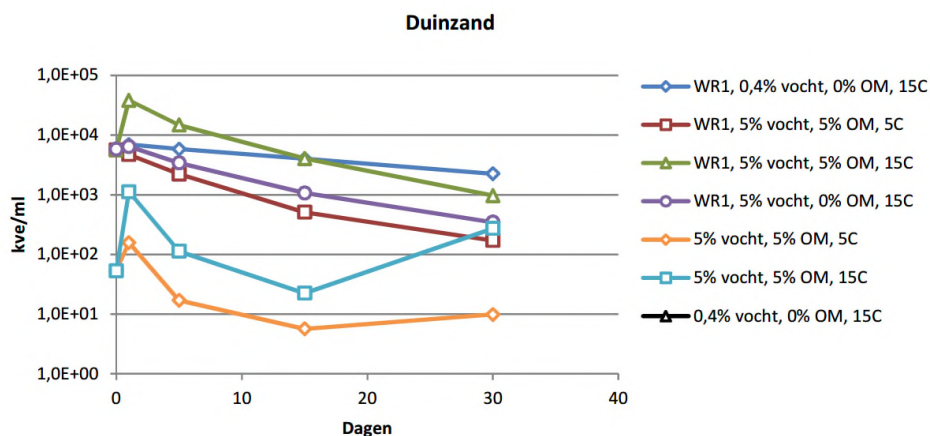
1. Hoe lang kunnen deze bacteriën in het duinzand levensvatbaar blijven?
2. Kunnen deze bacteriën weer mobiel worden als de stroming door de onverzadigde zone groot genoeg is.

Indien bacteriën lang in de onverzadigde zone kunnen overleven, dan is het weer mobiel worden van bacteriën in de onverzadigde als gevolg van bijvoorbeeld hevige regenval of het ophogen van de grondwaterspiegel mogelijk een oorzaak voor de regelmatig waargenomen bacteriën in het onttrokken water. In een dergelijke situatie wordt een groot deel van de eerder in de onverzadigde zone verzamelde bacteriën in één keer getransporteerd door de vloeistofstroom, wat kan zorgen voor een piek van deze bacteriën in het onttrokken water. In

dit onderzoek wordt specifiek gekeken naar de overleving van de bacteriën *E. coli* en *E. moraviensis* in duinzand van PWN. In een vervolgonderzoek zal moeten worden bepaald of en onder welke omstandigheden bacteriën die immobiel zijn geworden in de onverzadigde zone, weer mobiel kunnen worden.

## 1.2 Groei en overleving van bacteriën in zand, de huidige stand van zaken.

De huidige fecale indicator bacteriën *E. coli* en Enterococci zijn belangrijk in het huidige monitoringsprogramma, omdat ze een indicator zijn van fecale verontreiniging, en het water bij aanwezigheid van deze bacteriën vermoedelijk ook gecontamineerd kan zijn met virussen, bacteriën en protozoa van fecale herkomst die ziektes kunnen veroorzaken bij de mens. Daarbij wordt aangenomen dat deze bacteriën altijd afkomstig zijn van fecaliën afkomstig van warmbloedige dieren/mensen. Hierover is discussie, en in de literatuur is aangetoond dat onder bepaalde condities een aantal stammen van *E. coli* ('naturalized' *E. coli*) kunnen nagroeien in het milieu (Ishii et al., 2006, 2007, 2008). Wel is het waarschijnlijk mogelijk om naturalized *E. coli* genetisch te onderscheiden van fecale *E. coli* (Ishii, 2006). Groei van *E. moraviensis* is aangetoond op voedingsbodems met plantenextracten afkomstig uit het duin, maar niet in duinzand (Taucer et al, 2016). Daarnaast is de aanwezigheid van *E. moraviensis* aangetoond in de feces van ganzen, vossen en konijnen waarmee er een sterke indicatie is dat dit wel merker is voor fecale verontreiniging (Taucer et al, 2017). In het rapport BTO 2016.107 (van Bel et al, 2016) is groei van de fecale indicator bacterie *E. coli* in zand onderzocht, waarbij ook de groei in duinzand is bepaald. De temperatuur is hierbij erg belangrijk. Bij 15°C wordt wel groei waargenomen, maar bij 5°C niet. Ook de aanwezigheid van organische stof, bijvoorbeeld in de vorm van fecaliën of plantenmateriaal, is nodig om voor groei te kunnen zorgen. Een belangrijke conclusie is dat *E. coli* in zand kan groeien, maar dat dit vooral goed gaat in condities waar weinig tot geen concurrerende micro-organismen aanwezig zijn, zoals in steriel zand of entzand. In normaal duinzand is de concurrentie van de natuurlijk aanwezige populatie micro-organismen groot, en deze remmen de groei van de fecale indicator bacteriën. Verder is in de studie het lot van *E. coli* gedurende 30 dagen gevolgd.



Figuur 1.1. Groei en overleving van *E. coli* WR1 in duinzand onder verschillende condities (Uit van Bel, 2016)

In de bovenstaande figuur wordt bij 5°C nauwelijks tot geen groei waargenomen. Bij 15°C wordt initieel wel groei waargenomen, maar vooral indien 5% OM is toegevoegd. Verder laat deze figuur zien dat na een korte periode van groei afsterving plaatsvindt, en in ongeveer 30 dagen ligt de afsterving van *E. coli* WR1 rondom 1 log eenheid. Om te bepalen of bacteriën die aanwezig zijn in de onverzadigde zone daadwerkelijk een bedreiging kunnen vormen

voor het onttrokken water, is het van belang om te weten hoe lang de fecale indicator bacteriën onder werkelijke condities kunnen overleven. Deze informatie is niet voorhanden, en is daarom het onderwerp van deze studie.

Gebrek aan duidelijke informatie over overleving van bacteriën in de onverzadigde zone in de duinen is een missing link in de huidige risico modellen. Bij lange overleving kunnen levensvatbare bacteriën zich gedurende een seizoen ophopen in de onverzadigde zone (bijv. bij geregelde fecale depositie (ganzen en runderen)), om bij een hevige regenbui massaal uit te spoelen naar de verzadigde zone. Naast kennis over transport is kennis over de overleving daarmee cruciaal om te beoordelen of en wat het risico is van de ophoping van bacteriën in de onverzadigde zone. In dit onderzoek willen we de overleving vaststellen onder praktijk condities. Ook willen we onderzoeken of er al modelconcepten beschikbaar zijn voor het beschrijven van dit fenomeen. De complexiteit van het probleem maakt dat dit probleem een meerjarige aanpak vereist, waarin in een gestructureerde wijze de ontbrekende kennishiaten worden opgevuld. De resultaten van dit onderzoek maken deel uit van deze aanpak.

### 1.3 Doel van het onderzoek

Bepaal de overleving van *E. coli* en *E. moraviensis* in duinzand onder praktijkcondities en verken mogelijkheden om retentie en remobilisatie modelmatig te beschrijven.



## 2 Materiaal en Methoden

### 2.1 Proefopzet

*E. coli* en *E. moraviensis* worden homogeen gemengd met grond die afkomstig is uit het duingebied van PWN (ICAS). De grond met bacteriën wordt in potjes gedaan en afgedekt met een filterdoek, zodat transport van en zuurstof waterdamp mogelijk is. De potjes worden in een klimaatkamer bij de gemiddelde bodem temperatuur van 13°C en hoge luchtvochtigheid van >98% bewaard gedurende 150 dagen. In de periode van 0 tot 150 dagen worden op 12 verschillende tijdstippen potjes uit de klimaatkamer gehaald, en wordt het aantal *E. coli* en *E. moraviensis* in het zand bepaald door middel van kweek. Naast incubatie in zand wordt de overleving van deze bacteriën ook bepaald in water gedurende 150 dagen.

### 2.2 Karakterisatie van de bodem.

Er is bij PWN op 2 locaties zand verzameld op 20 juni 2017. Een locatie nabij Q600 en een locatie in gras naast een zweefvliegveld. De locaties zijn weergegeven in figuur 2.1. Locatie Q600 is enige jaren geleden opgehoogd om de dikte van de onverzadigde zone te vergroten. De locatie nabij het zweefvliegveld is in eerder BTO-SPO onderzoek in 2017 gebruikt, waar heterogeniteit in de onverzadigde zone is onderzocht. Het zweefvliegveld zelf is op een vergelijkbare wijze opgehoogd als locatie Q600. Door op deze locaties monsters te nemen kan worden aangesloten bij de resultaten en bevindingen uit het BTO-SPO onderzoek. Op beide locaties is zand van de bovenste 10 tot 20 cm (direct onder de toplaag) en zand van 60 tot 80 cm diepte onder maaiveld verzameld. Van de zandmonsters is de vochtigheid en het organische stof gehalte bepaald.



Figuur 2.1: Locatie waar de 2 zandmonsters zijn genomen.

### 2.3 Het bepalen van de vochtigheid van de aangeleverde bodem monsters.

De verzamelde grondmonsters zijn in zakken aangeleverd aan KWR en gekoeld opgeslagen. Na menging zijn per zak 5 submonsters genomen van ca. 50 gram. Hiervan is het veldvochtige gewicht ( $M_v$ ) bepaald. Na >48 uur drogen bij 105 °C is het drooggewicht ( $M_s$ ) van de submonsters bepaald. Uit het veldvochtige gewicht en het drooggewicht is vervolgens het gravimetrische vochtgehalte,  $w$  (gram water / gram bodem) afgeleid volgens:

$$w = \frac{(M_v - M_s)}{M_s}$$

### 2.4 Het bepalen van het organische stof gehalte van de aangeleverde bodem monsters.

Het organische stofgehalte van de bodem (SOM) is bepaald met de Loss-on-ignition (LOI) methode. Bij deze methode worden de bodemmonsters verhit tot zeer hoge temperaturen waardoor (afhankelijk van de temperatuur) water, organisch materiaal en eventueel andere stoffen in de gasvorm het bodemmonster verlaten. Door het gewicht voor en na verhitting te meten wordt inzicht verkregen in de hoeveelheid materiaal die bij een bepaalde temperatuur uit het bodemmonster is verwijderd.

Elk van de voor het bepalen van veldvochtigheid gedroogde bodemmonsters is gezeefd met een 2 mm zeef om grote wortels te verwijderen. Vervolgens is het bodemmateriaal gemalen in een vijzel. Na droging bij 105 °C is het gewicht van keramische schaaltes gewogen en genoteerd. Aan de schaaltes is vervolgens ca. 2.5 gram gemalen bodem toegevoegd, waarna de schaaltes wederom 2 uur zijn gedroogd bij 105 °C. Na afkoeling in een dessicator is het drooggewicht gemeten en genoteerd (drooggewicht<sub>105°C</sub>, g). Vervolgens zijn de monsters 4 uur lang verhit bij 550 °C (verbranding organische stof). Na afkoeling in een dessicator is wederom het gewicht van de grond gemeten (drooggewicht<sub>550°C</sub>, g). Het organische stofgehalte (SOM) is vervolgens berekend volgens:

$$SOM = 100 \cdot \frac{(\text{drooggewicht}_{105^\circ\text{C}} - \text{drooggewicht}_{550^\circ\text{C}})}{\text{drooggewicht}_{105^\circ\text{C}}}$$

### 2.5 Bacteriën

Voor deze experimenten zijn *Escherichia coli* PWN 831804-1 (24-12-14) en *Enterococcus moraviensis* gebruikt. Beide stammen zijn afkomstig uit het onttrokken water van PWN en ter beschikking gesteld door HWL. Deze stammen zijn afzonderlijk opgekweekt in 1 liter Luria Broth medium bij 37°C gedurende ongeveer 3 dagen. De bacteriën werden geoogst door middel van centrifugeren en 3 keer gewassen in steriel leidingwater om restanten van het groeimedium te verwijderen.

Tabel 2.1. De concentratie van bacteriën in de stockoplossingen.

Bacterie	Concentratie van de bacteriesuspensie kve/ml
<i>E coli</i>	$2,25 \times 10^9$
<i>E moraviensis</i>	$1,74 \times 10^8$

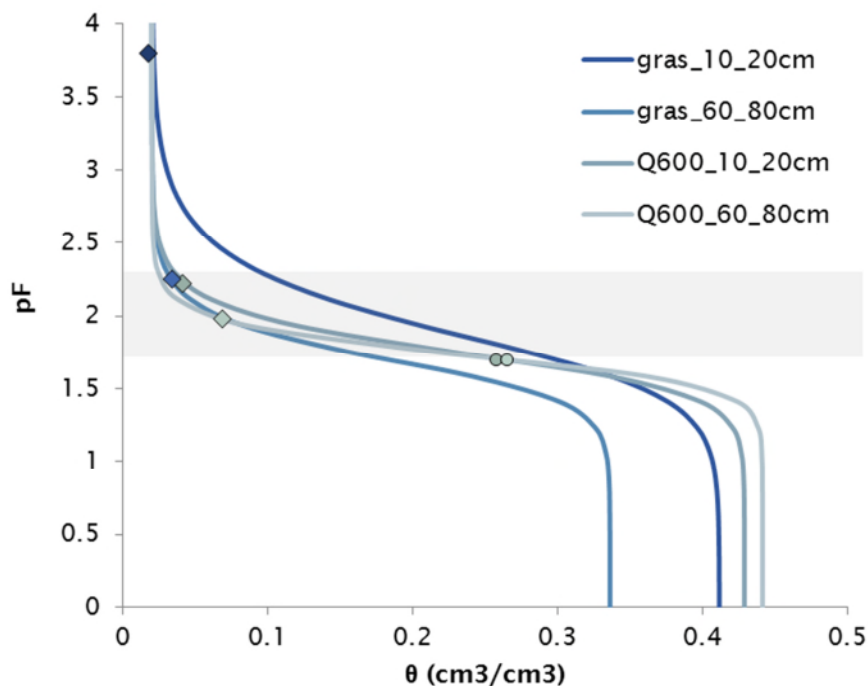
Het zand van de locatie Q600 is geselecteerd voor de incubatie met bacteriën. Voorafgaand aan de proef werden de bacteriën homogeen gemengd met het zand van de locatie Q600. In onderstaande bespreken we de gehanteerde procedure.

De incubatieproeven worden uitgevoerd bij relatief vochtige omstandigheden, en bij een gelijke temperatuur als de bodemtemperatuur. Om te bepalen hoeveel bacteriesuspensie hiervoor aan het bemonsterde zand kan worden toegevoegd, is gebruik gemaakt van voor de bodems gemeten waterretentie (pF) curves (Figuur 2.1). Uit deze curves komt een vlak verloop naar voren in het traject rond veldcapaciteit. Besloten is dat de incubatiecondities qua vochtgehalte rond de onderzijde van dit traject moeten vallen (pF 1.7). Aan de 3.2 kg veldvochtige bodem van Q600 10-20 cm en Q600 60-80 cm is hiervoor respectievelijk 390,8 ml en 400,5 ml bacteriesuspensie toegevoegd. De toevoeging van deze hoeveelheid bacteriesuspensie resulteert voor beide bodemmonsters in een acceptabel relatief vochtgehalte ( $\theta / \theta_{sat}$ ) van ca. 0.6, wat representatief is voor een zuigspanning van pF 1.7.

De berekende bacterieconcentratie is:

Tabel 2.2 Bacterieconcentratie Incubatieproef

Bodemlaag	Hoeveelheid veldvochtige bodem (kg)	Bacteriesuspensie (ml)	KVE /gram zand
Q600 10-20cm	3,2	390,8	<i>E. coli</i> $1.22 \times 10^7$ <i>E. moraviensis</i> $9,47 \times 10^5$
Q600 60-80cm	3,2	400,5	<i>E. coli</i> $1.25 \times 10^7$ <i>E. moraviensis</i> $9,67 \times 10^5$



Figuur 2.1 Karakteristieke pF curves (vochtgehalte vs zuigspanning) voor de in deze studie onderzochte bodemlagen. De gemeten initiële vochtgehalten van de bodemmonsters en daarbij passende waarden voor de zuigspanning zijn weergegeven met diamantjes. Met cirkeltjes zijn de vochtcondities in de Q600 monsters na dosering weergegeven

Per bodemlaag zijn 40 potjes gevuld met elk 80 gram bodemmateriaal. Voor elk tijdstip zijn 3 potjes ingezet. De potjes zijn afgedekt met filterdoek (140-160 µm) om zuurstof en vochtuitwisseling mogelijk te maken en bij 13°C en een luchtvochtigheid van >96% bewaard gedurende 150 dagen. De data en monsterdagen zijn weergegeven in tabel 2.3.

Tabel 2.3. De tijdstippen van monsternamen en de data.

Dag bemonstering	Datum
0	4-7-2017
1	5-7-2017
3	7-7-2017
6	10-7-2017
9	13-7-2017
15	19-7-2017
20	24-7-2017
30	1-8-2017
50	23-8-2017
70	11-9-2017
100	11-10-2017
150	29-11-2017

Voor het bepalen van het aantal levensvatbare *E. coli* en *E. moraviensis* in de bodemmonsters is de volgende procedure gehanteerd. Per tijdstip worden 3 potjes uit de klimaatkamer gehaald. Alle zand uit een potje (80 gram) wordt verzameld en gemengd met 500 ml steriel leidingwater. De fles met het zand/water mengsel wordt 2 minuten geschud, waarna 2 minuten wordt gewacht om het zand te laten bezinken. Vervolgens wordt de bovenstaande vloeistof afgeschonken. In dit volume vloeistof is vervolgens het aantal *E. coli* en *E. moraviensis* bepaald (3 spatel platen). *E. coli* is in verschillende verdunningen uitgeplaat op Laurylsulfaat-agar (LSA) met incubatie bij 44°C. *E. moraviensis* is in verschillende verdunningen uitgeplaat op Slanetz and Bartley medium (S&B-medium) met incubatie bij 37°C, waarna op de relevante verdunningen de kolonies zijn geteld.

## 3 Resultaten en Discussie

### 3.1 Resultaten van de bodemanalyse

Zoals aangegeven in het vorige hoofdstuk zijn op twee locaties grondmonsters genomen. Van deze monsters is het vochtgehalte en het percentage organische stof bepaald (Tabel 3.1). In overleg met PWN is het zand van locatie Q600 gekozen voor incubatie met bacteriën. Deze locatie is namelijk een aantal jaar daarvoor opgehoogd om de onverzadigde zone te vergroten en is representatief voor de bodemopbouw rond de winputten van PWN. Door het ophogen is het oorspronkelijke maaiveld begraven onder een laag duinzand dat relatief arm is aan organische stof. In de opgebrachte laag is nog vrijwel geen bodemvorming zichtbaar terwijl die wel zichtbaar is in het onderliggende begraven profiel. Dit is tevens de verklaring voor het bij Q600 lagere gehalte organische stof op 10-20 cm diepte vergeleken met het grondmonster afkomstig van 60-80 cm diepte. Het bodemprofiel op de 'gras' locatie is representatief voor de oorspronkelijke duinbodem.

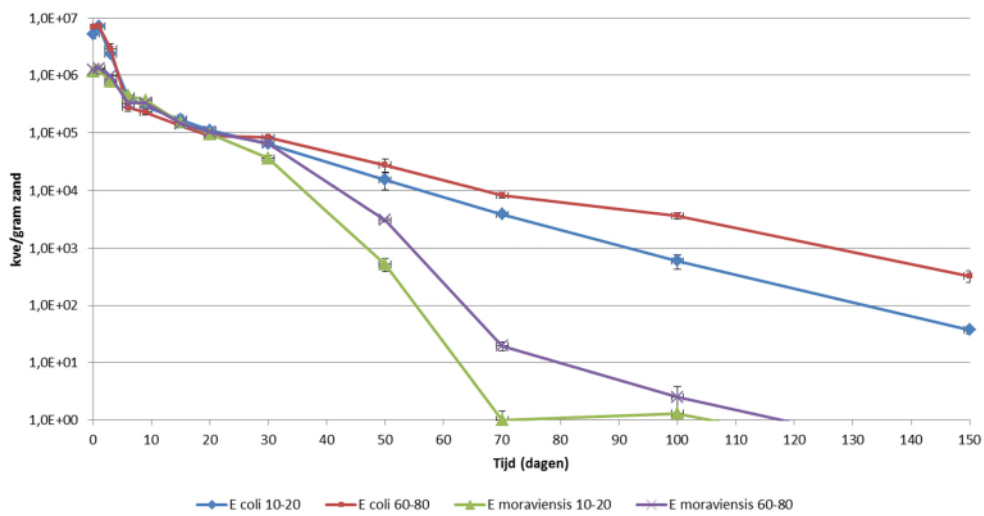
Het vochtgehalte van de genomen bodemmonsters ligt voor drie van de monsters binnen het traject veldcapaciteit i.e. gemiddelde veldvochtige condities. Het monster genomen bij locatie 'gras' op 10-20 cm diepte is beduidend droger. Op deze locatie zijn bij eerder onderzoek (BTO-SPO) duidelijke aanwijzingen voor hydrofobie geconstateerd. De hier bemonsterde laag was ook toen zeer droog met uitzondering van enkele preferente stroompaden.

Tabel 3.1 De vochtigheid en het percentage organische stof van de locaties

Bodemlaag	SOM (%)	Gravimetrisch vochtgehalte (g water/g droge bodem)
Q600_10_20cm	0.69 ± 0.23	0.041 ± 0.012
Q600_60_80cm	1.09 ± 0.05	0.069 ± 0.001
gras_10_20cm	1.15 ± 0.01	0.018 ± 0.001
gras_60_80cm	0.70 ± 0.06	0.034 ± 0.001

### 3.2 Afsterving van *E. coli* en *E. moraviensis* in duinzand

De afsterving van *E. coli* en *E. moraviensis* is bepaald in duinzand gedurende 150 dagen incubatie na dosering. Voorafgaand aan het experiment is het initiële aantal *E. coli* en *E. moraviensis* bacteriën bepaald in het bemonsterde bodemmateriaal bij Q600. In deze monsters werden geen *E. coli* en *E. moraviensis* aangetroffen, dit impliceert dat in het bodemmateriaal van locatie Q600 geen achtergrond van natuurlijke *E. coli* en *E. moraviensis* aanwezig is.



Figuur 3.2 Afsterving van *E. coli* en *E. moraviensis* in duinzand afkomstig van 10 tot 20 cm en 60 tot 80 cm onder maaiveld.

Gedurende de eerste 30 dagen is het aantal bacteriën bepaald op dag 0, dag 1, 3, 6, 9, 15, 20 en 30. Zowel *E. coli* en *E. moraviensis* laat in de 1<sup>e</sup> dag een geringe groei zien in beide bodemlagen. In beide bodems is organisch materiaal aanwezig, waardoor een geringe groei van de bacteriën mogelijk is. Daarna stopt groei en neemt het aantal bacteriën in de bodem af. De afsterving van *E. coli* gaat in de eerste 6 dagen relatief snel, met een afname van 1,1 log in 6 dagen. Vanaf dag 6 verloopt de afsterving minder snel en nagenoeg (Log)lineair. In totaal laat *E. coli* in 150 dagen een afsterving zien van 5,1 respectievelijk 4,3 logeenheden voor de bodemlagen van 10-20 en 60-80 cm.

Afsterving van *E. moraviensis* verloopt in de eerste 30 dagen ongeveer lineair en verloopt in beide bodemlagen met een afsterving van 1,3 en 1,5 logeenheden in 30 dagen nagenoeg gelijk. Daarna gaat de afsterving sneller, en neemt het aantal *E. moraviensis* in 70 dagen af tot de detectiegrens voor het monster van 10 tot 20 cm. Afsterving in het bodemmateriaal van 60-80 cm verloopt wat langzamer, en in het monster van 100 dagen worden nog een gering aantal levensvatbare *E. moraviensis* waargenomen. In het monster van 150 dagen incubatie is geen *E. moraviensis* meer aangetroffen. Tussen de 100 en 150 dagen incubatie is het aantal *E. moraviensis* hiermee afgenomen tot onder de detectiegrens. Dit betekent dat in de bodem van 10 tot 20 cm een afsterving is waargenomen van 6,1 logeenheden in 70 dagen, en in de bodem van 60-80 cm dezelfde afsterving van 6,1 logeenheden is waargenomen, maar dan in een periode van minder dan 150 dagen.

Tabel 3.2. De afsterving van *E. coli* en *E. moraviensis* in duinzand bij 13°C in log kve/dag.

	Bodem 10-20 cm	Bodem 60-80 cm
<i>E. coli</i> (150 dagen)	0,034	0,029
<i>E. moraviensis</i> (70 dagen)	0,087	0,069

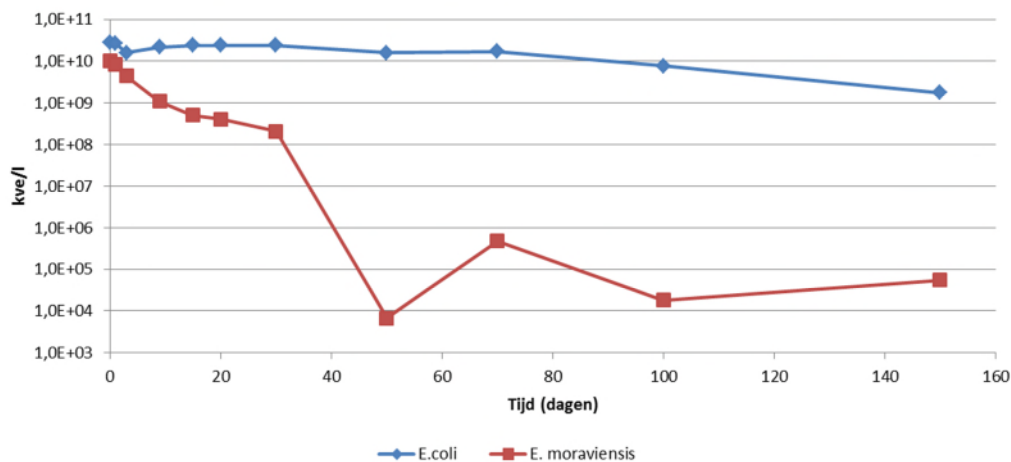
Voor zowel *E. coli* als *E. moraviensis* is voor alle tijdstippen waargenomen dat afsterving van deze bacteriën sneller verloopt in bodemmateriaal van 10 tot 20 cm dan in bodemmateriaal van 60 tot 80 cm. Dit heeft als consequentie dat hoe verder bacteriën in de onverzadigde zone kunnen doordringen, des te langzamer de afsterving van deze bacteriën verloopt. Met andere woorden: bacteriën die als gevolg van hevige regenval ver in de onverzadigde zone

zijn doorgedrongen, en daarna immobiel worden door een verminderende vloeistofstroom, overleven beter dan bacteriën die in het bovenste deel van de onverzadigde zone immobiel zijn geworden. Afsterving van bacteriën is een combinatie van intrinsieke afsterving van een bacteriepopulatie, en omgevingsfactoren zoals de aanwezigheid van zuurstof, de temperatuur etc. Onder veldcondities speelt ook competitie met de natuurlijke populatie micro-organismen en predatie een rol. Het duinzand van 10-20 en 60-80 cm bevat de natuurlijke populatie micro-organismen. Met het toenemen van de diepte neemt de microbiële activiteit in een zandbodem af (Taylor, 2002). In de bovenste 10-20 cm is meer microbiële activiteit en daarmee meer competitie om voedingsbronnen, en meer predatie door hogere organismen zoals protozoa. De waarneming dat inactivatie van de gedoseerde *E. coli* als *E. moraviensis* sneller verloopt in de bovenste 10 tot 20 cm bodemlaag dan in de laag van 60-80 cm (Tabel 3.2), is waarschijnlijk het gevolg van de hogere microbiële activiteit en predatiedruk in deze bodemlaag. Ondanks de aanwezigheid van de natuurlijke micro-organismen is de overleving in duinzand echter lang. De gebruikte *E. coli* en *E. moraviensis* stam zijn isolaten uit door PWN eerder onttrokken duinwater, en dus afkomstig zijn vanuit het duingebied. Het is niet bekend in hoeverre de herkomst van de bacteriën van invloed is op de overleving, bijvoorbeeld natuurlijke isolaten versus labstammen afkomstig van een stammen collectie.

Predatie van protozoa op bacteriën in bodem is geregeld bestudeerd, o.a. bij *Salmonella* waar blijkt dat met name de temperatuur een effect heeft op de mate van predatie (Garcia et al, 2010). Een hogere temperatuur resulteert in meer predatie, maar ook bij een temperatuur van 15°C is predatie een belangrijke factor. Het is daarom ook zeer goed mogelijk dat predatie ook in onze bodemmonsters optreedt en voor een deel verantwoordelijk is voor de reductie van de gedoseerde bacteriën. De geringe afsterving in steriel leidingwater (zie paragraaf 3.3), zonder concurrerende bacteriën en in afwezigheid van predatoren, is een indicatie dat onder natuurlijke omstandigheden deze processen een mogelijk een belangrijke factor zijn voor de overleving van bacteriën onder natuurlijke condities.

### 3.3 Afsterving van *E. coli* en *E. moraviensis* in water

Figuur 3.3 laat de afsterving van *E. coli* en *E. moraviensis* zien in steriel leidingwater, bij 13°C gedurende 150 dagen. Uit deze figuur blijkt dat *E. coli* in deze tijd nauwelijks afsterft. Na 150 dagen incubatie is het verschil tussen het aantal levensvatbare *E. coli* op dag 0 en dag 150 slechts 1.2 logeenheden. *E. moraviensis* sterft in steriel leidingwater sneller af dan *E. coli*, de totale afsterving in 150 dagen bedraagt 5,3 logeenheden.



Figuur 3.3 Overleving van *E. coli* en *E. moraviensis* in steriel leidingwater.

### 3.4 De onverzadigde zone als barrière en als reservoir voor bacteriën

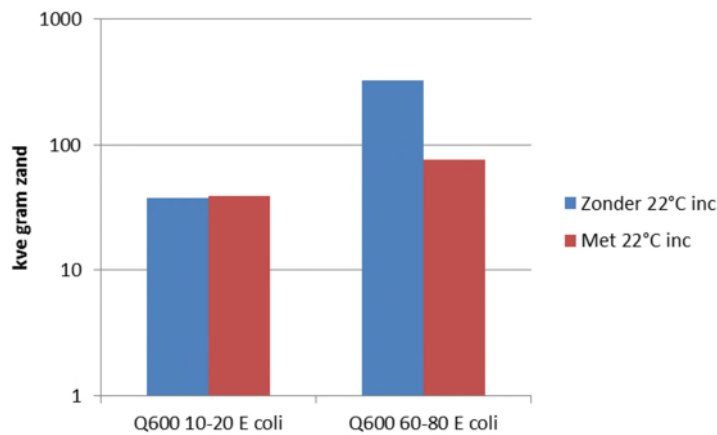
Zowel in water als in duinzand blijkt de in deze studie gebruikte *E. coli* soort meer dan 150 dagen te kunnen overleven, waarbij in steriel leidingwater de reductie slechts 1,2 logeenheden en in duinzand 4,3 – 5,1 logeenheden bedraagt over deze periode. *E. moraviensis* overleeft minder lang in zowel steriel leidingwater als duinzand, maar na 2 maanden incubatie zijn er nog steeds levensvatbare *E. moraviensis* aanwezig. Hieruit kan worden geconcludeerd dat bacteriën die inspoelen in de onverzadigde zone, gedurende geruime tijd langzaam in concentratie omlaag gaan.

De aanvoer op het maaiveld van *E. coli* en *E. moraviensis* en andere fecale micro-organismen, waaronder zoonotische pathogene bacteriën en parasieten, kan door de aanwezigheid dieren zoals ganzen of runderen in bepaalde perioden van het jaar groot zijn. Door neerslag zal een deel van de in de feces aanwezige micro-organismen uitspoelen naar de onverzadigde zone. Hevige regenbuien, maar ook lokale bodemeigenschappen (o.a. hydrofobie) en topografische kenmerken van het landschap (oppervlakkige afstroming naar laag gelegen terreindelen) kunnen resulteren in kortsluitstromingen, die wellicht af en toe zelfs direct de verzadigde zone kunnen bereiken. De bulk van de inspoelende fecale micro-organismen zal echter in de onverzadigde zone achterblijven. Deze studie laat zien dat de afsterving in de onverzadigde zone van de fecale indicatorbacteriën onder praktijkcondities maar langzaam verloopt. De verwachting is dat in en na periodes van het jaar met veel fecale depositie en regenval, het aantal inspoelende bacteriën in de onverzadigde zone duidelijk kan toenemen. Doordat de afsterving langzaam verloopt wordt de onverzadigde zone hiermee een reservoir voor bacteriën van fecale herkomst. Of humane ziekteverwekkers dezelfde eigenschappen hebben voor wat betreft hechting aan de bodem, en eventuele remobilisatie als de fecale indicator bacteriën is niet bekend. Ook is de afstervingskinetiek van ziekteverwekkers in de bodem niet bekend. Het blijft daarom belangrijk om vanuit gezondheidskunde betekenis zoveel mogelijk de koppeling te maken tussen fecale indicator organismen en de daadwerkelijke ziekteverwekkers (als deze informatie voorhanden is).

### 3.5 Incubatie van zandmonster bij 22°C na 150 dagen.

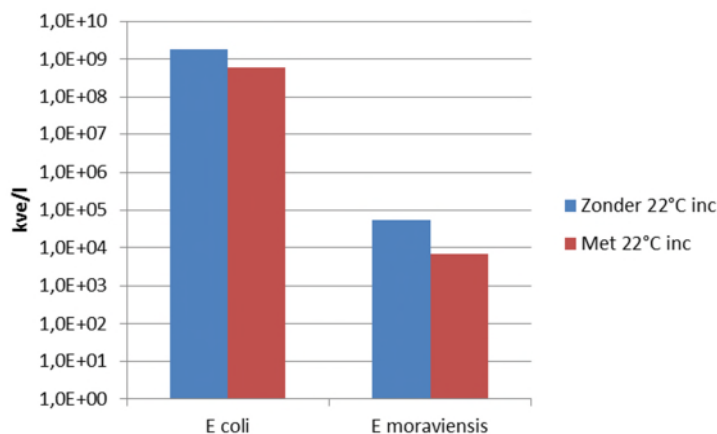
Na 150 dagen incubatie bij 13°C worden in de zandmonsters nog steeds levensvatbare *E. coli* waargenomen. *E. moraviensis* is niet meer aanwezig, of onder de detectiegrens. In de eerste fase van de incubatie is groei van *E. coli* waargenomen. Kennelijk is *E. coli* in staat om, al dan niet tijdelijk, te groeien onder veldcondities. Dit roept de vraag op of de nog aanwezige levensvatbare *E. coli* weer zullen groeien als de milieuomstandigheden gunstiger worden. Om dit te onderzoeken is een aanvullend experiment opgezet waarbij de incubatietemperatuur van een deel van de bodemmonsters na de incubatieperiode van 150 dagen is verhoogd van 13°C naar 22 °C. Er zijn geen nutriënten toegevoegd. Na 10 dagen incubatie bij deze temperatuur is het aantal *E. coli* bepaald in de zandmonsters (figuur 3.4). Hetzelfde is gedaan met het watermonster waarin zowel *E. coli* als *E. moraviensis* aanwezig is (figuur 3.5).





Figuur 3.4. De aantallen *E. coli* in bodemmateriaal van 10-20 en 60-80 cm diepte voor en na 10 dagen incubatie bij 22°C, nadat de *E. coli* eerst 150 dagen is bewaard bij 13°C.

Figuur 3.4 laat zien dat de aantallen *E. coli* in het bodemmateriaal na incubatie bij 22°C niet toenemen. In het bodemmateriaal van 10-20 cm blijven ze ongeveer gelijk, en in het bodemmateriaal van 60-80 cm neemt het aantal *E. coli* bacteriën af. Hieruit kan worden geconcludeerd dat *E. coli* bij alleen een hogere temperatuur niet gaat groeien in de duinbodem. Zowel in deze studie (paragraaf 3.2) als in eerder onderzoek (van Bel et al, 2016) is groei van *E. coli* in duinzand wel aangetoond, maar direct na introductie van *E. coli* in duinzand. Blijkbaar kan *E. coli* beperkt groeien in duinzand in die situatie, maar treedt verder geen groei op onder de geteste condities. Mogelijk zou groei op kunnen treden onder nutriëntrijke condities en bij hogere temperaturen. Gezien de over het algemeen nutriëntarme omstandigheden in de duinen is de verwachting dat de combinatie van een hoge temperatuur en de additie van nutriënten lokaal wel kan voorkomen, bijvoorbeeld in de bodem onder (zware) fecale depositie of door de aanwezigheid/ontbinding van dode dieren.



Figuur 3.5. De aantallen *E. coli* en *E. moraviensis* in steriel leidingwater voor en na 10 dagen incubatie bij 22°C, nadat deze bacteriën eerst 150 dagen zijn bewaard bij 13°C.

Ook bij de overlevende bacteriën in het steriele leidingwater wordt geen groei waargenomen na verhoging van de temperatuur (Figuur 3.5). De bacteriën nemen in aantal af. Net zoals bij de incubatie in zand is ook hier de temperatuur alleen niet voldoende om groei te

bewerkstelligen. Voor groei is toevoeging van voedingsstoffen noodzakelijk. Het is bekend dat temperatuur een belangrijke factor is bij de overleving van bacteriën in water, waarbij een hogere temperatuur resulteert in meer afsterving. Dit sluit aan bij onze metingen die eveneens een hogere afsterving indiceren bij incubatie bij 22°C ten opzichte van incubatie bij 13°C (Tabel 3.2).

Tabel 3.2. De afsterving van *E. coli* en *E. moraviensis* in steriel leidingwater bij 13°C en bij 22°C in log kve/dag.

	150 dagen bij 13°C	10 dagen bij 22°C
<i>E. coli</i>	0,0079	0,0491
<i>E. moraviensis</i>	0,0351	0,0900

### 3.6 Groei van *E. coli* en *E. moraviensis* in duinzand.

Op basis van eerdere literatuur lijkt groei van *E. coli* onder bepaalde omgevingscondities mogelijk. Groei van en *E. moraviensis* is niet eerder waargenomen in duinzand maar wel op plantenextracten (Taucer 2016). Figuur 3.2 laat voor zowel *E. coli* als *E. moraviensis* een geringe groei zien in de eerste dagen na inoculatie van het bodemmateriaal met bacteriën. Daarna neemt het aantal bacteriën geleidelijk af. Groei is dus wellicht mogelijk in het duinzand, maar dan vanaf een bepaalde temperatuur en in de aanwezigheid van voldoende afbreekbaar organisch materiaal. Daarnaast speelt de aanwezigheid van de natuurlijk aanwezige microbiologische populatie een grote rol, en eerder onderzoek laat zien dat zowel *E. coli* als *E. moraviensis* in competitie met van nature aanwezige bacteriën minder goed kan groeien (Taucer-Kapteijn, 2017). Groei in duinzand kan niet worden uitgesloten, en mocht dit optreden, dan is het gerelateerd aan de aanwezigheid van voedingsstoffen, de overige microbiologische gemeenschap en een voldoende hoge temperatuur.

### 3.7 Retentie en remobilisatie van fecale microorganismen in de onverzadigde zone

De onverzadigde zone is een belangrijke barrière tegen het doordringen van ongewenste (fecale) micro-organismen naar het grondwater. Echter, met enige regelmaat worden tijdens reguliere bemonstering toch indicator organismen voor fecale besmetting aangetroffen in het onttrokken water. Binnen BTO speerpuntonderzoek voor PWN is vastgesteld dat na een gesimuleerde zeer zware regenbui (50 mm/4uur), zowel *E. coli* als *E. moraviensis* via preferente banen binnen een dag tot ca. één meter diepte in de bodem worden getransporteerd. Vooral deze eerste zware bui bleek hierbij het transportmiddel voor de bacteriën, daarna lijken de bacteriën zich vrijwel niet verder te verplaatsen ondanks een aantal navolgende (natuurlijke) regenbuien. Uit dit onderzoek blijkt vervolgens dat *E. coli* en *E. moraviensis* zich enige maanden in levensvatbare vorm kunnen handhaven in de duinbodem.

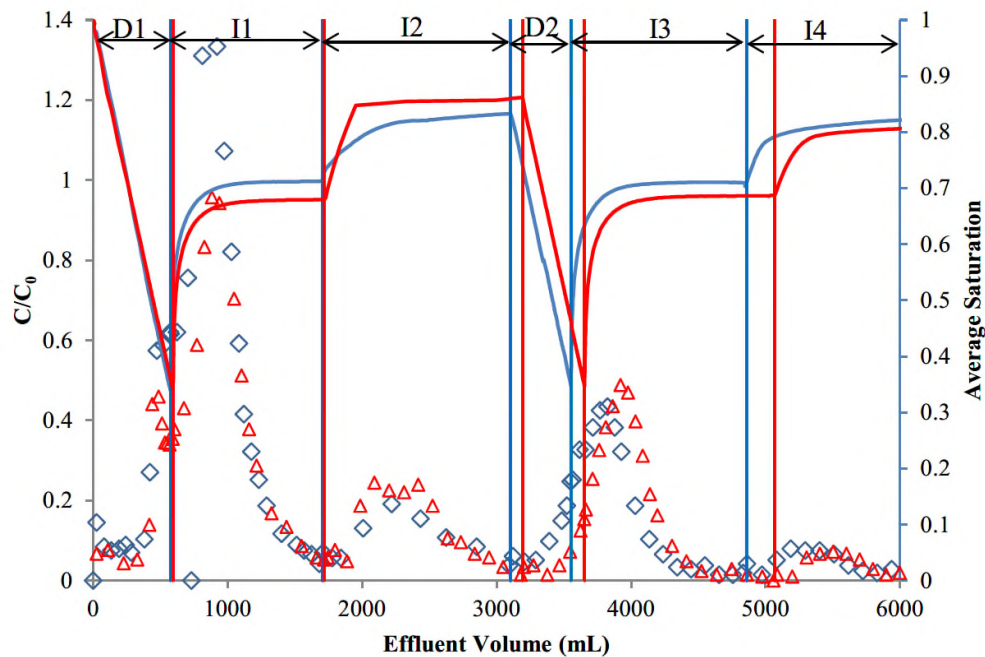
Een hypothetisch model voor de geconstateerde besmettingen zou daarom kunnen zijn dat fecale depositie van vogels of andere dieren een bron is voor bacteriën. Deze bacteriën worden door regen getransporteerd in de bodem. De intensiteit van regenval en de heterogeniteit van de bodem bepaalt hoe diep de bacteriën in de bodem kunnen doordringen. Na het initiële transport neemt de vloeistofstroom af, waardoor de bacteriën worden opgesloten in het steeds verder afnemende volume vloeistof rondom de korrels. Op een bepaald moment is de vloeistoffilm dermate dun, dat de bacterie dichtbij of tegen de zandkorrels komen. Of ze aan de zandkorrels of bodemdeeltjes gaan hechten is niet bekend. Indien hechting plaatsvindt, dan zijn bacteriën mogelijk niet direct met een vloeistofstroom weer te mobiliseren. Kunnen ze wel gemakkelijk mobiel worden, dan is de aanwezigheid van een reservoir van fecale bacteriën en fecale indicator bacteriën ongewenst. Een hevige

regenbui of het verhogen van de grondwaterspiegel kan in dat geval de (nog steeds levensvatbare) bacteriën mobiliseren, die door middel van verzadigd transport snel naar de winputten worden gevoerd. Bij een aantal bedrijven zijn er aanwijzingen dat besmettingen vaker optreden bij hevige regenval direct na een langere droge periode. Statistisch bewijs voor deze relatie is er echter niet.

Het is op dit moment niet duidelijk of, en zo ja in welke mate bacteriën (en specifiek *E. coli*) weer mobiel zullen worden in de onverzadigde duinbodem. In recente wetenschappelijke literatuur (zie o.a. Zhang et al. 2012; Wang et al., 2014 en Bradford et al, 2015) zijn hier echter wel aanwijzingen voor te vinden. Binnen de in deze artikelen beschreven studies zijn kolomexperimenten uitgevoerd waarbij een plotselinge sterke verandering van het vochtgehalte en de flux is gesimuleerd na initiële retentie van bacteriën in de kolom bij een stationaire vloeistofstroom. Uit deze studies blijkt dat een groot aantal bacteriën vastloopt tijdens het initiële transport. Hierbij speelt ook de waterverzadiging een rol, de retentie is hoger bij een lagere waterverzadiging. Gargiulo et al. (2008) schrijven dit toe aan straining doordat bij lagere verzadiging transport vooral plaatsvindt in smallere poriën. Wang et al. (2014) geven echter aan dat lagere waterverzadiging ook zal resulteren in meer hechting aan lucht-watergrensvlakken.

Zowel bij het plotseling draineren van de kolommen als bij het plots vullen van poriën (imbibitie) door de watertoevoer aan de bovenzijde te vergroten of de druk aan de onderzijde van de kolommen te verhogen blijken bacteriën weer mobiel te worden (Wang et al., 2014). Drainage van poriën zal bijvoorbeeld optreden bij verlaging van de grondwaterstand door onttrekking, terwijl imbibitie zal optreden bij (hevige) neerslag of het verhogen van de grondwaterstand.

Uit de studie van Wang et al. blijkt verder dat remobilisatie van bacteriën op het lucht-water grensvlak makkelijker gaat dan remobilisatie van bacteriën op het bodem-water grensvlak. Hierdoor zal imbibitie vooral het vrijkomen van bacteriën die zijn vastgelopen onder onverzadigde condities faciliteren, drainage naar lagere vochtgehalten resulteert hier bovenop in vrijkomen van bacteriën van het bodem-water grensvlak. Wang et al. (2014) concluderen verder dat door het verwaarlozen van niet-stationaire stroming en de hierdoor veroorzaakte remobilisatie van bacteriën de barrièrewerking van de onverzadigde zone mogelijk wordt overschat. Dit kan resulteren in een hoger risico voor contaminatie van het grondwater. Zij pleiten dan ook voor aanvullend experimenteel onderzoek naar remobilisatie van bacteriën.



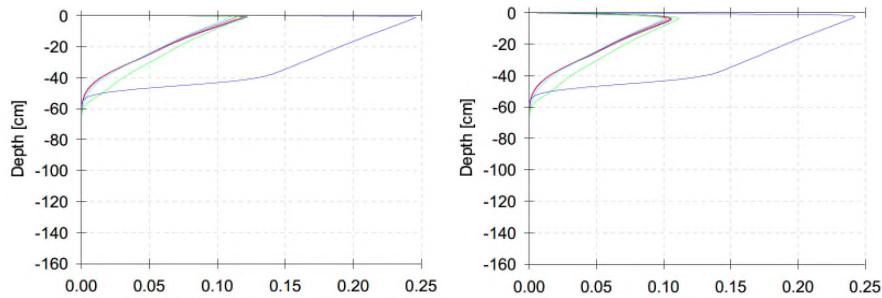
Figuur 3.6 Mobilisatie van *E. coli* D21g tijdens twee vergelijkbare experimenten met afwisselende cycli van drainage (D) en imbibitie (I). De doorgetrokken lijnen geven het verloop van het gemiddelde vochtgehalte weer. De driehoekjes en diamantjes geven het verloop van de uitspoelende bacteriën weer (bron: Wang et al, 2014)

### 3.7.1 Modelleren van retentie en remobilisatie van bacteriën

Een van de doelen binnen dit onderzoek was het verkennen van mogelijkheden om het transport van bacteriën in de onverzadigde zone te modelleren. Hiervoor zijn verschillende modelconcepten beschikbaar en geïmplementeerd in hydrologische software zoals Hydrus-1D. Uit de vorige paragraaf blijkt dat juist het kunnen modelleren van remobilisatie cruciaal is voor het simuleren van passage van micro-organismen door de onverzadigde zone. Consensus over goede modelformuleringen voor het simuleren van deze remobilisatie is er echter nog niet. Een recente en veelbelovende bijdrage is die van Bradford et al. (2015). Zij presenteren een model dat de relatie legt tussen colloid remobilisatie als gevolg van veranderingen van het oppervlak van het lucht-water-bodem grensvlak bij veranderende vochtgehaltenes. Het remobilisatie model vraagt om optimalisatie van twee parameters op gemeten data. Het gaat hierbij om de fractie micro-organismen dat vrijkomt van het bodem-water grensvlak en om de fractie micro-organismen die partitioneert van het bodem-water grensvlak naar het lucht-water grensvlak. Dit model is door Bradford et al. (2015) toegepast op de experimentele resultaten van Wang et al. (2014), waarbij de initiële condities (retentie) zijn gefit met een attachment/detachment model in Hydrus-1D.

Bij de experimenten van Wang et al (2014) is voor het vullen van de kolommen gebruik gemaakt van zogenaamd 'Ottawa sand'. De retentie-eigenschappen van dit zand vallen binnen de range van voor Nederlands duinzand afgeleide parameterwaarden. Deze studie richtte zich verder specifiek op retentie en remobilisatie van *E. coli* (d21g) in de onverzadigde zone wat goed aansluit bij de vragen over remobilisatie van *E. coli* in de Nederlandse situatie. De door Bradford et al. 2015 gefitte retentieparameters zijn toegepast bij een verkennend Hydrus-1D model van inspoeling van micro-organismen bij een bui van 50 mm/4uur. Deze opzet komt overeen met die bij Solleveld en recent bij het onderzoek naar kortsluitstroming bij PWN. Uit de verkennende berekeningen blijkt een snelle inspoeling

binnen de eerste dag tot ca. 60 cm - mv. Met het droger worden van de bodem wordt een steeds groter aandeel van de micro-organismen immobiel. Het front verplaatst zich daarom na de initiële instroom nagenoeg niet meer. Naspoelen met een constante grondwateraanvulling van 300 mm/jr (0.034 mm/uur) geeft nagenoeg geen verdere verplaatsing van het front (Figuur 3.7). Deze bevinding ondersteunt de hypothese van reservoirvorming in de ondergrond na zware buien.



Figuur 3.7 Concentratie ( $C/C_0$ ) micro-organismen in de waterfase (inclusief lucht-water grensvlak) na inspoeling met 50 mm/4 uur (links) en dezelfde situatie met naspoelen met 0.034 mm/uur. Voor het attachment/detachment model is gebruik gemaakt van parameterisatie 4a uit Bradford et al. (2015). De blauwe lijn geeft de concentratie na 24 uur weer, de overige lijnen steeds 24 uur later.

De berekende inspoeldiepte en de observatie dat de micro-organismen na het initiële transport snel immobiliseren zijn in lijn met veldobservaties bij de Castricum-experimenten. Opgemerkt moet worden dat in Castricum preferente stroming optrad. Hierdoor is de flux lokaal hoger dan bij gelijkmatige infiltratie en konden micro-organismen wat dieper (tot ca. 1 m) in de bodem doordringen.

De volgende stap is het simuleren van remobilisatie. Het model van Bradford et al (2015) geeft voor de data van Wang et al. (2014) redelijke resultaten. Dit geeft gezien de complexiteit van de materie vertrouwen in het conceptuele model. De gefitte parameterwaarden bleken echter niet uniek voor elke cyclus. Bij een vergelijkbaar vochtgehalte nemen de per cyclus gefitte parameterwaarden af met een toenemend aantal cycli. Bij steeds verder afnemend vochtgehalte blijven de parameterwaarden per cyclus wel constant. Het lijkt hierdoor nog te vroeg om het modelconcept te gebruiken voor simulaties. Bradford et al. (2015) roepen dan ook op om meer kolomproeven naar dit fenomeen uit te voeren bij andere bodems en gebruikmakend van andere colloïden/bacteriën. Een kolomproef met duinbodems en de in deze studie onderzochte micro-organismen kan dus belangrijke aanvullende informatie geven. Het model van Bradford et al. (2015) kan daarbij gebruikt worden om de resultaten van de proeven te begrijpen en te kwantificeren.

## 4 Conclusies en aanbevelingen

### 4.1 Conclusies.

- **Langzame afsterving *E. coli* als *E. moraviensis* in duinbodems**  
De bacteriën *E. coli* en *E. moraviensis*, (beide uit onttrokken water geïsoleerde stammen), sterven af in duinzand, maar het proces gaat zeer langzaam. Incubatie van *E. moraviensis* in duinzand bij 13°C zorgt voor een reductie van 6 logeenheden in 2 tot 3 maanden, en *E. coli* laat in 5 maanden een reductie zien van 4,3 tot 5,1 logeenheden.
- **Lagere afsterving op grotere diepte in de bodem**  
Afsterving in duinzand gaat voor zowel *E. coli* als *E. moraviensis* sneller in bodemmateriaal afkomstig van 10-20 cm diepte dan in bodemmateriaal afkomstig van 60-80cm diepte. Een mogelijke verklaring hiervoor is de met de diepte afnemende microbiële activiteit en daarmee afnemende kans op predatie door hogere organismen en afnemende concurrentie.
- **Reservoirvorming bacteriën in de onverzadigde zone**  
De waargenomen geringe afsterving heeft tot resultaat dat bacteriën die naar de onverzadigde worden getransporteerd hier zeer lang kunnen overleven. Dit maakt de onverzadigde zone een reservoir voor deze bacteriën, die mogelijk gemakkelijk kunnen worden getransporteerd naar het onttrokken water.
- **Mogelijk kortdurende (beperkte) groei *E. coli* als *E. moraviensis* in duinbodems**  
Zowel *E. coli* als *E. moraviensis* vertonen mogelijk een geringe groei in de eerste dagen na inoculatie van het bodemmateriaal. Daarna neemt het aantal bacteriën geleidelijk af door afsterving. Kortdurende groei lijkt hiermee afhankelijk van temperatuur en beschikbare voedingsstoffen mogelijk in duinzand, maar onder de geteste condities treedt verder vooral afsterving op.
- **Inspoeling van bacteriën tot onder de wortelzone bij zware buien**  
Verkennde berekeningen met een modelparameterisatie voor transporteigenschappen voor *E. coli* uit de literatuur laat zien dat bacteriën bij zware regenbuien decimeters diep in de bodem kunnen doordringen. Tijdens een navolgende periode met een lage neerslagintensiteit zijn de bacteriën vrijwel immobiel. Uit recent kolomonderzoek blijkt dat remobilisatie mogelijk is bij hogere fluxen en vochtgehalten. Modelconcepten zijn hiervoor nog in ontwikkeling.
- **Mogelijk groei van *E. coli* in ophoogzand**  
Het ophogen van de onverzadigde zone met zand, met daarin een lage hoeveelheid micro-organismen kan mogelijk resulteren in de groei van *E. coli* in dit zand, omdat concurrerende micro-organismen in dit zand of in mindere mate aanwezig zijn.

### 4.2 Aanbevelingen

- **Bepaal remobilisatie van bacteriën in bodemmateriaal**  
Bepaal of, en zo ja in welke mate bacteriën die in de onverzadigde zone aanwezig zijn weer mobiel kunnen worden als gevolg van een vloeistofpuls veroorzaakt door hevige neerslag of door een verhoging van de grondwaterspiegel.



## 5 Referenties

- Bel van, N., van der Veen, A., Brouwer, A., Hijnen, W., 2016. *E. coli* groei in duinzand en entzand. KWR Rapportage BTO 2016.107
- Bradford, S. A., Wang, Y., Torkzaban, S., & Šimůnek, J. (2015). Modeling the release of *E. coli* D21g with transients in water content. *Water Resources Research*, 51(5), 3303-3316.
- Ishii S, Ksoll WB, Hicks RE, Sadowsky MJ – Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds – 2006, *AEMM*, vol 72, no 1, pp 612-621.
- Ishii S, Hansen DL, Hicks RE, Sadowsky MJ – Beach sand and sediments are temporal sinks and sources of *Escherichia coli* in Lake Superior - 2007, *Environ. Sci. Technol.*, vol 41, no 7, pp 2203-2209
- Ishii S and Sadowsky MJ – *Escherichia coli* in the environment: Implications for water quality and human health – 2008, *Microbes Environ*, vol 23, no 2, pp 101-108
- García, R, J. Bælum, L. Fredslund, P. Santorum, C. S. Jacobsen. (2010). Influence of Temperature and Predation on Survival of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Expression of *invA* in Soil and Manure-Amended Soil. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Aug. 2010, p. 5025–5031, Vol. 76, No. 15
- Gargiulo, G., S. A. Bradford, J. Šimůnek, P. Ustohal, H. Vereecken, and E. Klumpp (2008), Bacteria transport and deposition under unsaturated flow conditions: The role of water content and bacteria surface hydrophobicity, *Vadose Zone J.*, 7, 406–419
- The effect of soil heterogeneity on transport of *Escherichia coli* and *Enterococcus moraviensis* in unsaturated soil in the field by after simulatedion of heavy rainfall (submitted), Luc M. Hornstra, Gijsbert Cirkel, Lucas Borst, Bernadette Lohmann, Gertjan Medema
- Nobel, P. J. and D. G. Cirkel (2005). Effecten van begrazing en recreatie op de microbiologische waterkwaliteit, resultaten van veldexperimenten en vertaling naar maatregelen. BTO rapport 2005.006, Kiwa N.V. Nieuwegein.
- Taučer-Kapteijn, Maja, Wim Hoogenboezem and Gertjan Medema. (2016). Environmental growth of the faecal indicator *Enterococcus moraviensis*. *Water Science & Technology*, in press.
- Taučer-Kapteijn, Hoogenboezem W, Hoogenboezem R, de Haas S, Medema GJ. Source tracking of *Enterococcus moraviensis* and *E. haemoperoxidus*. *J Water Health*. 2017 Feb;15(1):41-49
- Taučer-Kapteijn (2017). Occurrence of enterococci in the environment and their value as an indicator of water quality. PhD Thesis. TU Delft.



Taylor, J.P., B. Wilson, M.S. Mills, R.G. Burns. (2002). Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology & Biochemistry* 34 (2002) 387±401.

Wang, Y., S. A. Bradford, and J. Šimůnek (2014), Release of *E. coli* D21g with transients in water content, *Environ. Sci. Technol.*, 48, 9349-9357, doi:10.1021/es501956k

Zhang, Q. L., S. M. Hassanizadeh, A. Raof, M. T. van Genuchten, and S. M. Roels (2012), Modeling virus transport and remobilization during partially saturated flow, *Vadose Zone Journal*, 11, doi:10.2136/vzj2011.0090.