

Rapport

DNA bronopsporing voor RWS op zes zwemwaterlocaties in 2020

KWR KWR 2020.132

Datum

25 november 2020

Opdrachtgever

RWS-WVL

Meer informatie

dr.ir. M.J.M. Hootsmans

T 0622951843

Auteur(s)

M.J.M. Hootsmans

Opdrachtnummer

403561

E michiel.hootsmans@kwrwater.nl

Kwaliteitsborger(s)

L. Heijnen (gedelegeerd namens G. Medema)

Projectmanager

M.J.M. Hootsmans

Pagina

1/18

Inhoud

1	Inleiding	3
2	Methode en aanpak	3
2.1	Verzamelen van watermonsters	3
2.2	Filtratie	4
2.3	DNA analyse	4
3	Resultaten en discussie	5
3.1	De opbrengst van de inhibitie en rendementscontrole	5
3.2	Resultaten DNA analyse en kweek	5
3.2.1	Andijk Zwemstrand	5
3.2.2	It Soal	7
3.2.3	't Kleine Zeetje	8
3.2.4	Strandbad Edam	10
3.2.5	Zeestrand Termunten	12
3.2.6	Scheveningen Zwarte Pad	14
4	Conclusies	16
5	Referenties	17

1 Inleiding

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

Fecale verontreiniging in oppervlaktewater kan afkomstig zijn van een heel scala aan bronnen. Te denken valt aan de aanwezigheid van (water)vogels, vervuiling door recreanten, afspoeling van agrarisch gebied, effluentlozing door RWZI's, overstorten uit rioolwater- of hemelwaterriolering, aanwezigheid van wilde fauna en afspoeling van honden- en/of paardenfeces. Welk van dergelijke bronnen nu bijdraagt aan de verminderde (zwem)waterkwaliteit is op basis van alleen de indicator bacteriën (*E. coli* en intestinale enterococcen) niet te achterhalen. Sinds enkele jaren maakt men daarvoor gebruik van specifieke DNA-methoden. Met dergelijke technieken is onderscheid te maken tussen diergroepspecifieke bacteriën met fecale herkomst en/of het DNA uit dierlijke cellen waarvan in de feces hoge concentraties aanwezig zijn (Heijnen & Learbuch 2013, Heijnen et al. 2014, Becker et al. 2017). Met behulp van DNA technieken (qPCR) kunnen dergelijke bacteriën of dierlijke cellen gedetecteerd en gekwantificeerd worden. De meest relevante diergroepen die momenteel in het laboratorium van KWR met DNA merkers onderscheiden kunnen worden zijn: fecale bacteriën van mensen, vogels, varkens, herkauwers (als groep), runderen (uit de groep van herkauwers) en paarden, en DNA uit cellen van honden en de bruine rat. In het vervolg zal korthedshalve worden gesproken over 'DNA merkers' voor de verschillende groepen.

De potentiële bronnen van fecale verontreiniging zijn met de bestaande zwemwaterprofielen redelijk in beeld. Met de resultaten van de DNA analyse in de hand kan de (water)beheerder gericht maatregelen nemen. Deze zijn erop gericht om de invloed van aangetoonde bronnen te minimaliseren en zo de (zwem)waterkwaliteit te verbeteren dan wel te garanderen. Het doel van dit DNA-onderzoek is om te achterhalen wat in 2020 de voornaamste bron van fecale verontreiniging is die bijdraagt aan overschrijdingen van de fecale parameters *E. coli* en intestinale enterococcen gedurende het zwemwaterseizoen in de vier zwemwaterlocaties gelegen in zoetwater (Strandbad Edam, Andijk Zwemstrand, It Soal en 't Kleine Zeetje), en twee zwemwaterlocaties in zeewater (Zeestrand Termunten en Scheveningen Zwarte Pad).

2 Methode en aanpak

2.1 Verzamelen van watermonsters

Op de onderzochte zwemwaterlocaties is tijdens de reguliere bemonstering in het zwemseizoen 2020 voor de bepaling van indicator bacteriën (*E. coli* en intestinale enterococcen) steeds ook extra water verzameld voor de DNA bronanalyse. In totaal ging het om 11-13 monster datums voor de bovengenoemde locaties. Alle monsters voor de latere DNA analyse zijn binnen 24 uur afgeleverd bij het laboratorium van Intertek, met uitzondering van de

monsters voor Zeestrand Termunten die zijn verzameld door het waterschap Hunze en Aa's en verwerkt door WLN in Glimmen. Hier werd de filtratie van de monsters en conservering/ voorbehandeling van de filters uitgevoerd. Om een goede vergelijking van DNA-resultaten met kweekgegevens van *E. coli* en intestinale enterococci mogelijk te maken, zijn door Intertek (voor Zeestrand Termunten was dit het waterschap Hunze en Aa's) parallel aan de watermonsters voor DNA analyse ook monsters verzameld voor de bepaling van deze zwemwaterparameters.

2.2 Filtratie

Binnen 48 uur na monsternamen is een volume van 100 ml van een monster, onder vacuüm, gefiltreerd over een polycarbonaat (PC) membraanfilter (Track-edge filters, Sartorius) met een porie-grootte van 0,2 µm en een doorsnede van 4,5 cm. Bij elke monsternameronde is tevens een blanco filter (in alle gevallen 100 ml DNA vrij water) geprepareerd om daarmee het optreden van eventuele contaminaties of vals-positieve reacties uit te kunnen sluiten. Na het filtreren van het monster is dit nog gespoeld met 10 ml van een 0,5 M ammonium-oxalaat oplossing om ijzer te onttrekken uit ijzerhoudende monsters. Dit verbetert het rendement van de DNA extractie van dergelijke monsters aanzienlijk. Na filtratie met ammonium-oxalaat zijn de filters nagespoeld met 20-30 ml PBS oplossing (fosfaat gebufferde fysiologisch zoutoplossing, Gibco – Life Technologies) om restanten ammonium-oxalaat te verwijderen en de pH te neutraliseren.

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

2.3 DNA analyse

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

Voor dit onderzoek is voor de locaties Andijk Zwemstrand, It Soal en 't Kleine Zeetje op verzoek van RWS-WVL gebruik gemaakt van qPCR methoden gericht op de detectie van de bronnen mens, paard, vogel, hond en herkauwer. Voor Strandbad Edam zijn mens, vogel, hond, herkauwer en rund gebruikt. Voor Zeestrand Termunten en Scheveningen Zwarte Pad zijn mens, vogel en hond gebruikt, en bij Zeestrand Termunten is ook de merker voor herkauwer geanalyseerd.

Voor het bepalen van het voorkomen van DNA indicatief voor bronnen afkomstig van mens, paard, herkauwer en rund is gebruik gemaakt van groepspecifieke bacteriën uit de bacteriegroep *Bacteroides*. Voor het opsporen van verontreinigingen van vogels is gebruik gemaakt van de, veelvuldig in vogel uitwerpselen voorkomende, *Helicobacter* bacterie. Voor het aantonen van fecale verontreiniging van honden is een methode gebruikt die zich richt op DNA uit hondencellen in plaats van fecaal gerelateerd bacterie materiaal. Fecaliën van honden bevatten veel van dergelijke cellen afkomstig van de darmwand. De resultaten worden hierna weergegeven op een loglineaire schaal als DNA-kopieën/l.

De kwaliteitscontrole bevat drie onderdelen:

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

3 Resultaten en discussie

3.1 De opbrengst van de inhibitie en rendementscontrole

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

De rendementen van de DNA-extracties (zie de tabellen per locatie) bleken voor vrijwel alle geanalyseerde monsters + de blanco's goed (rendement van 30% of hoger). Deze uitkomst geeft aan dat de watermonsters afkomstig van deze zwemwaterlocaties zich goed lieten behandelen. In geen van de blanco monsters werden DNA merkers aangetroffen, zodat er naar alle waarschijnlijkheid geen kruisbesmettingen tussen monsters zijn opgetreden. Eén blanco monster (27 mei, strandbad Edam) had een te laag rendement voor een betrouwbare analyse; gelukkig heeft dit geen consequenties voor de conclusies over het bijbehorende veldmonster omdat daarin geen merkers werden vastgesteld. Het blanco monster voor Andijk Zwemstrand op 15 juni is abusievelijk niet geanalyseerd. Ook hier geldt dat dit gelukkig geen consequenties heeft voor de conclusies over het bijbehorende veldmonster omdat ook daarin geen merkers werden vastgesteld.

3.2 Resultaten DNA analyse en kweek

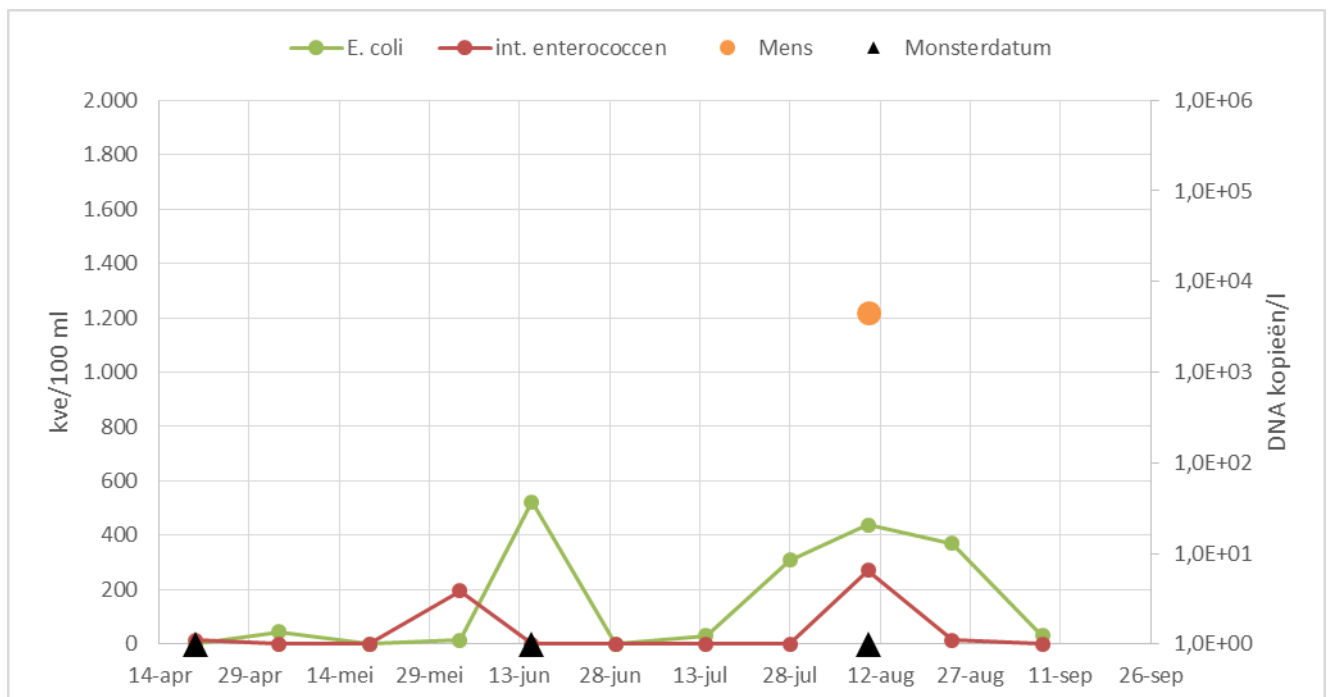
3.2.1 Andijk Zwemstrand

In onderstaande Tabel 1 zijn de DNA concentraties van de onderzochte bronnen van fecale herkomst aangegeven voor de zwemwaterlocatie Andijk Zwemstrand. Van de veldmonsters is het monster van 10 augustus positief, en wel voor DNA afkomstig van mensen.

In Figuur 1 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococcon gedurende het zwemseizoen 2020 op deze locatie. Ook de resultaten voor de op de drie geanalyseerde datums vastgestelde DNA waarden voor de fecale merker voor mensen worden hier weergegeven. Conform de Europese zwemwaterrichtlijn is voor de zwemwaterkwaliteitsklasse 'goed' de bovengrenswaarde voor *E. coli* 1000 kve/100 ml, voor intestinale enterococcon is dit 400 kve/100 ml. In Nederland wordt de grens van 1800 kolonievormende eenheden (kve)/100 ml met betrekking tot *E. coli* aangehouden als signaalwaarde voor overschrijding van het acute risico (Stuurgroep Water, 2013). Voor intestinale enterococcon ligt die grens bij 400 kve /100 ml.

Tabel 1. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor de drie onderzochte veldmonsters van de locatie Andijk Zwemstrand en bijbehorende blanco's. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens. NA=niet geanalyseerd

monster code	datum / volume	omschrijving	rendement (%)	DNA kopieën/l				
				mens	hond	paard	vogel	herkauwer
LMB-107866-OW	19 mei 100 ml	Andijk Zwemstrand	40,2	<2,5E+03	<2,5E+03	<2,5E+03	<1,2E+04	<2,5E+03
LMB-107864-UW	100 ml	Blanco	35,2	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<1,4E+04	<2,8E+03
LMB-107874-OW	15 juni 100 ml	Andijk Zwemstrand	49,7	<2,0E+03	<2,0E+03	<2,0E+03	<1,0E+04	<2,0E+03
	100 ml	Blanco	NA	NA	NA	NA	NA	NA
LMB-107879-OW	10 aug 100 ml	Andijk Zwemstrand	59,6	4,6E+03	<1,7E+03	<1,7E+03	<8,4E+03	<1,7E+03
LMB-107878-UW	100 ml	Blanco	33,3	<3,0E+03	<3,0E+03	<3,0E+03	<1,5E+04	<3,0E+03



Figuur 1. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci op de locatie Andijk Zwemstrand in 2020 en de op drie momenten vastgestelde DNA-resultaten van potentiële fecale bronnen. *E. coli* en intestinale enterococci zijn uitgedrukt in een lineaire schaal in kve (kolonievormende eenheden) per 100 ml; de DNA-merkers zijn uitgedrukt op een loglineaire schaal in DNA-kopie aantallen / l. De drie datums met DNA analyses zijn weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as.

De meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci waren gedurende het seizoen laag en signaalwaarden worden in 2020 niet overschreden. Er zijn wel een aantal wat verhoogde waarden zichtbaar, voor intestinale enterococci op 3 juni en op 10 augustus, en voor *E. coli* op 15 juni en op 28 juli, 10 en 24 augustus. De verhoging rond 10 augustus correspondeert met een verhoogde waarde voor de DNA merker voor mensen op die datum. Op 15 juni werden geen merkers aangetoond. Bij niet al te hoge bacteriewaarden is dit niet onverwacht.

Bij eerder onderzoek met DNA merkers op deze locatie werden in 2014 mens en vogels als voornaamste bron aangewezen (Kardinaal & Heijnen, 2014). In 2019 kon geen duidelijke bron worden vastgesteld voor een overschrijding van de signaalwaarde voor intestinale enterococci (gebruikte merker set: mens, hond, rund, vogel, herkauwer; het vermoeden ging uit naar hond; Hootsmans, 2019). Het zwemwaterprofiel uit 2018 (RWS MN, 2018) geeft nog geen aanwijzing voor mogelijke bronnen; de locatie is pas in 2017 een officiële zwemwaterlocatie geworden. De tot nu toe verzamelde DNA gegevens wijzen vooralsnog op mensen en vogels als mogelijke bronnen bij Andijk Zwemstrand.

3.2.2 It Soal

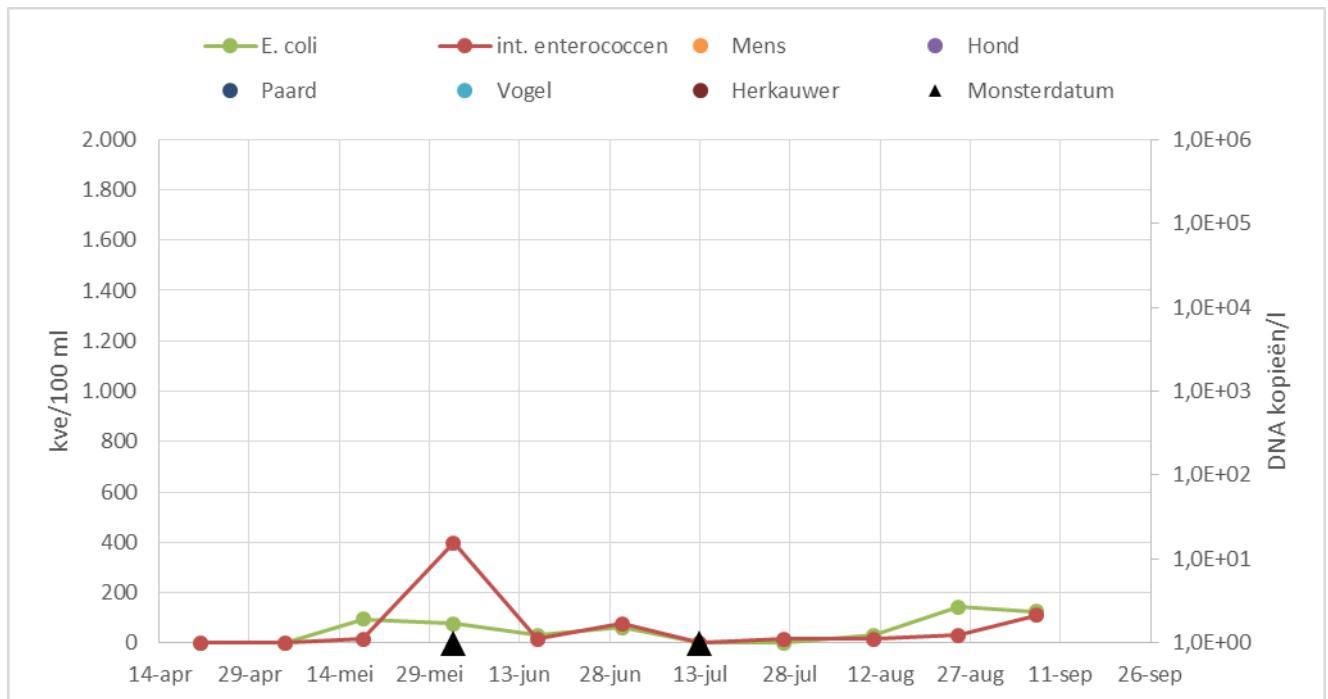
In onderstaande Tabel 2 zijn de DNA concentraties van de onderzochte bronnen van fecale herkomst aangegeven voor de zwemwaterlocatie It Soal. Op geen van beide meetdatums werden DNA merkers aangetoond.

In Figuur 2 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococci gedurende het zwemseizoen 2020 op deze locatie. Conform de Europese zwemwaterrichtlijn is voor de zwemwaterkwaliteitsklasse 'goed' de bovengrenswaarde voor *E. coli* 1000 kve/100 ml, voor intestinale enterococci is dit 400 kve/100 ml. In Nederland wordt de grens van 1800 kolonievormende eenheden (kve)/100 ml met betrekking tot *E. coli* aangehouden als signaalwaarde voor overschrijding van het acute risico (Stuurgroep Water, 2013). Voor intestinale enterococci ligt die grens bij 400 kve /100 ml.

Tabel 2. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor de twee onderzochte veldmonsters van de locatie It Soal en bijbehorende blanco's. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens.

monster code	datum / volume	omschrijving	rendement (%)	DNA kopieën/l				
				mens	hond	paard	vogel	herkauwer
LMB-107870-OW	2 juni 100 ml	It Soal	42,7	<2,3E+03	<2,3E+03	<2,3E+03	<1,2E+04	<2,3E+03
LMB-107869-UW	100 ml	Blanco	36,3	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<1,4E+04	<2,8E+03
LMB-107877-OW	13 juli 100 ml	It Soal	54,8	<1,8E+03	<1,8E+03	<1,8E+03	<9,1E+03	<1,8E+03
LMB-107875-UW	100 ml	Blanco	34,4	<2,9E+03	<2,9E+03	<2,9E+03	<1,5E+04	<2,9E+03

De meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci waren gedurende het seizoen laag en signaalwaarden worden in 2020 niet overschreden. Er zijn wel een aantal wat verhoogde waarden zichtbaar voor intestinale enterococci op 2 juni (bijna de signaalwaarde) en op 7 september, en licht verhoogde waarden voor *E. coli* op 18 mei, 2 juni, 25 augustus en 7 september.



Figuur 2. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci op de locatie It Soal in 2020. Op geen van de twee momenten konden DNA-waarden worden aangetoond voor de ingezette merkers voor potentiële fecale bronnen. *E. coli* en intestinale enterococci zijn uitgedrukt in een lineaire schaal in kve (kolonievormende eenheden) per 100 ml; de DNA-merkers zijn uitgedrukt op een loglineaire schaal in DNA-kopie aantallen /l. De twee datums met DNA analyses zijn weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as.

Ook bij eerder onderzoek met DNA merkers op deze locatie in 2018 kon geen eenduidige bron worden vastgesteld voor een verhoogde waarde voor *E. coli* (gebruikte merker set: mens, hond, paard, vogel, herkauwer; het vermoeden ging wel uit naar vogels; Kardinaal, 2018). Mogelijk zijn de met kweek vastgestelde enterococci in It Soal niet afkomstig van een fecale bron. Er komen diverse niet-intestinale enterococci in het natuurlijk milieu voor die net als intestinale enterococci kunnen worden gevonden met de kweekmethode. De NEN-ISO 7899 methode voor detectie van intestinale enterococci vermeldt dit ook als een niet te voorkomen mogelijke foutbron. Om hier onderscheid in te maken zouden deze enterococci tot op soort kunnen worden geïdentificeerd. Zie ook Wubbels et al., 2014.

Het zwemwaterprofiel uit 2019 (RWS MN, 2019a) geeft geen duidelijke aanwijzing voor mogelijke bronnen, maar wijst wel op vogels, mede door waarnemingen van broedkolonies in de omgeving, en het onderzoek van Kardinaal (2018).

3.2.3 't Kleine Zeeetje

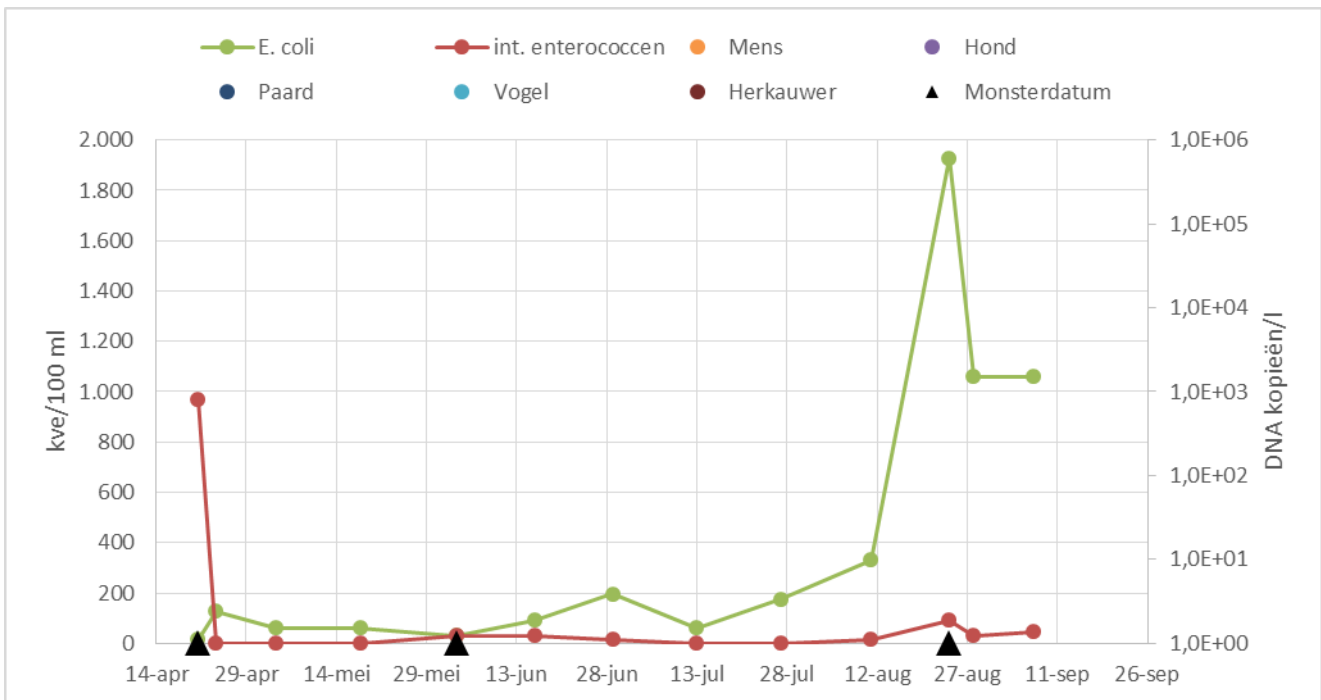
In onderstaande Tabel 3 zijn de DNA concentraties van de onderzochte bronnen van fecale herkomst aangegeven voor de zwemwaterlocatie 't Kleine Zeeetje. Op geen van de drie meetdatums werden DNA merkers aangetoond.

In Figuur 3 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococci gedurende het zwemseizoen 2020 op deze locatie. Conform de Europese zwemwaterrichtlijn is voor de zwemwaterkwaliteitsklasse 'goed' de bovengrenswaarde voor *E. coli* 1000 kve/100 ml, voor intestinale enterococci is dit 400 kve/100 ml. In Nederland wordt de grens van 1800 kolonievormende eenheden (kve)/100

ml met betrekking tot *E. coli* aangehouden als signaalwaarde voor overschrijding van het acute risico (Stuurgroep Water, 2013). Voor intestinale enterococci ligt die grens bij 400 kve /100 ml.

Tabel 3. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor de drie onderzochte veldmonsters van de locatie 't Kleine Zeeetje en bijbehorende blanco's. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens.

monster code	datum / volume	omschrijving	rendement (%)	DNA kopieën/l				
				mens	hond	paard	vogel	herkauwer
LMB-107863-OW	21 apr 100 ml	't Kleine Zeeetje	40,2	<2,5E+03	<2,5E+03	<2,5E+03	<1,2E+04	<2,5E+03
LMB-107862-UW	100 ml	Blanco	33,4	<3,0E+03	<3,0E+03	<3,0E+03	<1,5E+04	<3,0E+03
LMB-107871-OW	3 juni 100 ml	't Kleine Zeeetje	44,2	<2,3E+03	<2,3E+03	<2,3E+03	<1,1E+04	<2,3E+03
LMB-107869-UW	100 ml	Blanco	36,3	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<1,4E+04	<2,8E+03
LMB-107884-OW	24 aug 100 ml	't Kleine Zeeetje	36,4	<2,7E+03	<2,7E+03	<2,7E+03	<1,4E+04	<2,7E+03
LMB-107882-UW	100 ml	Blanco	37,0	<2,7E+03	<2,7E+03	<2,7E+03	<1,4E+04	<2,7E+03



Figuur 3. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci op de locatie 't Kleine Zeeetje in 2020. Op geen van de drie momenten konden DNA-waarden worden aangetoond voor de ingezette merkers voor potentiële fecale bronnen. *E. coli* en intestinale enterococci zijn uitgedrukt in een lineaire schaal in kve (kolonievormende eenheden) per 100 ml; de DNA-merkers zijn uitgedrukt op een loglineaire schaal in DNA-kopie aantallen / l. De drie datums met DNA analyses zijn weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as.

Er is een lichte verhoging zichtbaar voor de intestinale enterococci op 24 augustus en voor *E. coli* op 29 juni. Voor *E. coli* zijn de waarden vooral eind augustus en begin september fors verhoogd. De signaalwaarden voor intestinale enterococci zijn duidelijk overschreden op 21 april. Voor *E. coli* is dat het geval op 24 augustus.

Het in 2020 niet detecteren van een of enkele merkers is vooral opmerkelijk voor 24 augustus, en hier is vooralsnog geen verklaring voor. Bij eerder onderzoek met DNA merkers op deze locatie werden in 2014 mensen, vogels en herkauwers als voornaamste bron aangewezen (Kardinaal & Heijnen, 2014). In 2015 lag de nadruk op honden en vogels (Kardinaal, 2015). Wel is het zo dat DNA van de indicatorbacterie voor het identificeren van vogels als bron voor fecale verontreiniging in vergelijking met andere bronsporingmerkers in relatief lage en zeer wisselende concentraties voorkomt in de feces van vogels (Heijnen, 2015). Hierdoor kunnen de concentraties van deze merker in water afhankelijk van hun concentratie in de feces, zeer wisselend en soms ook laag zijn en wellicht in dit geval beneden de detectiegrens.

De overschrijding op 21 april voor enterococci die niet te koppelen was aan een DNA merker kan er op duiden dat de enterococci van natuurlijke herkomst waren, en dus geen fecale oorsprong hadden (Wubbels et al., 2014; zie ook de nadere toelichting hierover bij It Soal).

Het zwemwaterprofiel uit 2019 (RWS MN, 2019b) wijst met name op vogels als mogelijke bron, en daarnaast op mensen (recreatievaart) en mogelijk lokaal honden en paarden.

3.2.4 Strandbad Edam

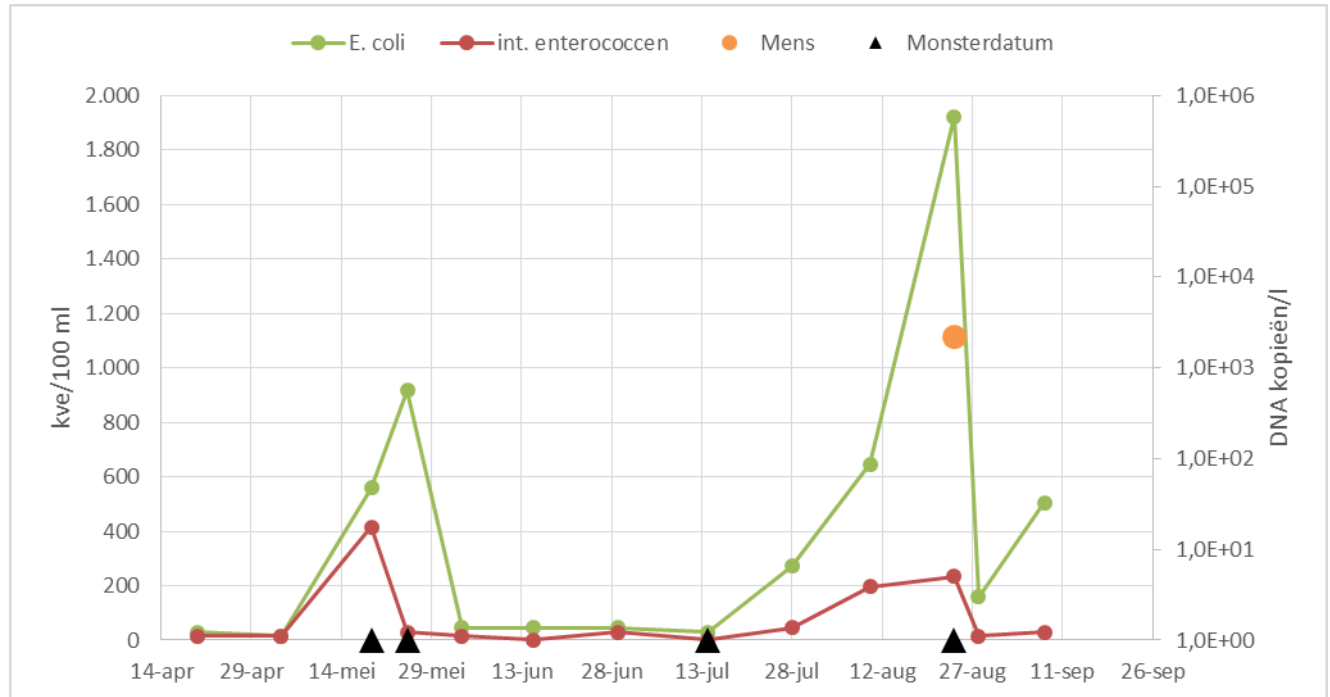
In onderstaande Tabel 4 zijn de DNA concentraties van de onderzochte bronnen van fecale herkomst aangegeven voor de zwemwaterlocatie Strandbad Edam. Van de veldmonsters is het monster van 24 augustus positief, en wel voor DNA afkomstig van mensen.

Tabel 4. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor de vier onderzochte veldmonsters van de locatie Strandbad Edam en bijbehorende blanco's. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens. R=rendement.

monster code	datum / volume	omschrijving	rendement (%)	DNA kopieën/l				
				mens	hond	rund	vogel	herkauwer
LMB-107865-OW	19 mei 100 ml	Strandbad Edam	46,0	<2,2E+03	<2,2E+03	<2,2E+03	<1,1E+04	<2,2E+03
LMB-107864-UW	100 ml	Blanco	35,2	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<1,4E+04	<2,8E+03
LMB-107868-OW	25 mei 100 ml	Strandbad Edam	42,6	<2,3E+03	<2,3E+03	<2,3E+03	<1,2E+04	<2,3E+03
LMB-107867-UW	100 ml	Blanco	7,7	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag
LMB-107876-OW	14 juli 100 ml	Strandbad Edam	49,0	<2,0E+03	<2,0E+03	<2,0E+03	<1,0E+04	<2,0E+03
LMB-107875-UW	100 ml	Blanco	34,4	<2,9E+03	<2,9E+03	<2,9E+03	<1,5E+04	<2,9E+03
LMB-107883-OW	24 aug 100 ml	Strandbad Edam	44,5	2,3E+03	<2,2E+03	<2,2E+03	<1,1E+04	<2,2E+03
LMB-107882-UW	100 ml	Blanco	37,0	<2,7E+03	<2,7E+03	<2,7E+03	<1,4E+04	<2,7E+03

In Figuur 4 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococci gedurende het zwemseizoen 2020 op deze locatie. Ook de resultaten voor de op de vier geanalyseerde datums vastgestelde DNA waarden voor de fecale merker voor mensen worden hier weergegeven. Conform de Europese zwemwaterrichtlijn is voor de zwemwaterkwaliteitsklasse 'goed' de bovengrenswaarde voor

E. coli 1000 kve/100 ml, voor intestinale enterococconen is dit 400 kve/100 ml. In Nederland wordt de grens van 1800 kolonievormende eenheden (kve)/100 ml met betrekking tot *E. coli* aangehouden als signaalwaarde voor overschrijding van het acute risico (Stuurgroep Water, 2013). Voor intestinale enterococconen ligt die grens bij 400 kve /100 ml.



Figuur 4. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococconen op de locatie Strandbad Edam in 2020 en de op vier momenten vastgestelde DNA-resultaten van potentiële fecale bronnen. *E. coli* en intestinale enterococconen zijn uitgedrukt in een lineaire schaal in kve (kolonievormende eenheden) per 100 ml; de DNA-merkers zijn uitgedrukt op een loglineaire schaal in DNA-kopie aantallen / l. De vier datums met DNA analyses zijn weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as.

Er is een verhoging zichtbaar voor de intestinale enterococconen op 10 en 24 augustus en voor *E. coli* in mei en in augustus-september. De signaalwaarde voor intestinale enterococconen is overschreden op 19 mei. Voor *E. coli* is dat het geval op 24 augustus. De overschrijding van 24 augustus correspondeert met een verhoogde waarde voor de DNA merker voor mensen.

In mei worden geen merkers gedetecteerd, terwijl er dan wel verhoogde bacteriewaarden zijn. De bacteriewaarden voor *E. coli* liggen echter nog steeds binnen de kwaliteitsklasse 'goed'. Bij deze bacteriewaarden worden fecale merkers wel vaker niet aangetroffen. Voor de enterococconen kan weer gelden dat deze van natuurlijke herkomst zijn, en dus geen fecale oorsprong hebben (Wubbels et al., 2014; zie ook de nadere toelichting hierover bij It Soal). Deze mogelijkheid werd voor deze locatie ook in 2019 vastgesteld (Hootsmans, 2019).

Bij eerder onderzoek met DNA merkers werden voor dezelfde locatie naast mens ook nog hond, herkauwers en vogels als bron aangewezen (zie Tabel 5; Kardinaal, 2016, 2017, 2018; Hootsmans, 2019). Het zwemwaterprofiel uit 2020 (RWS MN, 2020) wijst met name op vogels als mogelijke bron, en daarnaast op mensen en herkauwers (koeien). Het beeld blijkt over de jaren niet constant wat kan duiden op meerdere fecale verontreinigingsbronnen

die invloed kunnen hebben op de waterkwaliteit. De DNA merker voor mens is wel vrijwel jaarlijks aangetroffen en lijkt daarmee een belangrijke verontreinigingsbron van Strandbad Edam.

Tabel 5. Overzicht van de bronnen zoals vastgesteld in de periode 2016 t/m 2020 op locatie Strandbad Edam. De **vetgedrukte** tekst in de kolommen geeft aan welke bron in een meetjaar als voornaamste aangemerkt is.

omschrijving	Aangetoonde fecale verontreinigingsbronnen				
	2016	2017	2018	2019	2020
Badstrand Edam	mens , hond, vogel	mens , herkauwer	vogel , herkauwer, hond, mens	hond	mens

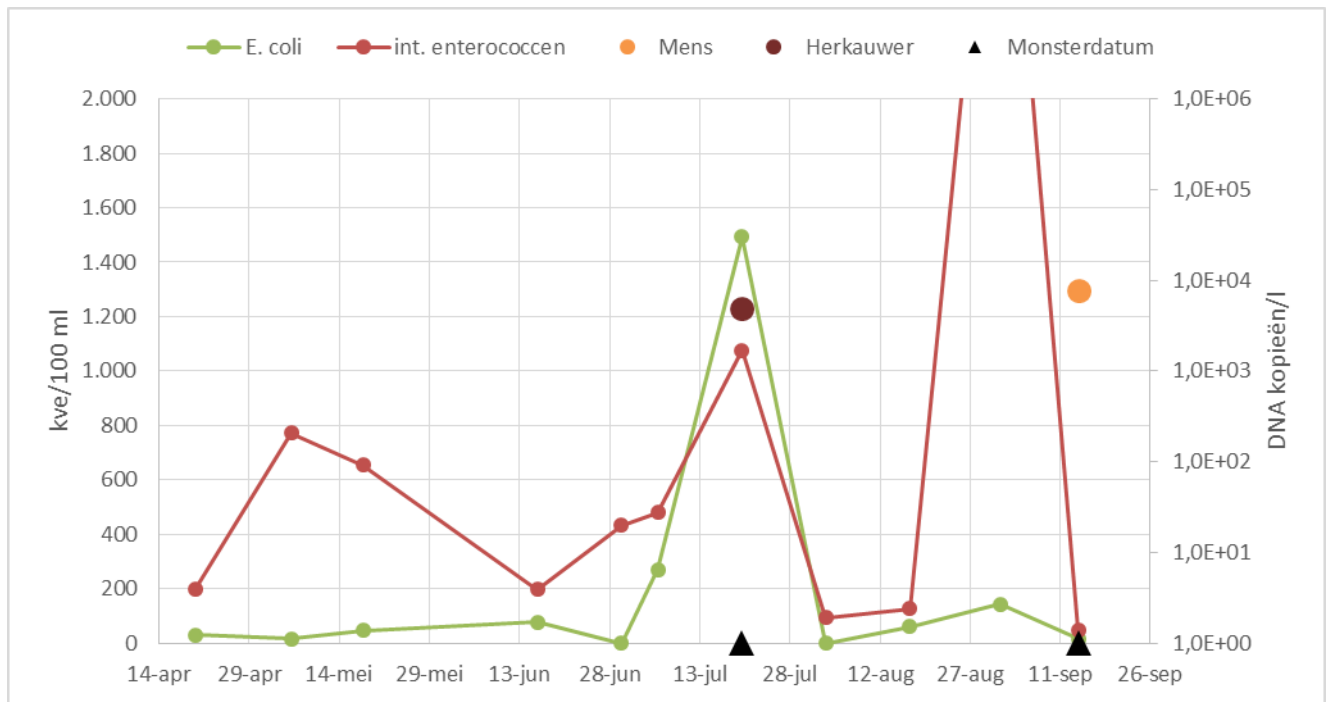
3.2.5 Zeestrand Termunten

In onderstaande Tabel 6 zijn de DNA concentraties van de onderzochte bronnen van fecale herkomst aangegeven voor de zwemwaterlocatie Zeestrand Termunten. Van de veldmonsters is zowel het monster van 20 juli als van 14 september positief, en wel voor DNA afkomstig van respectievelijk herkauwers en mensen.

In Figuur 5 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococcon gedurende het zwemseizoen 2020 op deze locatie. Ook de resultaten voor de op de twee geanalyseerde datums vastgestelde DNA waarden voor de fecale merkers voor herkauwers en mensen worden hier weergegeven. Conform de Europese zwemwaterrichtlijn is voor de zwemwaterkwaliteitsklasse ‘goed’ voor kust- en overgangswateren de bovengrenswaarde voor *E. coli* 500 kve/100 ml, voor intestinale enterococcon is dit 200 kve/100 ml. In Nederland wordt de grens van 1800 kolonievormende eenheden (kve)/100 ml met betrekking tot *E. coli* aangehouden als signaalwaarde voor overschrijding van het acute risico (Stuurgroep Water, 2013). Voor intestinale enterococcon ligt die grens bij 400 kve /100 ml.

Tabel 6. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor de twee onderzochte veldmonsters van de locatie Zeestrand Termunten en bijbehorende blanco's. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens.

monster code	datum / volume	omschrijving	rendement (%)	mens	hond	vogel	herkauwer
				DNA kopieën/l			
LMB-107854-OW	20 juli 100 ml	Zeestrand Termunten	33,6	<3,0E+03	<3,0E+03	<1,5E+04	4,9E+03
LMB-107856-UW	100 ml	Blanco	33,2	<3,0E+03	<3,0E+03	<1,5E+04	<3,0E+03
LMB-107858-OW	14 sep 100 ml	Zeestrand Termunten	34,5	7,7E+03	<2,9E+03	<1,4E+04	<2,9E+03
LMB-107859-UW	100 ml	Blanco	29,9	<3,3E+03	<3,3E+03	<1,7E+04	<3,3E+03



Figuur 5. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococcen op de locatie Zeestrand Termunten in 2020 en de op twee momenten vastgestelde DNA-resultaten van potentiële fecale bronnen. *E. coli* en intestinale enterococcen zijn uitgedrukt in een lineaire schaal in kve (kolonievormende eenheden) per 100 ml; de DNA-merkers zijn uitgedrukt op een loglineaire schaal in DNA-kopie aantallen /l. De twee datums met DNA analyses zijn weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as. Op 1 september is de waarde voor intestinale enterococcen 3420 kve/100ml.

Er is een verhoging zichtbaar voor *E. coli* op 20 juli, en licht op 1 september. De signaalwaarde voor intestinale enterococcen wordt op zes meetdatums overschreden, maar vooral op 1 september is de gemeten enterococcon concentratie erg hoog. Voor *E. coli* wordt de signaalwaarde in 2020 niet overschreden. De hoge bacteriewaarden op 20 juli corresponderen met het aantonen van de DNA merker voor herkauwers. Dat zou mede kunnen worden veroorzaakt door de uitslag van polderwater door gemaal Rozema (RWS-NN, 2019). De waarde voor de DNA merker voor mensen op de als referentie voor lage bacteriewaarden gekozen datum van 14 september kan een naïf effect zijn van de overschrijding voor intestinale enterococcen op 1 september. De bacteriële DNA merkers zijn namelijk langer in water detecteerbaar dan dat de fecale indicator bacteriën met kweek aantoonbaar zijn (Heijnen, 2015). Niettemin kan voor de enterococcen ook hier gelden dat deze van natuurlijke herkomst zijn, en dus geen fecale oorsprong hebben (Wubbels et al., 2014; zie ook de nadere toelichting hierover bij It Soal). Bij de monsternamen in 2020 werden regelmatig zeehonden op het strand gezien (zie ook RWS-NN, 2019). Wellicht worden de regelmatig hoge enterococcon waarden door deze dieren veroorzaakt.

Bij eerder onderzoek met DNA merkers werden voor dezelfde locatie naast herkauwers ook nog mens, hond en vogels als bron aangewezen (zie Tabel 7; Heijnen & Kardinaal, 2013; Kardinaal & Heijnen, 2014; Kardinaal, 2015, 2016). Het beeld is dat herkauwers over de jaren steeds aanwezig zijn waardoor te verwachten is dat fecale verontreinigingen van herkauwers een belangrijke invloed hebben op de waterkwaliteit van Zeestrand Termunten.

Het zwemwaterprofiel (RWS NN, 2019) wijst dan ook mede op grond van het eerdere DNA onderzoek als mogelijke bronnen op herkauwers, vogels en mensen (zwemmers, maar ook plezier- en beroepsvaart), en vermoedt dat deze

combinatie kan duiden op een invloed via uitslag van polderwater door gemaal Rozema. Daarnaast worden ook zeehonden genoemd als mogelijke bron. Dijkbegrazing met schapen is sinds 2016 beëindigd.

Tabel 7. Overzicht van de bronnen zoals vastgesteld in de periode 2013 t/m 2020 op locatie Zeestrand Termunten. De vetgedrukte tekst in de kolommen geeft aan welke bron in een meetjaar als voornaamste aangemerkt is.

omschrijving	Aangetoonde fecale verontreinigingsbronnen				
	2013	2014	2015	2016	2020
Zeestrand Termunten	herkauwer	mens, herkauwer	mens, vogel, herkauwer	mens, vogel, hond, herkauwer	herkauwer

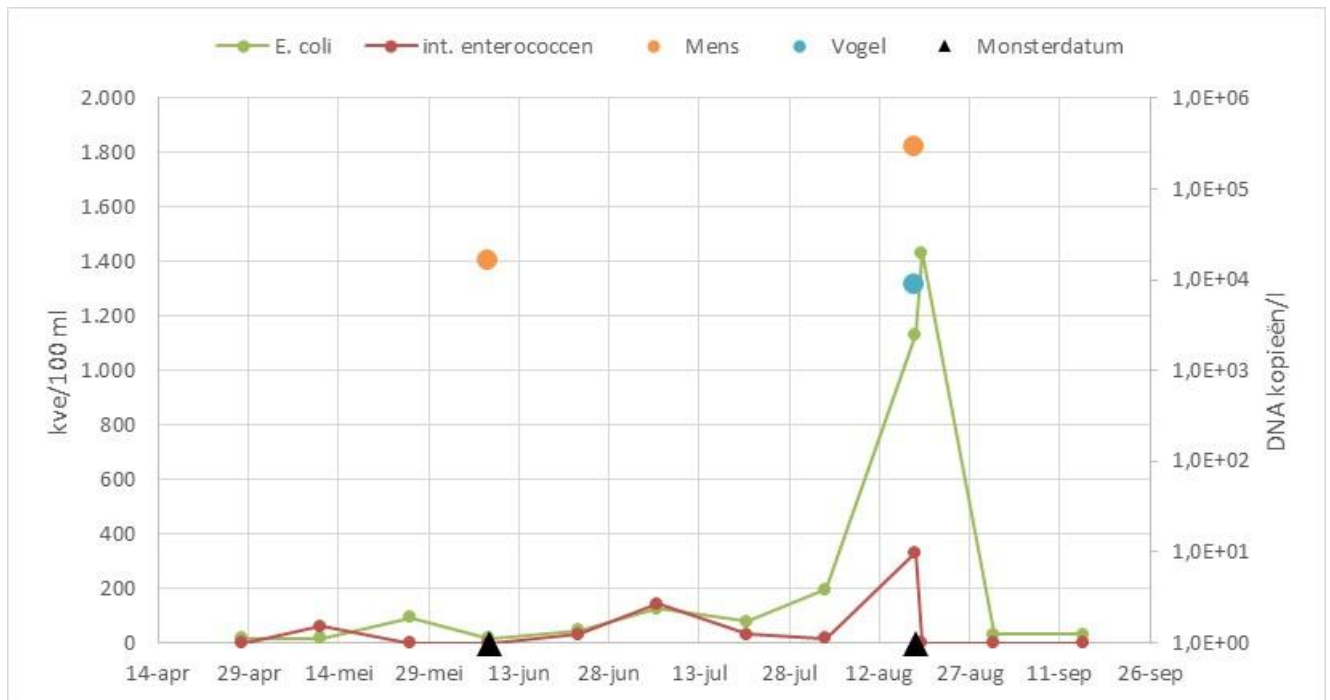
3.2.6 Scheveningen Zwarte Pad

In onderstaande Tabel 8 zijn de DNA concentraties van de onderzochte bronnen van fecale herkomst aangegeven voor de zwemwaterlocatie Scheveningen Zwarte Pad. Door combinatie efficiëntie in de labwerkzaamheden is voor deze locatie ook de DNA merker voor herkauwers als extra meegenomen, ofschoon die niet de meest waarschijnlijke bron op deze plaats zal zijn. Van de veldmonsters is zowel het monster van 8 juni als van 18 augustus positief, en wel voor DNA afkomstig van vogels (18 augustus) en mensen (beide datums).

In Figuur 6 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococcen gedurende het zwemseizoen 2020 op deze locatie. Ook de resultaten voor de op de twee geanalyseerde datums vastgestelde DNA waarden voor de fecale merkers voor mensen en vogels worden hier weergegeven. Conform de Europese zwemwaterrichtlijn is voor de zwemwaterkwaliteitsklasse 'goed' voor kust- en overgangswateren de bovengrenswaarde voor *E. coli* 500 kve/100 ml, voor intestinale enterococcen is dit 200 kve/100 ml. In Nederland wordt de grens van 1800 kolonievormende eenheden (kve)/100 ml met betrekking tot *E. coli* aangehouden als signaalwaarde voor overschrijding van het acute risico (Stuurgroep Water, 2013). Voor intestinale enterococcen ligt die grens bij 400 kve /100 ml.

Tabel 8. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor de twee onderzochte veldmonsters van de locatie Scheveningen Zwarte Pad en bijbehorende blanco's. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens.

monster code	datum / volume	omschrijving	rendement (%)	mens	hond	vogel	herkauwer
				DNA kopieën/l			
LMB-107873-OW	8 juni 100 ml	Scheveningen Zwarte Pad	46,5	1,6E+04	<2,2E+03	<1,1E+04	<2,2E+03
LMB-107872-UW	100 ml	Blanco	31,4	<3,2E+03	<3,2E+03	<1,6E+04	<3,2E+03
LMB-107881-OW	18 aug 100 ml	Scheveningen Zwarte Pad	59,8	2,9E+05	<1,7E+03	8,6E+03	<1,7E+03
LMB-107880-UW	100 ml	Blanco	36,2	<2,8E+03	<2,8E+03	<1,4E+04	<2,8E+03



Figuur 6. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci op de locatie Scheveningen Zwarte Pad in 2020 en de op twee momenten vastgestelde DNA-resultaten van potentiële fecale bronnen. *E. coli* en intestinale enterococci zijn uitgedrukt in een lineaire schaal in kve (kolonievormende eenheden) per 100 ml; de DNA-merkers zijn uitgedrukt op een loglineaire schaal in DNA-kopieën/l. De twee datums met DNA analyses zijn weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as.

De signaalwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci worden in 2020 niet overschreden. Er zijn wel een aantal licht tot sterk verhoogde waarden zichtbaar, voor intestinale enterococci op 6 juli en vooral op 18 augustus, en voor *E. coli* op 3 augustus en vooral op 18 en 19 augustus. Het monster voor 19 augustus is niet aangeleverd voor DNA analyse. Op 17 augustus is er 's avonds bij Scheveningen ongezuiverd rioolwater geloosd vanwege een langdurige stroomstoring eerder die dag. Hierna is door Delfland een negatief zwemadvies voor het Noorder- en Zuiderstrand afgegeven. Dit kan effect hebben gehad op de monsters van 18 en 19 augustus bij Scheveningen Zwarte Pad. Deze locatie ligt ten noorden van locatie Noorderstrand, en de overheersende kuststroom is noordwaarts.

De verhoogde bacteriewaarden op 18 augustus corresponderen met een verhoogde waarde voor de DNA merker van zowel vogels als mensen. De DNA merker voor mensen wordt ook gedetecteerd op 8 juni, een meetmoment waarop geen verhoogde waarden voor *E. coli* of enterococci worden waargenomen. De toename op 18 augustus in de hoeveelheid DNA merker voor mensen ten opzichte van 8 juni wijst op een bijdrage van mensen aan de fecale bacteriewaarden op 18 augustus. De waarde op 8 juni is overigens ook niet erg laag. Dit kan duiden op een relatief hoge achtergrondwaarde van de DNA merker voor mensen onder 'normale' omstandigheden, waarbij deze achtergrondwaarde echter vanwege de in zeewater versnelde afname van de kweekbaarheid van de beide fecale indicatororganismen, niet overeenkomt met het vaststellen van ook verhoogde concentraties van *E. coli* of enterococci.

Het detecteren van de vogelmerker op 18 augustus geeft aan dat deze bron op die datum ook een rol kan hebben gespeeld. De mate waarin mens en vogels hier een rol spelen kan op basis van de DNA gegevens niet worden bepaald. De *Helicobacter* bacterie die wordt gebruikt voor de detectie van vogels als fecale bron komt in relatief

lage en zeer wisselende concentraties voor in de feces van vogels (Heijnen, 2015). Ze wordt alleen vastgesteld bij relatief hoge uitscheiding (dus relatief veel vogel feces).

Het zwemwaterprofiel uit 2020 (RWS ZD, 2020) geeft geen aanknopingspunten voor de meest waarschijnlijke bronnen als reden voor overschrijdingen in de periode 2017-2019.

4 Conclusies

De DNA-analyses zijn naar behoren verlopen, zonder enige indicatie van remming die van invloed zou kunnen zijn op de betrouwbaarheid van de hier gerapporteerde resultaten.

Voor Andijk Zwemstrand kunnen mensen als meest waarschijnlijke fecale bron worden aangewezen voor de verhoogde bacteriewaarden op 10 augustus. Op grond van eerder verzamelde DNA gegevens kunnen daarnaast ook vogels als mogelijke bron optreden.

Voor de zwemwaterlocatie It Soal konden op geen van beide meetdatums DNA merkers worden aangetoond. Mogelijk zijn de intestinale enterococci hier van natuurlijke herkomst. Er komen diverse niet-intestinale enterococci in het natuurlijk milieu voor die net als intestinale enterococci kunnen worden gevonden met de kweekmethode. De NEN-ISO 7899 methode voor detectie van intestinale enterococci vermeldt dit ook als een niet te voorkomen mogelijke foutbron. Om hier onderscheid in te maken zouden deze enterococci tot op soort kunnen worden geïdentificeerd. Zie ook Wubbels et al. (2014).

Voor 't Kleine Zeetje werden eveneens geen DNA merkers aangetoond, en ook hier zouden de enterococci mogelijk van natuurlijke herkomst kunnen zijn. Daarnaast bestaat hier bij een vastgestelde overschrijding van de *E. coli* waarde de mogelijke verklaring dat de indicator bacterie voor vogels, door relatief lage concentraties in de feces, niet vaak in heel hoge concentraties voorkomt, en wellicht was dat nu ook het geval.

Bij Strandbad Edam kon een overschrijding voor *E. coli* van 24 augustus worden gekoppeld aan de verhoogde waarde voor de DNA merker voor mensen. Voor de overschrijding door enterococci in mei, zonder een DNA merker, kan weer gelden dat deze van natuurlijke herkomst zijn. Het beeld voor Strandbad Edam is over de jaren duidelijk niet constant, maar de DNA merker voor mens is wel vrijwel steeds aangetroffen.

De hoge bacteriewaarden bij Zeestrand Termunten op 20 juli corresponderen met de DNA merker voor herkauwers. De waarde voor de DNA merker voor mensen op de hier als referentie voor lage bacteriewaarden gekozen datum van 14 september kan een na-ijl effect zijn van de overschrijding voor intestinale enterococci op 1 september. De DNA merker bacteriën overleven langer in water dan de met kweek vast te stellen fecale indicator bacteriën. Niettemin kan voor de enterococci ook hier gelden dat deze van natuurlijke herkomst zijn. Het beeld is in ieder geval dat herkauwers over de jaren steeds aanwezig zijn, en dit zou naast de schapenbegrazing van de dijk, mede kunnen worden veroorzaakt door uitslagwater van een poldergemaal in de omgeving.

De verhoogde bacteriewaarden voor Scheveningen Zwarte Pad op 18 augustus corresponderen met een verhoogde waarde voor de DNA merker van zowel vogels als mensen. Op 17 augustus is er 's avonds bij Scheveningen ongezuiverd rioolwater geloosd vanwege een langdurige stroomstoring eerder die dag.

5 Referenties

Becker, E., Ruiten, H., Ahmed, A., Goris, M., Wullings, B.A., Kardinaal, W.E.A., (2017). Nieuw DNA-instrument voor opsporen van ziekte van Weil bacteriën en de bron in oppervlaktewater. *WaterMatters* (2017) 2, pp.28-31.

Heijnen, L., & Kardinaal, E., (2013). DNA analyse fecale verontreiniging: 2013. Rapport KWR 2014.005.

Heijnen, L., & Learbuch, K., (2013). Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen BTO rapport 2013.014.

Heijnen, L., Learbuch, K., Kardinaal, E., Rotteveel, S., Ruiten, H., & Leenen, I., (2014). Fecale verontreiniging in zwemwater identificeren met DNA-merkers. *H2O* April 2014.

Heijnen, L., (2015). Eigenschappen van DNA-merkers voor fecale verontreiniging. KWR BTO rapport 2015.023.

Hootsmans, M.J.M., (2019). DNA bronopsporing op vier zwemwaterlocaties in Midden-Nederland in 2019. Rapport KWR 2019.104.

Kardinaal, E., (2016). Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2015. Rapport KWR 2015.079.

Kardinaal, E., (2016). Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2016. Rapport KWR 2016.118.

Kardinaal, E., (2017). Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2017. Rapport KWR 2017.077.

Kardinaal, E., (2018). Bronosporen fecale verontreiniging in Rijkswateren 2018. Rapport KWR 2018.129.

Kardinaal, E., & Heijnen, L., (2014). Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2014. Rapport KWR 2014.098.

RWS MN, (2018). Zwemwaterprofiel Andijk Zwemstrand.

RWS MN, (2019a). Zwemwaterprofiel It Soal.

RWS MN, (2019b). Zwemwaterprofiel 't Kleine Zeetje.

RWS MN, (2020). Zwemwaterprofiel Strandbad Edam.

RWS NN, (2019). Zwemwaterprofiel Zeestrand Termunten.

RWS ZD, (2020). Zwemwaterprofiel Scheveningen Zwarte Pad.

Stuurgroep Water, (2013). Beslisnotitie werkwijze individuele metingen en meetfrequentie microbiologische parameters zwemwaterrichtlijn, vastgesteld op 14 maart 2013.

Wubbels, G. , Veenendaal, G., Schaap, M., Lijzenga, T. & Douma, A., (2015). Snelle analyse van fecale verontreiniging in drinkwater. H2O-Online (2 januari 2015).

Jaar van publicatie
2020

[Meer informatie](#)

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

Groningenhaven 7
Postbus 1072
3430 BB Nieuwegein

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

KWR 2020.132 | 25 november 2020 ©KWR

Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - 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.

Keywords

fecale verontreiniging, DNA bronopsporing,
zwemwater