



BTO 2016.107 | December 2016

BTO rapport

Groei en afsterving van
E. coli bacteriën in
duinzand en entzand



BTO

E. coli groei in duinzand en entzand

BTO 2016.107 | December 2016

Opdrachtnummer

400554-153

Projectmanager

Luc Hornstra

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Hygiëne en veiligheid

Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

Auteurs

Nikki van Bel, Anita van der Veen, Anke Brouwer, Wim
Hijnen

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Jaar van publicatie
2016

Meer informatie
dr. Nikki van Bel
T 030-6069516
E Nikki.van.Bel@kwrwater.nl

Keywords
E. coli, duinzand, entzand,
indicator organisme

PO Box 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



BTO 2016.107 | December 2016 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden vervoelvoudigd, 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.

BTO Managementsamenvatting

E. coli bacteriën kunnen beperkt groeien in duinzand, maar *E. coli* in onttrokken duininfilttraat zijn waarschijnlijk van fecale herkomst

Auteurs dr. ir. Nikki van Bel, dr. ing. Wim Hijnen, prof. dr. Gertjan Medema

E. coli bacteriën die door duinwaterbedrijven af en toe in onttrokken duininfilttraat worden aangetroffen, zijn waarschijnlijk van fecale herkomst. Dit blijkt uit literatuuronderzoek en *E. coli* groeiproeven die zijn uitgevoerd met entzand en duinzand. *E. coli* is een indicatororganisme voor fecale besmetting van drinkwater, wat het belangrijk maakt om het vóórkomen ervan te kunnen duiden. Literatuuronderzoek laat zien dat in een gematigd klimaat *E. coli* deel kan uitmaken van een natuurlijke bacteriepopulatie. Groeiproeven tonen aan dat in de Nederlandse situatie *E. coli* bij 15°C kan groeien in entzand en in beperkte mate in duinzand. De *E. coli* groei is sterker in zand met een hoger vochtpercentage en gehalte organisch materiaal. De maximale concentraties in entzand zijn hoger dan in duinzand, waarschijnlijk doordat in duinzand de autochtone microbiële flora competeert met de *E. coli* bacteriën. Ondanks dat *E. coli* kan groeien in duinzand, lijkt dit geen verklaring te zijn voor *E. coli* bacteriën in het onttrokken duininfilttraat, deze zijn waarschijnlijk van fecale afkomst. Aanbevolen wordt om een methode op te zetten waarmee fecale en natuurlijke *E. coli* bacteriën van elkaar kunnen worden onderscheiden en om na te gaan of andere (pathogene) bacteriën ook in zand kunnen groeien. Deze informatie kan vervolgens gebruikt worden voor de risicoberekeningen zoals die voor de AMVD uitgevoerd moeten worden.



De *E. coli* groeiproeven in duinzand en entzand

Belang: Mogelijke groei van indicator organisme *E. coli* in duinzand en entzand

Duinwaterbedrijven vinden af en toe *E. coli* bacteriën in onttrokken duininfilttraat: een belangrijke schakel in het waterzuiveringsproces. Omdat *E. coli* een indicatororganisme is voor fecale

besmetting van drinkwater, is het van belang om te duiden wat deze waarnemingen betekenen. In het kader van de AMVD (analyse microbiologische veiligheid drinkwater) worden dan ook vraagtekens gezet bij de betekenis van deze *E. coli* waarnemingen. Gaat het om herbesmetting met

fecaliën of is er een andere, ‘natuurlijke’ bron zonder gezondheidsrisico? Tot nu toe is aangenomen dat *E. coli* zich in Nederland niet onder natuurlijke omstandigheden kan vermeerderen. Recente wetenschappelijke literatuur maakt voor verschillende soorten zand of aarde wel melding van de groei van ‘naturalized’ (of genaturaliseerde) *E. coli* in een gematigd klimaat. Eerder onderzoek liet zien dat *E. coli* zich kan vermeerderen in entzand. Voor duinzand, in aanwezigheid van natuurlijke micro-organismen, bestaat die bevestiging nog niet.

Doel van dit onderzoek is om in het kader van de AMVD (analyse microbiologische veiligheid drinkwater) de mogelijke groei en vestiging van *E. coli* in ent- en duinzand vast te stellen.

Aanpak: groeiproeven bij uiteenlopende temperatuur, vochtgehalte en voedingsstoffen

Het eerste deel van dit onderzoek betreft literatuuronderzoek naar bestaande kennis over vermeerdering van *E. coli* in het milieu, met name in gematigde klimaten. In het tweede deel zijn *E. coli* groeiproeven uitgevoerd in entzand en duinzand, afkomstig uit het ICAS infiltratiegebied in Castricum. Hierbij zijn verzamelde ganzenkeutels gebruikt als bron van organisch materiaal (voeding voor de bacteriën). Voorafgaand aan de experimenten is de chemische en microbiologische samenstelling van het zand vastgesteld.

De groeisnelheid van *E. coli* is bepaald in water van verschillende temperaturen en in ent- en duinzand bij uiteenlopende temperatuur, vochtgehalte en gehalte aan organisch stof (ganzenkeutelextract). De nagebootste omstandigheden in de proeven komen overeen met de natuurlijke condities in Nederland.

Resultaten: groei en vestiging *E. coli* in duinzand aangetoond

In een gematigd klimaat kan *E. coli* zich onder natuurlijke omstandigheden vermeerderen, zo blijkt uit het literatuuronderzoek. Echter, de geteste condities wijken af van de Nederlandse situatie.

Tevens blijken *E. coli* bacteriën van fecale oorsprong en ‘natuurlijke’ *E. coli* bacteriën genetisch te verschillen. Dit maakt onderscheid tussen de twee mogelijk

De groeiproeven tonen aan dat de groeisnelheid van *E. coli* in water van 10°C, 15°C en 25°C nagenoeg gelijk is. Bij 5°C treedt geen groei op. In zand vindt groei plaats bij 15°C. *E. coli* groei is het sterkst in entzand met een relatief hoog vochtpercentage en gehalte aan organisch materiaal. Duinzand scoort onder die omstandigheden aanzienlijk lager. Vermoedelijk zorgt de uitgebreide autochtone microbiële flora in duinzand voor competitie met *E. coli*, wat de groei bemoeilijkt in de proef. In entzand is de natuurlijke bacteriepopulatie aanzienlijk kleiner, wat gunstig is voor *E. coli* groei. De beperkte groei van *E. coli* in duinzand lijkt geen verklaring voor de bacteriën in het onttrokken duininfiltraat, deze zijn waarschijnlijk van fecale afkomst.

Implementatie: *E. coli* in onttrokken duininfiltraat zijn waarschijnlijk niet van fecale herkomst

Andere omstandigheden (b.v. hogere temperatuur of minder achtergrondflora zoals in entzand) zou aanleiding kunnen zijn tot sterkere groei van *E. coli*. Aanbevolen wordt om de groei van *E. coli* onder dergelijke omstandigheden na te gaan.

Daarnaast stellen we voor een techniek op te zetten waarmee genetische verschillen tussen *E. coli* populaties kunnen worden aangetoond. Hierin is het van belang om per locatie een database op te zetten van genetische analyses van *E. coli* van verschillende (fecale) herkomst, voordat aangetroffen *E. coli* hiermee kan worden vergeleken.

Het huidige onderzoek geeft onvoldoende aanleiding om de AMVD van duininfiltratie aan te passen. Meer kennis over de mogelijke groei van *E. coli* in zand en de herkomst van *E. coli* in onttrokken duininfiltraat (natuurlijk of van fecale herkomst) is daarvoor nodig.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in rapport ‘Groei en afsterving van *E. coli* bacteriën in duinzand en entzand’ (BTO 2016.107).

Inhoud

Inhoud	3
1 Inleiding	5
1.1 Aanleiding	5
1.2 Doel	5
1.3 Aanpak	5
2 Literatuuronderzoek	7
2.1 Introductie	7
2.2 Genaturaliseerde <i>E. coli</i>	7
2.3 Minimale groeitemperatuur voor <i>E. coli</i>	9
2.4 Groei van <i>E. coli</i> in grond	10
2.5 Bron van <i>E. coli</i> verontreiniging	14
2.6 Groei van enterococci in zand	15
2.7 Conclusies	15
3 Materiaal en methoden van het experimentele onderzoek	17
3.1 Bemonstering ganzenkeutels en duinzand	17
3.2 Entzand	19
3.3 Microbiologische karakterisatie duinzand	19
3.4 Next generation sequencing	20
3.5 Chemische karakterisatie duinzand	20
3.6 Groeiproeven	20
3.7 Microbiologische analyse methoden	21
4 Resultaten groeiproeven	22
4.1 Analyse van ganzenkeutels en duinzand	22
4.2 Groei van <i>E. coli</i> in mineraalmedium	26
4.3 <i>E. coli</i> groeiproeven in zand	27
5 Discussie	39
5.1 <i>E. coli</i> als indicatororganisme	39
5.2 <i>E. coli</i> bacteriën in onttrokken duininfiltreet: fecale of natuurlijke afkomst?	40
5.3 Groei van andere micro-organismen	40
5.4 Voorzorgsmaatregelen voor het gebruik van entzand	40
6 Conclusies en aanbevelingen	42
6.1 Conclusies	42
6.2 Aanbevelingen	42
7 Referenties	43
Bijlage I <i>E. coli</i> groei in mineraalmedium	45

Bijlage II Pilot groeiexperiment	46
Bijlage III Chemische analyse duinzand	48
Bijlage IV Korrelgrootteverdeling duinzand	50
Bijlage V Meetresultaten van groeiexperiment (na correctie voor recovery)	51
Bijlage VI NGS van duinzand en ganzenkeutelextract	53
• Resultaten NGS op familieniveau	53
• Resultaten NGS op orderniveau	54

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

Duinwaterbedrijven vinden af en toe *E. coli* in groot volume monsters onttrokken duinfiltraat. In het kader van de AMVD (analyse microbiologische veiligheid drinkwater) worden vraagtekens gezet bij de betekenis van deze *E. coli* waarnemingen. Duidt dit op herbesmetting met fecaliën of is er een andere 'natuurlijke' bron die geen risico geeft. Binnen het TKI onderzoek naar gebruik van calciëet als entmateriaal werd bij proeven naar de afsterving van *E. coli* in entzand en calciëet gezien dat een reincultuur van *E. coli* (stam WR1) die in een lage en hoge concentratie aan gedroogd (granaat)zand was toegevoegd bij een relatief lage temperatuur en vochtigheid zich kon vermeerderen (tweemaal in meerdere zandsoorten waargenomen) (KWR 2015.017). Tot nog toe is aangenomen dat vermeerdering van *E. coli* in het milieu onder Nederlandse condities niet plaatsvindt. In recente wetenschappelijke literatuur wordt inmiddels wel de groei van 'naturalized' *E. coli* in verschillende soorten zand of aarde in gematigd klimaat gerapporteerd. In dit rapport worden deze bacteriën genaturaliseerde *E. coli* genoemd. Omdat *E. coli* als indicatororganisme voor fecale besmetting gebruikt wordt, is het van belang om te bepalen of deze waarnemingen betekenen dat *E. coli* niet als exclusief fecale indicator mag worden beschouwd.

In zand, onder natte condities zoals bij (langzame) zandfilters, wordt groei niet waargenomen. Belangrijke factoren die hiervoor verantwoordelijk zijn, zijn concurrentie met van nature aanwezige micro-organismen om de aanwezige nutriënten, lage temperatuur en predatie door protozoën. De gegevens van vermeerdering in entzand bij lage temperatuur en vochtigheid zou kunnen betekenen dat vermeerdering onder vergelijkbare condities in een vergelijkbaar milieu kan voorkomen. Besmetting van onttrokken duinfiltraat met *E. coli* wordt geregeld waargenomen. Deze besmetting is afkomstig van fecaal materiaal aanwezig in/op de bovenstaande onverzadigde zone van duinzand. Wanneer daar vermeerdering van *E. coli* stammen optreedt die daar toe in staat zijn (genaturaliseerde *E. coli*), geeft dat een vertekend beeld van de mate van fecale besmetting. De gevonden *E. coli* bacteriën gedragen zich niet conservatief maar hebben zich vermeerderd in het milieu. Het gaat dan om een overschatting ten opzichte van de condities waarbij die vermeerdering niet plaatsvindt.

Onbekend is of *E. coli* bacteriën in staat zijn zich te vermeerderen in duinzand, in de aanwezigheid van de natuurlijke populatie micro-organismen.

1.2 Doel

Het doel van dit onderzoek is om vast te stellen of *E. coli* bacteriën zich in duinzand kunnen vermeerderen in de aanwezigheid van de natuurlijk populatie micro-organismen en variërende omstandigheden.

1.3 Aanpak

In het eerste deel van dit onderzoek wordt een overzicht gegeven van de bestaande kennis over vermeerdering van *E. coli* in het milieu, met name vermeerdering in gematigde klimaten. In het tweede deel worden groeiproeven in ent- en duinzand en water uitgevoerd. De groeisnelheid van *E. coli* WR1 in water wordt op verschillende temperaturen bepaald. Vervolgens wordt met laboratoriumexperimenten nagegaan of *E. coli* WR1 kan groeien in bemonsterd duinzand onder verschillende omstandigheden. Als referentie worden de

experimenten met entzand uit het calciëet herhaald. Hierbij wordt gevarieerd in temperatuur, vochtgehalte en organisch stof gehalte in de vorm van ganzenkeutelextract. Daarbij wordt het protocol van het calciëet onderzoek gebruikt, waarbij een kleine hoeveelheid *E. coli* is toegevoegd aan zand en vervolgens de aantallen in de tijd zijn gevolgd. Daarbij worden de Nederlandse natuurlijke condities nagebootst waarbij mogelijk groei optreedt.

2 Literatuuronderzoek

2.1 Introductie

Om de microbiologische kwaliteit van (drink)water te garanderen wordt er gemonitord op de fecale bacteriën *E. coli* en enterococci (hierbij kan onderscheid worden gemaakt tussen fecale en niet-fecale enterococci). Aanwezigheid van deze bacteriën in het water wordt gezien als een indicatie dat het water fecaal besmet is en dat er, mogelijk, andere ziekteverwekkende pathogenen aanwezig zijn. In de wetenschappelijke literatuur wordt sinds een aantal jaar melding gemaakt van *E. coli* bacteriën die zich kunnen vermeerderen in de bodem in zowel (sub)tropische als gematigde klimaten. Dit worden 'naturalized' of genaturaliseerde *E. coli* genoemd. Met de standaard kweekmethode kan geen onderscheid worden gemaakt tussen fecale en natuurlijke *E. coli* bacteriën. De aanwezigheid van natuurlijke *E. coli* kan daardoor de betrouwbaarheid van *E. coli* als indicatororganisme voor fecale verontreiniging verlagen.

Het gepubliceerde wetenschappelijk onderzoek is zeer gevarieerd. Zo verschillen het heersende klimaat, het soort bodemmateriaal en lokale situatie. In dit literatuuronderzoek wordt een overzicht gegeven van de bestaande kennis rondom de aanwezigheid en vermeerdering van *E. coli* in een gematigd milieu.

2.2 Genaturaliseerde *E. coli*

In 2006 zijn genaturaliseerde *E. coli* voor het eerst aangetoond (Ishii *et al.*, 2006, 2007, 2008), al waren er eerder al aanwijzingen dat *E. coli* populaties in zand in subtropisch (Solo-Gabriele, *et al.*, 2000) en gematigd klimaat (Whitman, *et al.*, 2003) konden overleven en groeien. Het ging hier om *E. coli* bacteriën die gedurende meerdere seizoenen geïsoleerd konden worden van één locatie, waarbij gedurende de wintermaanden door middel van kweek geen of zeer weinig *E. coli* gedetecteerd konden worden. Het onderzoek van Ishii, *et al.* (2006) laat zien dat *E. coli* populaties van verschillende monsternamelocaties onderling genetisch sterk verschillen, maar dat de populatie op één locatie gedurende het jaar vrij stabiel was (Figuur 8). Tevens waren er ook geen overeenkomsten zijn met een bekende dierlijke (fecale) bron. Dit suggereert dat deze *E. coli* stammen genaturaliseerd zijn en op die specifieke locatie kunnen groeien los van fecaal materiaal. Het is nog niet duidelijk of genaturaliseerde *E. coli* bacteriën zijn ontstaan door genetische aanpassing van fecale *E. coli* aan het milieu, of dat een bepaald *E. coli* isolaat uit feces door de heersende milieuomstandigheden wordt geselecteerd en kan gaan groeien.

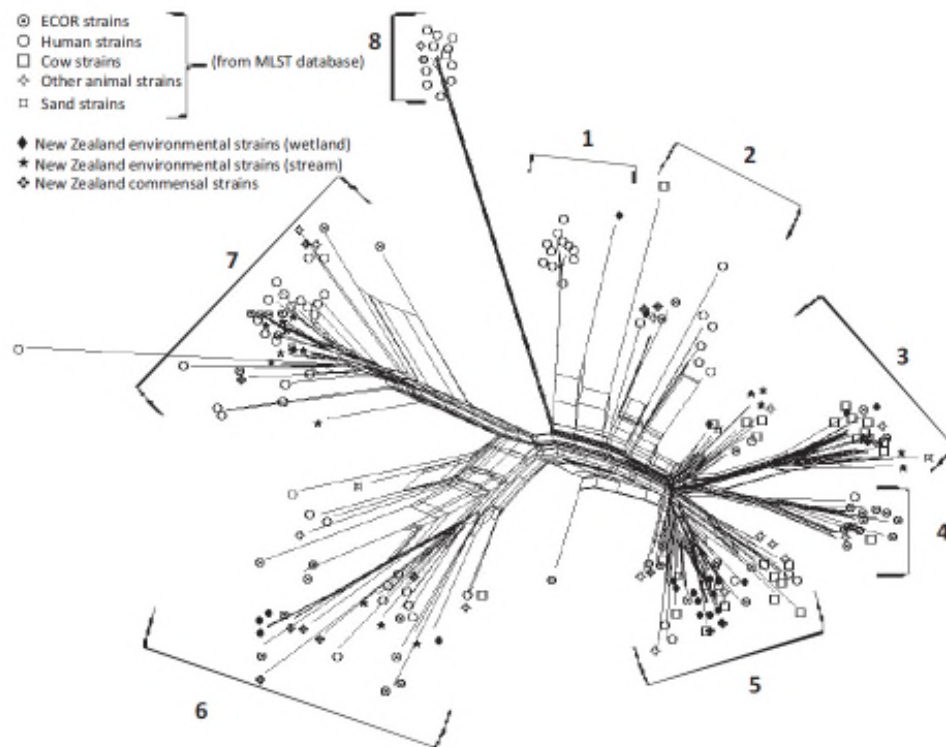
Dit is inmiddels in verschillende onderzoeken bevestigd (reviewed in Whitman *et al.*, 2014). In het algemeen zijn bacteriepopulaties duidelijk genetisch van elkaar, en van bekende (fecale) bronnen, te onderscheiden en worden ze gedurende het hele jaar gevonden. In sommige gevallen zijn de bacteriën in de winter niet detecteerbaar, maar is de bacteriepopulatie die in het voorjaar opkomt genetisch gelijk aan die van de zomer daarvoor.

Eén voorbeeld zijn de overeenkomsten en verschillen tussen *E. coli* populaties in van elkaar gescheiden waterplassen. Analyse van *E. coli* bacteriën geïsoleerd uit deze waterplassen, in een gebied waar gedurende de zomer geen stroming optreedt en de waterplassen van elkaar gescheiden zijn, laat zien dat elke waterplas zijn eigen populatie *E. coli* isolaten ontwikkelt (Chandrasekaran *et al.*, 2015). Tevens kunnen op één locatie, gedurende het jaar verschillende, van elkaar geïsoleerde, bacteriepopulaties aanwezig zijn (zie Tabel 1).

TABEL 1. OVEREENKOMSTEN TUSSEN *E. COLI* POPULATIES (GEBASEERD OP DNA ANALYSE) VAN VIER WATERPLASSEN (SM1-4) IN ÉÉN GEBIED. IN HET VOORJAAR STAAN DE VERSCHILLENDE WATERPLASSEN MET ELKAAR IN VERBINDING VIA HET WATER (A). IN DE ZOMER VALT HET GEBIED GROTENDEELS DROOG ZODAT ER GEEN UITWISSELING TUSSEN DE WATERPLASSEN PLAATS KAN VINDEN (B). UIT: CHANDRASEKARAN *ET AL.*, 2015.

	Maximum similarities (%)			
	SM1	SM2	SM3	SM4
<i>A</i>				
SM1	62.50	12.50	4.17	16.67
SM2	20.83	58.33	4.17	12.50
SM3	12.50	8.33	83.33	20.83
SM4	4.17	20.88	8.33	50.00
<i>B</i>				
SM1	75.00	0.00	8.33	0.00
SM2	8.33	100.00	8.33	0.00
SM3	4.17	0.00	79.17	8.33
SM4	12.50	0.00	4.17	91.67

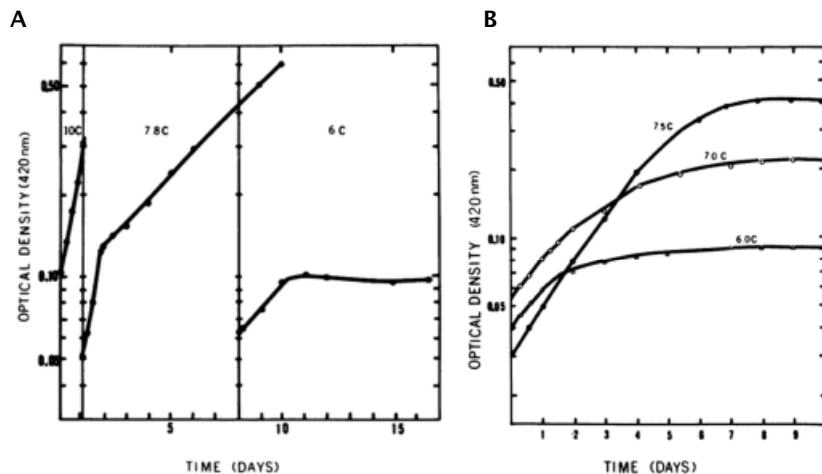
In ander onderzoek zijn in grond *E. coli* isolaten gevonden die sterke verwantschap toonden met isolaten van humane en knaagdier afkomst (Figuur 1, Perchec-Merien, *et al.*, 2013). Tevens werden op die locatie isolaten bemonsterd die niet geheel aan een mogelijke bron konden worden toegeschreven, maar wel overeenkomsten vertoonden met een bron. De schrijvers suggereren dat hier mogelijk *E. coli* isolaten zijn bemonsterd die van origine van fecale afkomst zijn, maar inmiddels aan het veranderen zijn naar een genaturaliseerde *E. coli*. Hier zou dus sprake kunnen zijn van een tussenvorm tussen fecale *E. coli* en genaturaliseerde *E. coli*, al is deze conclusie speculatief.



FIGUUR 1. FILOGENETISCHE BOOM VAN *E. COLI* ISOLATEN UIT EEN DATABASE MET BEKENDE HERKOMST (163X, HUMAAN, RUND, ZAND, OVERIG DIERLIJK EN ECOR (*E. COLI* REFERENTIE COLLECTIE)), GEÏSOLEERD UIT WATER (17X) EN GROND (22X) EN DIERLIJK MATERIAAL (12X). UIT: PERCHEC-MERIEN, *ET AL.*, 2013.

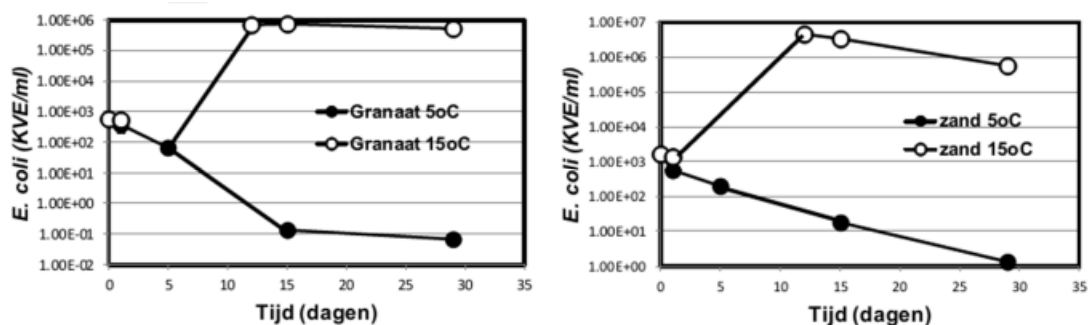
2.3 Minimale groeitemperatuur voor *E. coli*

De optimale groeitemperatuur van *E. coli* ligt op 37°C, de minimale groeitemperatuur ligt echter veel lager. Shaw *et al.* laten zien dat aanhoudende, exponentiële groei van *E. coli* in mineraal medium plaats kan vinden bij 7,8°C (Figuur 2). Bij lagere temperaturen (7,0°C en 7,5°C) vond er wel groei plaats, maar deze groei vlakt vervolgens af. Bij 6°C vond er nauwelijks groei plaats.



FIGUUR 2. GROEI VAN *E. COLI* ALS REINCULTUUR IN MINERAAL MEDIUM BIJ VERSCHILLENDE TEMPERATUREN. GEGEVEN IS DE CELDICHTHEID VAN HET MEDIUM WELKE MET OPTISCHE METHODEN IS BEPAALD. UIT: SHAW *ET AL.*, 1971.

In TKI onderzoek is aangetoond dat *E. coli* bij een relatief lage temperatuur in entzand en granaatzand kan groeien. Bij 15°C, maar niet bij 5°C, kan *E. coli* zich vermenigvuldigen tot een concentratie van ongeveer 10^7 kve/ml zand. Voor deze experimenten zijn *E. coli* WR1 bacteriën gegroeid in mineraal medium en homogeen gemengd met onder andere entzand en granaatzand waarna met behulp van kweek de concentratie in het zand is bepaald (Figuur 3, KWR 2015.107).



FIGUUR 3. ONTWIKKELING VAN *E. COLI* IN DROOG ENTZAND EN GRANAATZAND BIJ 5 EN 15°C. UIT: KWR 2015.107.

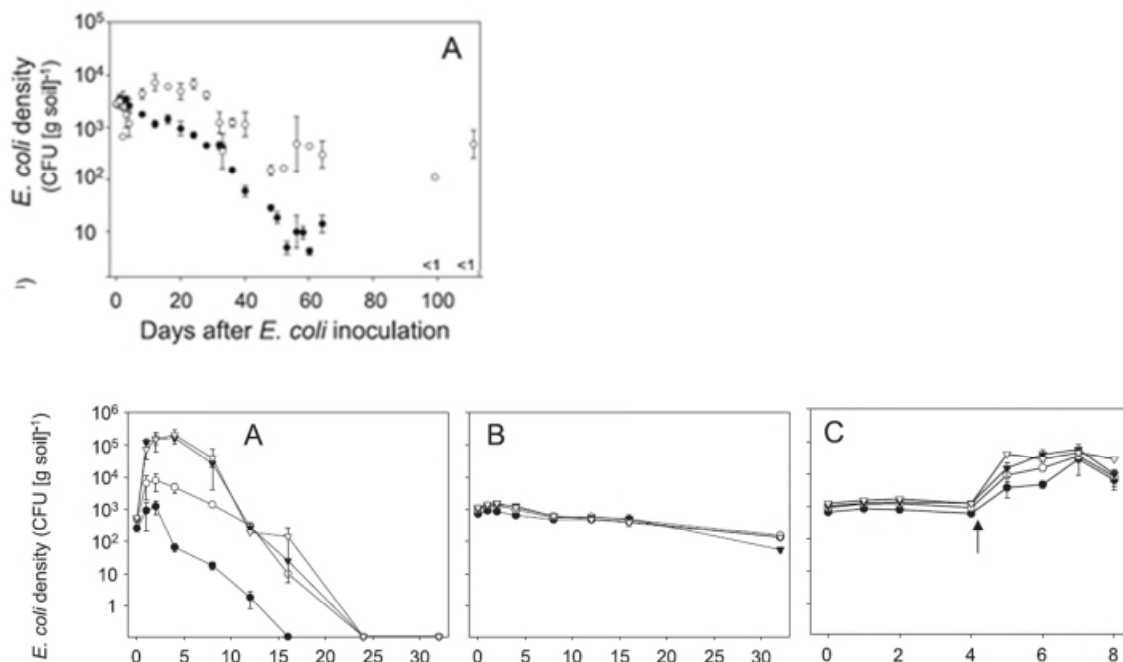
2.4 Groei van *E. coli* in grond

E. coli bacteriën in water en zand staan onder invloed van een groot aantal factoren. Onder andere temperatuur, zonlicht, UV straling, contact met een waterbron, gehalte organisch materiaal, aanwezigheid van nutriënten, vochtgehalte en (competitie met) de autochtone microbiële populatie en predatie hebben invloed op de ontwikkeling van *E. coli* in water, sediment, zand en andere grondsoorten. In het algemeen is de afsterving van *E. coli* in water sneller dan in zand, en de afsterving in steriel zand is minder snel dan zand waarin de autochtone flora (bijvoorbeeld bacteriëfagen, bacteriën en protozoa) aanwezig is en er competitie optreedt (reviewed in Whitman *et al.*, 2015).

Al in de jaren 90 van de vorige eeuw zijn de eerste onderzoeken naar mogelijke groei van fecale indicator bacteriën in alternatieve omgevingen als water en grond uitgevoerd. Hieruit

werd duidelijk dat *E. coli* bacteriën in tropische gebieden in verschillende soorten grond kunnen groeien. In 2000 werd bekend dat *E. coli* dit ook kan in subtropische gebieden. In 2003 waren er de eerste aanwijzingen dat dit ook het geval zou kunnen zijn in gematigde klimaten. Inmiddels is aangetoond dat *E. coli* kan groeien in veel verschillende soorten omgevingen, waaronder in grond, slib, strand zand van zowel zoet als zoutwater stranden (reviewed in Whitman, *et al.*, 2014). Over groei van *E. coli* bacteriën in duinzand is geen wetenschappelijke literatuur beschikbaar.

Dosering van *E. coli* (geïsoleerd uit dezelfde grond) op locatie aan de grond bij een rivierbedding liet geen groei, maar afsterving, zien in het aantal kweekbare bacteriën gedurende de zomerperiode (juni-oktober; gesloten cirkels in de bovenste grafiek van Figuur 4). Bij bepaling van de *E. coli* concentratie met qPCR (open cirkels) was wel een lichte stijging zichtbaar. Met de qPCR methode wordt de hoeveelheid *E. coli* specifiek DNA gemeten, terwijl met de traditionele kweekmethode alleen kweekbare *E. coli* bacteriën worden geteld. De qPCR methode telt al het aanwezig DNA, onafhankelijk of het afkomstig is van kweekbare, dode of VBNC (viable but not culturable) bacteriën, hierdoor is het qPCR-sigitaal hoger dan de telling met kweek. In de grond van de rivierbedding kwam de temperatuur niet boven de 25°C en daalde het vochtpercentage gedurende de meetperiode van 17% naar 10% (Ishii *et al.*, 2010). Experimenten in het laboratorium met deze grond laten alleen groei bij 37°C zien en niet bij 15°C, een hoger vochtpercentage had bij 37°C een positief effect op groei. Afsterving bij 37°C was sterker dan op 15°C.



FIGUUR 4. ONTWIKKELING VAN *E. COLI* IN GROND BIJ VERSCHILLENDE TEMPERATUREN EN VOCHTGEHALTES. BOVEN: ONTWIKKELING VAN *E. COLI* OP LOCATIE IN DE RIVIERBEDDING. *E. COLI* BEPALING IS UITGEVOERD MET QPCR (OPEN RONDJES) OF KWEK (GESLOTEN RONDJES). ONDER: GROEI VAN *E. COLI* IN DEZELFDE GROND MAAR IN HET LABORATORIUM. INCUBATIE OP 37°C (A), 15°C (B) EN 15°C EN VANAF DE PIJL BIJ 37°C (C) BIJ VERSCHILLENDE VOCHTGEHALTES. UIT: ISHII *ET AL.*, 2010.

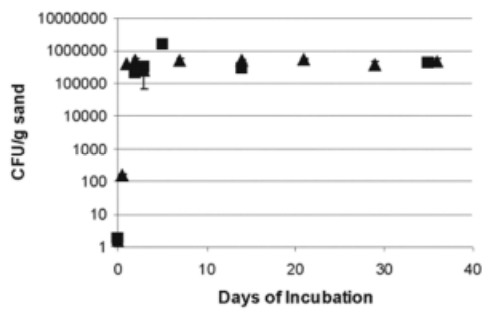
Van 3 verschillende rivierbeddingen zijn gedurende één jaar de *E. coli* aantallen in de grond gemonitord (Ishii *et al.*, 2006). De rivierbeddingen verschilden van elkaar in het gehalte organisch materiaal (0,5 – 56,6%) en de afstand van het monsternamepunt tot de waterlijn (0 – 14 meter). Tussen juni en oktober zijn er hoge aantallen *E. coli* aanwezig in de grond (10^3 /gram grond). De overige tijd zijn *E. coli* niet of nauwelijks detecteerbaar.

Laboratoriumexperimenten waarbij aan deze grondsoorten een locatie-specifiek *E. coli* isolaat is gedoseerd, laat alleen groei zien bij 37°C, maar niet bij lagere temperaturen (4-30°C). Bij de lagere temperaturen vind er echter ook nauwelijks afsterving plaats, wat de stabiele *E. coli* populatie gedurende het jaar kan verklaren (Ishii *et al.*, 2006).

Om te bepalen *E. coli* bacteriën in het strandzand van Lake Michigan kunnen repliceren, is in laboratorium experimenten *E. coli* aan het zand gedoseerd. Dit laat zien dat vooral in de eerste 24 uur groei plaats vindt. Incubatie bij kamertemperatuur geeft de hoogste groei (vergeleken met 4°C, 37°C en 44,5°C) en zorgt ook, samen met een temperatuur van 4°C, voor de minst sterke afsterving in de volgende 18 dagen (Beversdorf *et al.*, 2006). Genetische analyse van *E. coli* aanwezig in dit strandzand van Lake Michigan laat zien dat een deel van de bacteriën genetisch identiek is aan elkaar. Volgens de auteurs wijst deze gelijkenis erop dat deze bacteriën zich in dit zand kunnen handhaven en groeien, bij verschillende vochtpercentages (0-4%, 15-19% en 20-24%) en gematigde temperaturen. Een andere mogelijkheid is dat de *E. coli* bacteriën allemaal van dezelfde bron afkomstig zijn en daarom een gelijkend genetisch profiel hebben. Volgens de auteurs is dit echter minder waarschijnlijk aangezien op monsternamepunten waar afvloeiing van water van hogerop plaatsvindt, zoals hier het geval is, er meestal meerdere bronnen zijn met een grote diversiteit aan *E. coli* isolaten als gevolg.

In laboratoriumexperimenten met gesteriliseerde modder (landbouwgrond, rijk aan organische stoffen, 63% vocht) en 'fine sand' (laag organisch stofgehalte, 17% vocht) bij 30°C, is de overleving twee dagen na enting van *E. coli* in modder 3 maal zo groot is als in fine sand (Tate *et al.*, 1978). *E. coli* kunnen ook groeien in deze steriele modder. De maximale waarden die hierbij behaald worden ($1.2 \cdot 10^7$ kve/gram zand) zijn ongeveer gelijk aan eerdere experimenten in entzand, calciet en granaatzand (10^7 kve/gram zand; KWR 2015.107) (Figuur 3) en in zand en modder (10^7 - 10^8 kve/gram zand; LaLiberte en Grimes, 1982).

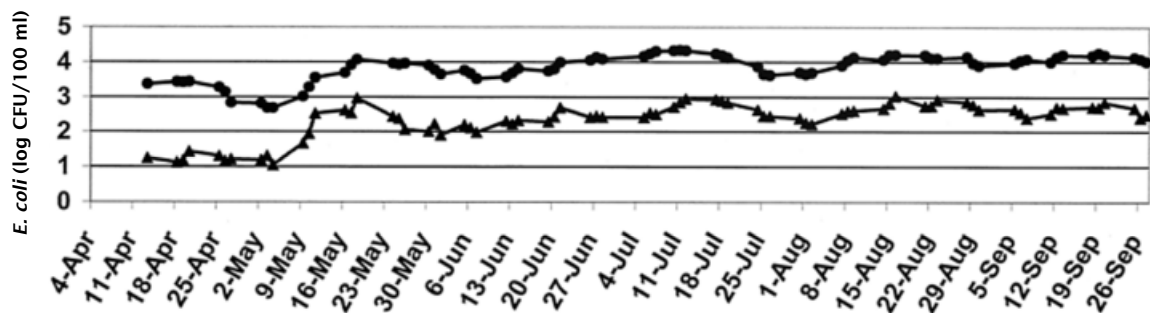
In experimenten met steriel strandzand bij Lake Huron, bij 19°C, wordt een lagere maximale opbrengst behaald: 10^5 - 10^6 kve/gram zand in de eerste 48 uur (Figuur 5). Deze concentratie blijft de volgende 38 dagen wel gelijk en vindt er geen afsterving plaats (Alm, *et al.*, 2006).



FIGUUR 5. GROEI VAN *E. COLI* IN STERIEL STRANDZAND VAN LAKE HURON, BIJ 19°C. UIT: ALM *ET AL.*, 2006.

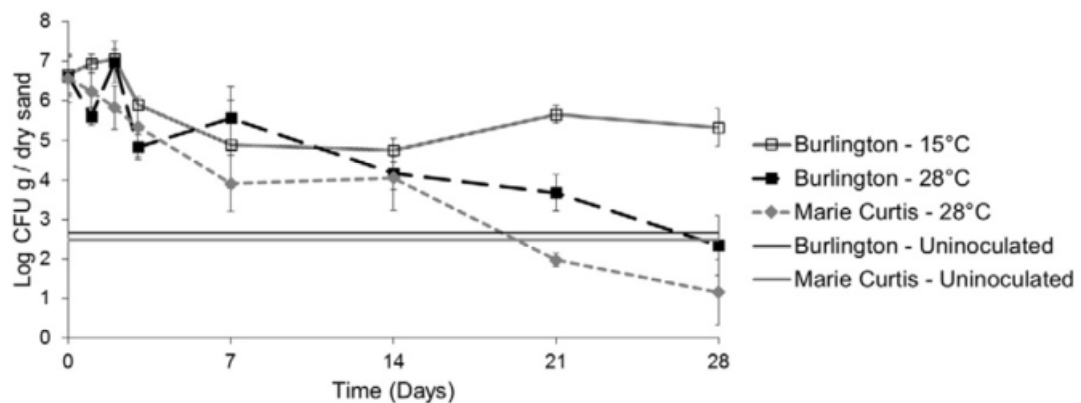
Hoge *E. coli* concentraties worden dus in meerdere steriele grond- en zandsorten behaald. Echter, in niet-gesteriliseerde grond is deze groei minder sterk, wat naar alle waarschijnlijkheid wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van de autochtone natuurlijke bacteriepopulatie die competeert met *E. coli*.

Een voorbeeld van beperkte groei van *E. coli* in een natuurlijke setting is Lake Michigan (Figuur 6) (Whitman, *et al.*, 2003). De *E. coli* concentratie van het zand is hier op meerdere momenten gedurende het jaar bepaald. Bij de start van de metingen in april (4,9°C) zijn de *E. coli* concentraties hoog (10^3 kve/100 ml). Begin mei stijgt de *E. coli* concentratie in het zand met ongeveer 1 log naar 10^4 kve/100 ml en blijft daarna vrij stabiel. Dit wordt toegeschreven aan een hogere water- en grondtemperatuur, maar is verder niet onderzocht. Echter, andere mogelijke verklaringen als een continue besmetting vanuit het water of via vogels worden om verschillende redenen niet waarschijnlijk geacht. De concentratie in het water, op dezelfde hoogte als waar het zand is bemonsterd, stijgt ook en deze zijn aan elkaar gecorreleerd. Gesuggereerd wordt dat het zand als *E. coli* reservoir dient voor het water.



FIGUUR 6. *E. COLI* GEHALTE (IN LOG KVE/100 ML) IN ZAND (CIRKELS) EN WATER OP 45 CM DIEPTE (DRIEHOEKJES) VAN LAKE MICHIGAN. UIT: WHITMAN, *ET AL.*, 2003.

Een ander voorbeeld van de rol van autochtone microbiële flora in het onderdrukken van *E. coli* groei in een natuurlijke omgeving is dat na dosering van *E. coli* aan niet-steriel fijn of grof zand, *E. coli* nauwelijks groeit bij 15°C en 28°C (Figuur 7). De afstervingssnelheid is lager bij de lagere temperatuur (Staley, *et al.*, 2016).

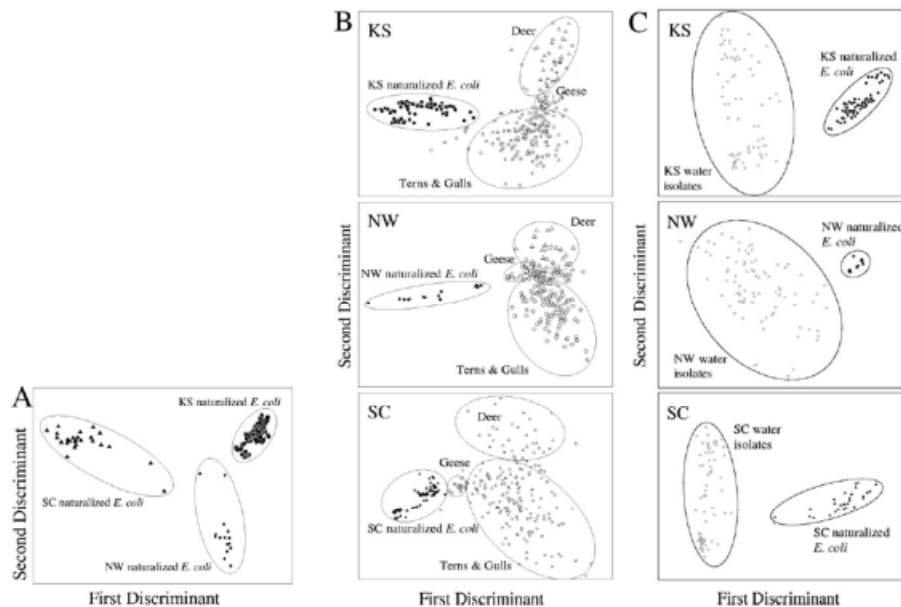


FIGUUR 7. GROEI VAN *E. COLI* IN NIET-STERIEL FIJN (BURLINGTON, KORRELDIAMETER: 0,23 MM) EN GROF (MARIE CURTIS, KORRELDIAMETER: 0,53 MM) STRANDZAND. UIT: STALEY, *ET AL.* 2016.

2.5 Bron van *E. coli* verontreiniging

Om te bepalen of *E. coli* bacteriën in een natuurlijke omgeving als grond of zand van fecale herkomst zijn of tot de autochtone flora behoren, worden de geïsoleerde bacteriën genetisch geanalyseerd. Een veel gebruikte techniek is (horizontal fluorophore enhanced) rep-PCR (rep-PCR of HFERP). Deze techniek is uitgebreid besproken in Ishii, *et al.*, 2009.

Kort samengevat wordt in deze techniek van meerdere DNA regio's van de *E. coli* bacterie een stukje vermenigvuldigt en vervolgens op grootte gescheiden en zichtbaar gemaakt. Er is veel variatie in de lengte van deze regio's tussen de verschillende *E. coli* stammen en isolaten. Hierdoor zijn isolaten te identificeren aan de hand van de lengte van deze stukjes DNA en heeft elk bacterie-isolaat zijn eigen 'vingerafdruk' waardoor het te onderscheiden is van andere bacterie-isolaten (Figuur 8). Met deze techniek wordt dus onderscheid gemaakt op het niveau van *subspecies* en het specifieke isolaat.



FIGUUR 8. GENETISCHE ANALYSE VAN GENATURALISEERDE *E. COLI* ISOLATEN GEÏSOLEERD UIT VERSCHILLENDE BODEMLOCATIES (A), VERGELEKEN MET *E. COLI* ISOLATEN GEÏSOLEERD UIT FECALIËN VAN GANZEN, HERTEN EN ZEEZWALUWEN & MEEUWEN (B) EN VERGELEKEN MET *E. COLI* ISOLATEN UIT HET WATER VAN DEZELFDE LOCATIE (C). *E. COLI* BACTERIËN VAN VERSCHILLENDE HERKOMST ZIJN DUIDELIJK VAN ELKAAR TE ONDERSCHIEDEN. UIT: ISHII *ET AL.*, 2006.

De 'vingerafdruk' van elke bacterie wordt vervolgens vergeleken met een referentiedatabase. In deze database zijn een groot aantal 'vingerafdrukken' van *E. coli* bacteriën van verschillende herkomsten verzameld, bijvoorbeeld van *E. coli* afkomstig van mensen, ganzen en honden, maar ook *E. coli* die geïsoleerd zijn uit de bodem of water van verschillende locaties. Als deze database beschikbaar is, kan van *E. coli* bacteriën in bijvoorbeeld het onttrokken duininfilttraat mogelijk worden bepaald of het om een genaturaliseerde of fecale *E. coli* gaat. Deze database moet voor elke omgeving grotendeels opnieuw worden gemaakt. Dit is een nadeel van de rep-PCR methode, aangezien een grote database noodzakelijk is om gefundeerde uitspraken te kunnen doen over de herkomst en bron van de geteste bacterie.

2.6 Groei van enterococchen in zand

De literatuur naar de mogelijke handhaving en groei van enterococchen in zand is minder uitgebreid dan die voor *E. coli*. Wat hieruit naar voren komt is dat enterococchen minder goed lijken te kunnen groeien in zand of aarde vergeleken met *E. coli*. Enterococchen kunnen wel genaturaliseerd worden en zich handhaven in verschillende grondsoorten als sediment, zand en aarde (reviewed in Staley *et al.*, 2014). Ze lijken echter niet of nauwelijks te kunnen groeien. Groei van enterococchen is alleen aangetoond in een laboratoriumomgeving in strandzand bij verschillende temperaturen. Tot dusver lijkt er dus niet in grote mate enterococchen groei plaats te kunnen vinden in sediment, aarde of grond bij zoetwater stranden of rivierbeddingen. Incidentele groei, bij aanwezigheid van hoge concentraties nutriënten en weinig concurrentie, zou wel plaats kunnen vinden (Taucer-Kapteijn, *et al.* 2016 en reviewed in Staley *et al.*, 2014).

2.7 Conclusies

In verschillende klimaten (gematigd tot tropisch), bodem- of grondsoorten (o.a. rivierbedding, strandzand en modder) en in laboratoriumexperimenten is aangetoond dat *E. coli* bacteriën kunnen groeien in het milieu. De sterkste groei treedt op bij gebruik van gesteriliseerde grondsoorten, hogere temperaturen (kamertemperatuur tot 37°C), hoge vocht- en organische

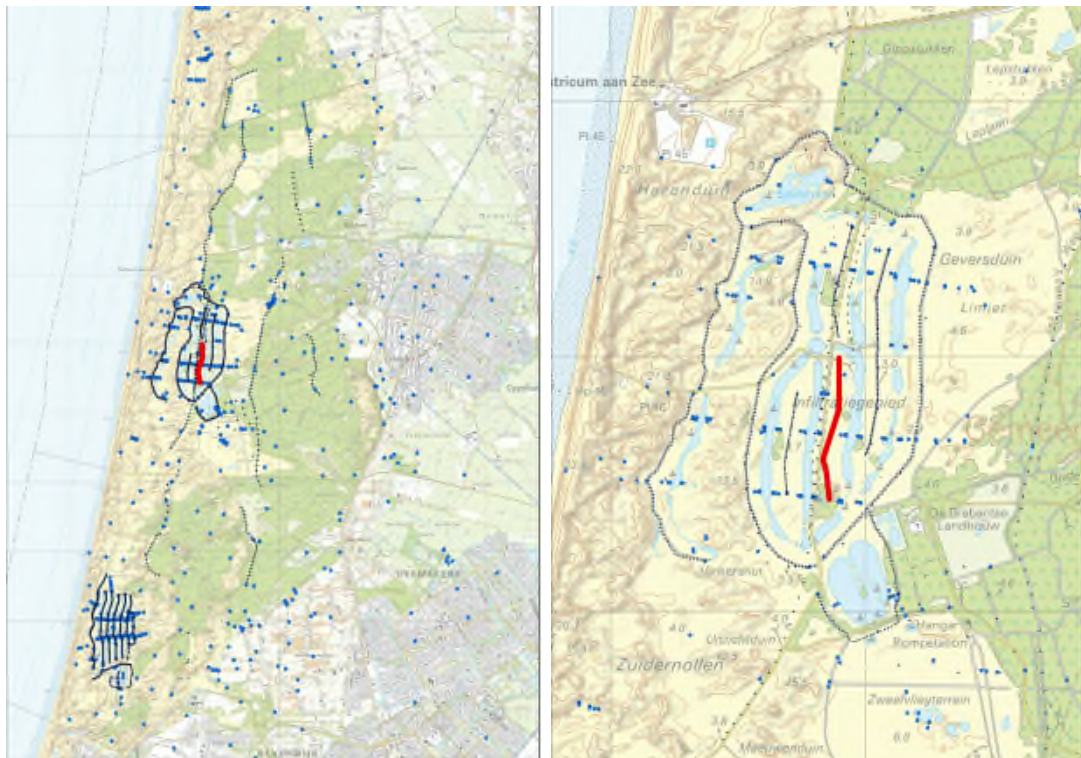
materiaalpercentages. Bij niet-gesteriliseerde grond is de groei beperkt vergeleken met de gesteriliseerde condities. De meeste experimenten zijn echter gedaan in omstandigheden die afwijken van de Nederlandse duinsituatie. Het vochtpercentage en gehalte organisch materiaal is vaak hoger en in de meeste experimenten gaat het om grond uit rivierbeddingen.

Wat wel duidelijk naar voren komt uit de verschillende onderzoeken in een gematigd klimaat en met name de genetische analyses, is dat *E. coli* genaturaliseerd kunnen worden en zich kunnen handhaven en afhankelijk van de omstandigheden kunnen groeien. Op deze manier worden lokale *E. coli* populaties gevormd die genetisch verschillen van omliggende populaties en andere bekende (fecale) bronnen. Dit proces komt voor in meerdere grondsoorten. Tevens is op meerdere locaties gevonden dat de populatie in stand blijft gedurende de winterperiode, ondanks dat ze dan vaak niet detecteerbaar zijn met kweekmethoden. Vervolgens groeit de populatie in de lente en zomer.

3 Materiaal en methoden van het experimentele onderzoek

3.1 Bemonstering ganzenkeutels en duinzand

Op 30 juni 2016 is in het Infiltratiegebied Castricum (ICAS) van PWN, bij strang Q400, in samenwerking met Bernadette Lohmann (PWN) duinzand bemonsterd. Rondom de putten zijn hekken geplaatst, waardoor de ganzen niet te dicht bij de putten kunnen komen. Op het moment van monsternamen was deze winstrang (gedeeltelijk) uit productie en waren er enkele tientallen ganzen aanwezig in het gebied (Figuur 9).





FIGUUR 9. ICAS GEBIED IN CASTRICUM WAAR DUINZAND EN GANZENKEUTELS ZIJN BEMONSTERD. IN DE KAARTEN IS MET ROOD AANGEGEVEN BIJ WELKE STRANG DE BEMONSTERING HEEFT PLAATSGEVONDEN.

Het zand is door middel van 7 grondboringen verzameld. Hierbij is met een schep, waarvan het blad is gesteriliseerd met een gasbrander, de bovenste vegetatielaag verwijderd waarin onder andere de plantenwortels aanwezig zijn. Het onderliggende duinzand is op een diepte van ongeveer 20 tot 50 cm verzameld (Figuur 10). Bij de bemonstering is er op gelet dat er op die plek geen grote aantallen ganzenkeutels lagen. Het zand van de grondboringen is gemengd tot één homogeen zandmonster en tot de start van de groeiproeven afgesloten opgeslagen in het donker, bij 4°C.





FIGUUR 10. BEMONSTERING DUINZAND DOOR MIDDEL VAN 7 GRONDBORINGEN.

Op dezelfde locatie zijn ongeveer 70 verse ganzenkeutels (310 gram) verzameld. Dit is gedaan op verschillende locaties om er voor te zorgen dat de ganzenkeutels van verschillende ganzen afkomstig zijn.

Van de ganzenkeutels is een extract in steriel leidingwater gemaakt. Hiervoor zijn de ganzenkeutels gemengd met 500 ml water en een aantal maal handmatig geschud. Vervolgens heeft het mengsel twee uur bij kamertemperatuur gestaan om de ganzenkeutels te laten suspenderen in het water. Dit mengsel is over een serie van filters geleid (0,3 mm, 0,106 mm en 0,053 mm poriegrootte) om de onoplosbare delen, zoals halfverteerd gras, te verwijderen. Het bovenste filter is nagespoeld met steriel leidingwater. De vaste delen in het eluaat zijn verwijderd door centrifugatie (4000x g, 15 minuten) en vervolgens is het eluaat ingevroren bij -20°C tot gebruik. Na één vries-dooicyclus is het *E. coli* en enterococcengehalte in het eluaat bepaald. Door het gebruik van een niet-steriel ganzenkeutelextract, benadert dit de situatie waarbij stoffen uit de keutels (organische stof, bacteriën, etc) bij bijvoorbeeld een regenbui in het zand terecht komen en zo potentieel tot microbiologische groei zouden kunnen leiden.

3.2 Entzand

Van de firma Sibelco/Filcom is entzand (rivierzand uit Papendrecht) gebruikt. Van dit zand zijn twee fracties (korrelgrootte van 0,2-0,5 mm en 0,4-0,63 mm) in gelijke delen met elkaar gemengd. Verder is het zand gebruikt zoals het aangeleverd. Bij de fabrikant ondergaat het zand een droogstap, maar het zand is niet gesteriliseerd. Dit zand is tot gebruik op kamertemperatuur in het donker opgeslagen.

3.3 Microbiologische karakterisatie duinzand

Van het duinzand is meteen na bemonstering het totale aantal cellen, het *E. coli* en het enterococcen-gehalte bepaald. Hiervoor is 20 gram zand geschud in 125 ml steriel leidingwater. Het aantal *E. coli* en enterococcen bacteriën in het eluaat is bepaald volgens huisvoorschriften LMB-042 en LMB-044 (conform NEN-EN-ISO 9308-1 en NEN-EN-ISO 7899-2). Voor de *E. coli* bepaling is het eluaat op LSA-agar gekweekt bij 44°C gedurende 24 uur. Voor de enterococcen bepaling is de bepaling uitgevoerd op S&B-agar bij 36°C gedurende 48 uur.

Voor flow cytometry is het totaal aantal aanwezige cellen (dood en levend) bepaald. Hiervoor zijn de levende en dode cellen in het eluaat gelabeld met een fluorescente marker, en zijn de fluorescente cellen geteld in de flow cytometer volgens huisvoorschrift LMB-071.

Het eluaat is ook geanalyseerd op PCA en LLA-medium bij respectievelijk 22°C en 37°C, om het koloniegetal te bepalen. Deze analyses zijn uitgevoerd volgens huisprotocol LMB-032 (conform NEN-EN-ISO 6222).

3.4 Next generation sequencing

Van drie monsters is de microbiële samenstelling van het zand en het ganzenkeutelextract bepaald. Hiervoor is het 16S rRNA gesequenced en geanalyseerd door middel van Next Generation Sequencing (NGS) op de MiSeq van Illumina. De sequenties zijn vergeleken met database waarin van een groot aantal bacteriën de sequentie is opgenomen. Deze methode geeft de verhoudingen tussen de verschillende bacteriefamilies weer, maar niet het exacte aantal aanwezige bacteriën.

3.5 Chemische karakterisatie duinzand

Van het duinzand zijn de volgende chemische parameters bepaald:

- Droge stof gehalte (verhitting tot 105°C): volgens LAM-066
- Organisch stof gehalte (verhitting tot 550°C): volgens LAM-066
- TOC, na salpeterzuurdestructie: volgens LAM-068, NEN-EN 1484 en ISO 8245
- IJzer en mangaan, na salpeterzuurdestructie: volgens LAM-059 en LAM-74
- Korrelgrootteverdeling: uitgevoerd door het Laboratorium voor Multi-element Analyses
- Gehalte koolstof C, stikstof N, fosfaat P en zwavel S: uitgevoerd door het Laboratorium voor Multi-element Analyses
- Oxideerbare metalen (XRF): uitgevoerd door het Laboratorium voor Multi-element Analyses

3.6 Groeiproeven

Voor het uitvoeren van de groeiproeven is gekozen voor de laboratoriumstam *E. coli* WR1. Idealiter worden deze experimenten uitgevoerd met een natuurlijk *E. coli* isolaat dat uit duinzand is geïsoleerd. Omdat voor de experimenten een groot aantal bacteriën nodig is, is dit op het moment niet technisch niet haalbaar en is gekozen voor *E. coli* WR1.

In de groeiproeven zijn *E. coli* bacteriën van de stam WR1 (3×10^4 kve) aan het zand gedoseerd. Deze bacteriën zijn gegroeid in mineraal medium met daaraan toegevoegd 0,1 mg glucose-C/l, bij 25°C. Nadat het groeimaximum was bereikt, zijn de bacteriën driemaal gewassen in steriel leidingwater om alle groeistoffen te verwijderen en geconcentreerd door middel van centrifugatie (4000x g).

De groeiproeven zijn uitgevoerd in 500 gram entzand en duinzand. De doseringen (*E. coli*, vocht en organisch materiaal) zijn homogeen gemengd met het zand. Hiervoor is per conditie 20x 25 gram zand gemengd met 0,1 ml (0,4%) of 1,25 ml (5%) vocht. Afhankelijk van het experiment is er wel of geen organisch materiaal in de vorm van ganzenkeutelextract gedoseerd, dit dient tevens als dosering van vocht. Per 500 gram zand is er eluaat gedoseerd dat gelijk staat aan twee ganzenkeutels. Deze 20 porties van 25 gram zijn eerst een aantal maal handmatig geschud en vervolgens gedurende 30 minuten met 300 rpm op een horizontaal schudplateau verder gemengd. Vervolgens zijn in een grote fles deze 20 porties zand van 25 gram handmatig geschud gedurende 2 minuten om tot een homogeen mengsel te komen. Deze zandmengsels zijn geïncubeerd op 5°C en 15°C.

Het *E. coli* gehalte van het zand is bepaald op verschillende tijdstippen na besmetting: meteen na menging en na 0, 1, 5, 15 en 30 dagen. De *E. coli* concentratie in het zand is in de pilot in drievoud bepaald. Hiervoor zijn per conditie drie zandmonsters van 20 gram 2 minuten handmatig geschud met 125 ml steriel drinkwater. Na bezinking van het zand gedurende 2 minuten, is in het bovenstaande water het *E. coli* gehalte en het koloniegetal op LLA- en/of LSA-agar bepaald. Voor het grote experiment is één zandmonster geschud en in duplo op kweek gezet.

De recovery van deze bepalingsmethode wordt per conditie bepaald op tijdstip 0. Op dit tijdstip is bekend wat er gedoseerd is. Dit kan vergeleken worden met wat er in de bepaling wordt teruggevonden, waaruit de recovery kan worden bepaald. De resultaten van de groeiproeven zijn hiervoor gecorrigeerd. Hierbij is aangenomen dat de recovery per conditie gedurende het experiment van 30 dagen gelijk blijft.

3.7 Microbiologische analyse methoden

Het *E. coli* en enterococcon aantal is bepaald op LLA en LSA-agar bij, respectievelijk, 44°C en 37°C, zoals hierboven beschreven.

Door de aanwezigheid van de autochtone microbiële populatie in het duinzand en het ganzenkeutelextract, is het *E. coli* aantal tijdens de groeiproeven bepaald op het selectieve agarmedium LSA bij 44°C. Bij de pilot groeiproef is ook het totale kolonienummer op LLA-agar bij 37°C bepaald.

4 Resultaten groeiproeven

4.1 Analyse van ganzenkeutels en duinzand

Voorafgaand aan de groeiproeven in zand is het ganzenkeutelextract en het duinzand uit het ICAS infiltratiegebied gekarakteriseerd. De microbiologische analyses zijn uitgevoerd om een mogelijk achtergrondsignaal, veroorzaakt door de autochtone flora, te kunnen bepalen. Hierdoor is van tevoren bekend of er naast de gedoseerde *E. coli* bacteriën ook natuurlijke *E. coli* bacteriën aanwezig zijn bij de start van de groeiproef. Het entzand is niet geanalyseerd, aangezien dit vrij van *E. coli* wordt geleverd en daarna op een hygiënische manier is verwerkt. Tevens is uit een eerdere analyse van entzand gebleken dat entzand geen *E. coli* bacteriën bevat (KWR 2015.107).

In het ganzenkeutelextract zijn hoge concentraties enterococcen en *E. coli* bacteriën aanwezig (Tabel 2).

TABEL 2. MICROBIOLOGISCHE ANALYSES OP GANZENKEUTELEXTRACT DOOR MIDDEL VAN Kweek. DE GANZENKEUTELS ZIJN VERZAMELD IN HET ICAS INFILTRATIEGEBIED. HET EXTRACT IS GEBRUIKT VOOR DE GROEIPROEVEN. DOOR TOEDIENING VAN HET EXTRACT, WORDEN OOK *E. COLI* EN ENTEROCOCCEN TOEGEVOEGD. DEZE AANTALLEN ZIJN WEERGEGEVEN IN DE TABEL.

	kve/ml extract	kve per groeiproef
Enterococcen	1,20E+03	9,12E+01
<i>E. coli</i>	3,60E+05	2,74E+04

In tegenstelling tot het ganzenkeutelextract zijn er in het duinzand nauwelijks fecale bacteriën aanwezig. *E. coli* bacteriën zijn afwezig (*E. coli*, 44°C in Tabel 3) en het gehalte coliformen en enterococcen is laag. Het totaal aantal heterotrofe, kweekbare bacteriën ligt tussen de $7,20 \times 10^5$ en $2,87 \times 10^6$ kve/gram zand. Van het totale aantal aanwezige bacteriën ($3,3 \times 10^8$ kve/gram zand), zoals bepaald met flow cytometry, is meer dan de helft (58,5%) levend. De bacterieconcentratie met kweek ligt ongeveer 2 log lager vergeleken met de resultaten van flow cytometry. Het is bekend dat dit verschil groot kan zijn, aangezien niet alle bacteriën kweekbaar zijn waardoor een groot deel van de populatie gemist kan worden.

TABEL 3. MICROBIOLOGISCHE ANALYSES OP DUINZAND, VERZAMELD IN HET ICAS INFILTRATIEGEBIED. DIT ZAND IS GEBRUIKT VOOR DE GROEIPROEVEN.

Kweekbepaling	kve/ml nat zand	kve/gram zand
enterococcen	0,2	1,2
Coliformen	0,1	0,62
<i>E. coli</i> , 44°C	<0,1	<0,62
LLA, 37°C	1,12E+05	7,2E+05
PCA, 22°C	4,6E+05	2,9E+06
Flow cytometrie	Cellen/ml nat zand	Cellen/gram zand
Levend	3,1E+07	1,9E+08
Dood	2,3E+07	1,4E+08
Totaal	5,3E+07	3,3E+08

Bij de start van de groeiproeven zijn het duinzand en entzand vrij van *E. coli* bacteriën. Wel is er in het duinzand een grote autochtone flora aanwezig, wat mogelijk invloed heeft op de groei van *E. coli*. In de experimenten waarin organisch materiaal in de vorm van ganzenkeutelextract wordt toegediend, wordt tegelijkertijd een extra autochtone flora toegevoegd, met daarin *E. coli* en enterococcen. Vergeleken met het aantal gekweekte *E. coli* bacteriën dat wordt toegevoegd, is dit slechts een klein deel (ongeveer 1%).

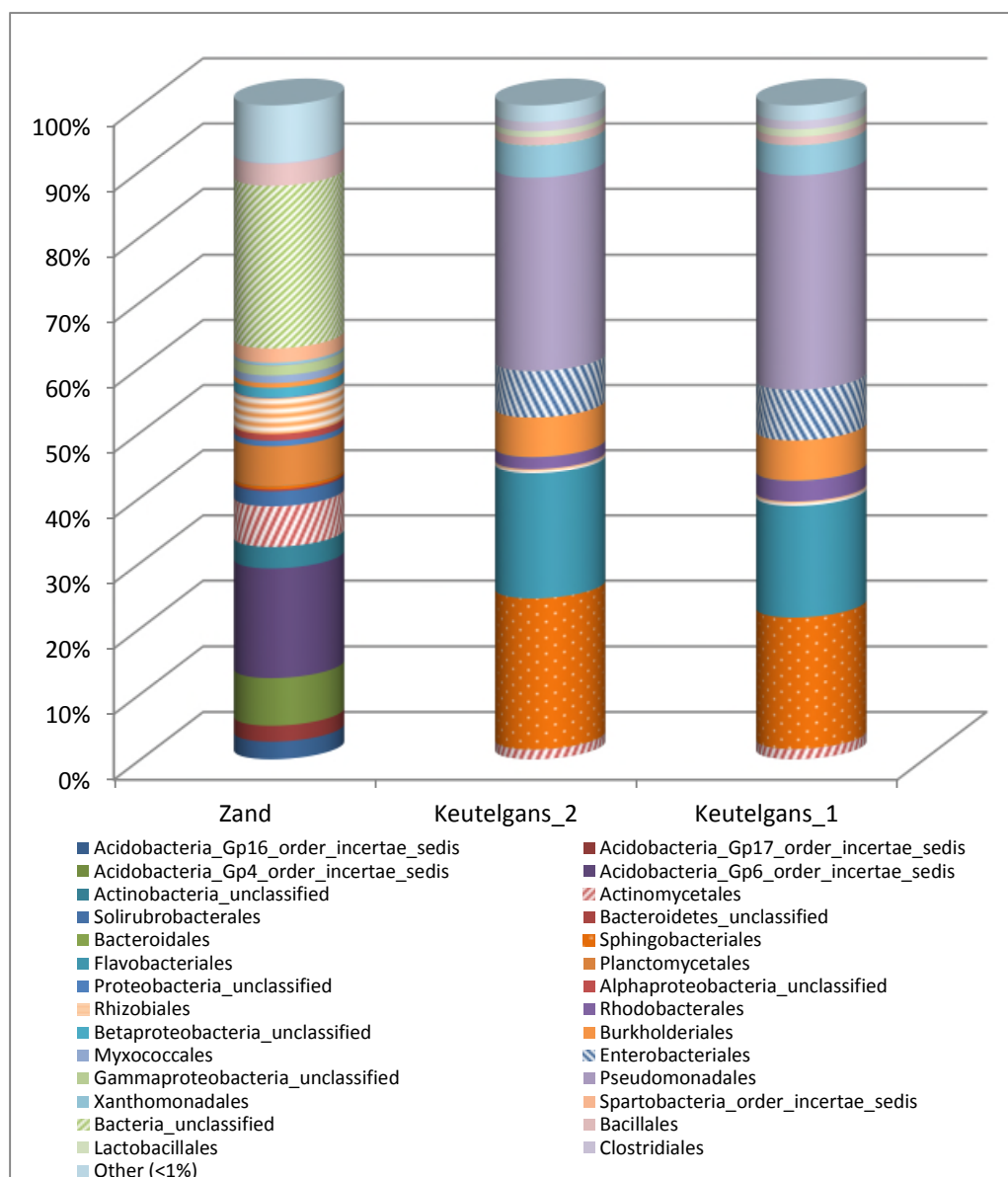
Om de variatie in de autochtone microbiële flora in het duinzand en het ganzenkeutelextract te bepalen, is een NGS-analyse uitgevoerd op het 16S rRNA van de aanwezige bacteriën (Figuur 11, Bijlage VI, Bijlage VI). Deze genetische analyse laat grote verschillen zien tussen de flora van het duinzand en de ganzenkeutels, wat twee verschillende niches zijn. De meest voorkomende bacteriesoorten in de ganzenkeutels komen slechts in beperkte mate voor in het duinzand en andersom.

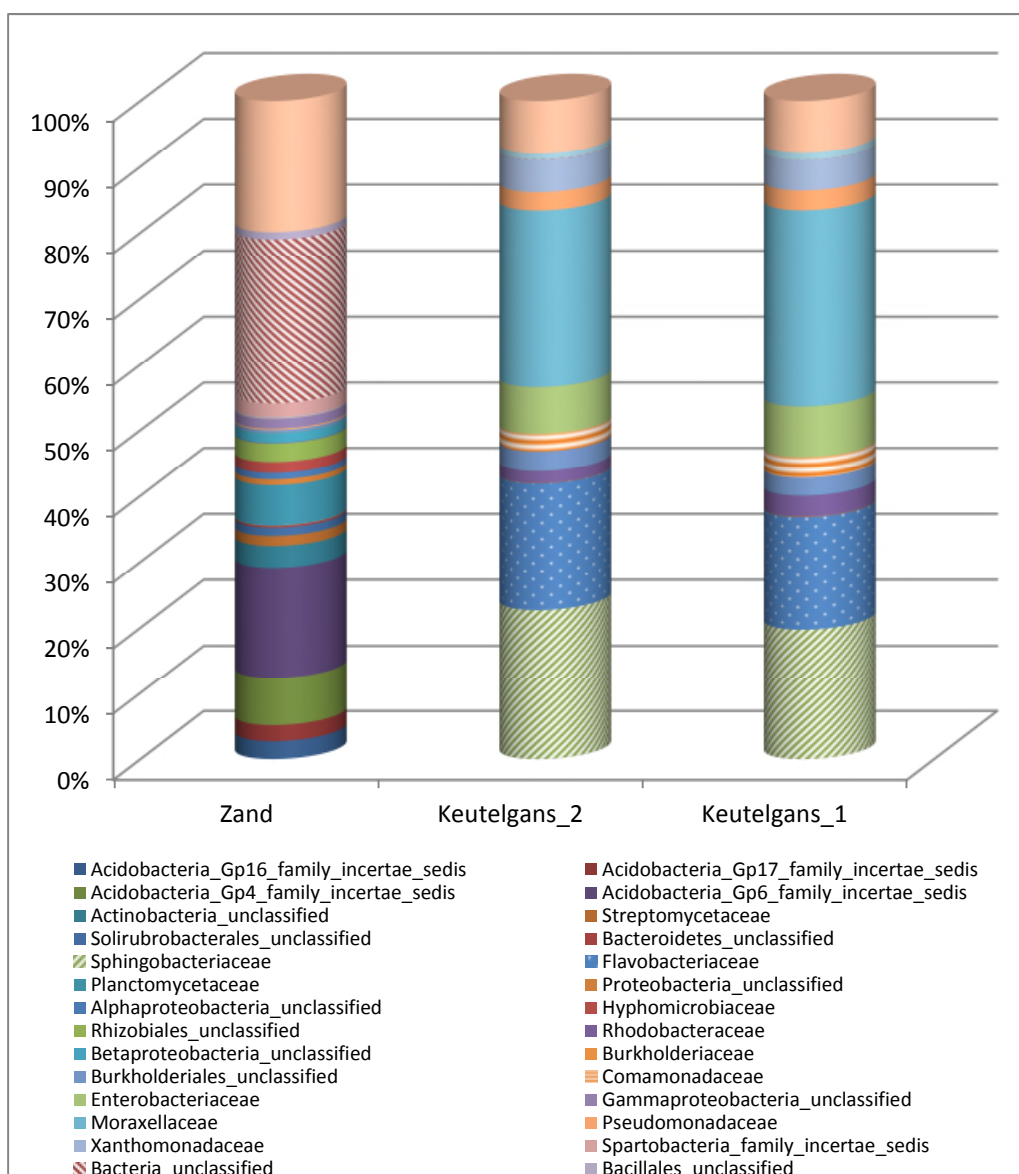
In ganzenkeutels is een groot deel van de bacteriën afkomstig van de families *Moraxellaceae* (Gammaproteobacteriën), *Flavobacteriaceae* en *Sphingobacteriaceae* (beiden natuurlijke of milieu bacteriën). In het zand, en heel beperkt in de ganzenkeutel, komen ook bacteriën van de *Rhizobiales* voor. Deze bacteriën zijn plantbacteriën en leven op plantenwortels. De autochtone flora in het zand is diverser dan in de ganzenkeutel. De grootste groep bacteriën kan niet geclassificeerd worden (24,9%), de grootste familie geclassificeerde bacteriën zijn de *Acidobacteria* (16,7%).

In de ganzenkeutels komen twee groepen fecale bacteriën voor: de *Bacteroidales* en de *Enterobacteriales*. Het percentage *Bacteroidales* is zeer laag (0,02%). Ongeveer 7% van de sequenties die gevonden zijn in de ganzenkeutels horen tot de order *Enterobacteriales*, waarvan de *enterobacteriaceae* de enige familie is. Tot deze familie horen een aantal fecale bacteriën, waaronder *E. coli*. In het zand zijn deze bacteriën in zeer lage percentages aangetroffen. Dit komt overeen met de kweekresultaten welke laten zien dat er nauwelijks enterococcen, coliformen en *E. coli* bacteriën aanwezig zijn in het zand, maar dat de ganzenkeutels wel grote aantallen enterococcen en *E. coli* bevatten.

Groei van *E. coli* bacteriën gedoseerd aan duinzand, vindt dus plaats in een omgeving met een zeer diverse natuurlijke populatie. Door de dosering van ganzenkeutels aan het zand worden twee geheel verschillende bacteriepopulaties gecombineerd wat de diversiteit van de

microbiële flora verder verhoogt. Beiden autochtone flora's concurreren met de gedoseerde *E. coli* om voedingsstoffen, zodat groei van *E. coli* mogelijk geremd wordt door de aanwezigheid van de autochtone flora.





FIGUUR 11. AUTOCHTONE MICROBIËLE FLORA VAN HET DUINZAND EN HET GANZENKEUTELEXTRACT, ZOALS BEPAALD MET NGS VAN HET 16S RRNA. IN HET EERSTE FIGUUR ZIJN DE BACTERIËN INGEDEELD OP DE 'ORDER' WAARIN ZIJ ZITTEN, IN HET ONDERSTE FIGUUR ZIJN ZIJ INGEDEELD OP DE 'FAMILIE'.

Het duinzand bestaat voor 7,3% uit vocht (droogrest, Tabel 4) en voor 1,2% uit koolstof dat van het zand kan verdampen (droogrest - gloeirest, Tabel 4). Entzand bestaat voor 0,1% uit vocht

TABEL 4. DROOGREST EN GLOEIREST BEPALING VAN DUINZAND NA VERHITTING BIJ 105°C EN 550°C.

	Duinzand	Entzand
105°C (droogrest)	92,7%	99,9%
550°C (gloeirest)	91,5%	Niet bepaald

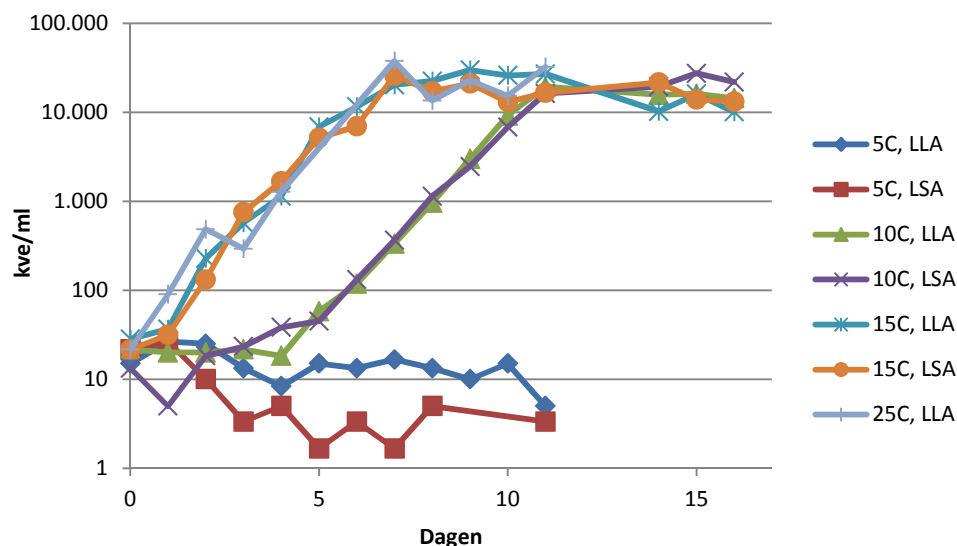
Op het duinzand zijn meerdere chemische analyses uitgevoerd (Tabel 5 en Bijlage III). Voor entzand is alleen het TOC (Totaal Organisch Koolstof) gehalte bepaald: wat met 68 mg C/kg droge stof 19x lager ligt dan in het duinzand. Dit betekent dat het minder organisch materiaal en dus voedingsstoffen bevat voor *E. coli* bacteriën.

TABEL 5. CHEMISCHE ANALYSES UITGEVOERD OP HET DUINZAND

Chemische analyse	Concentratie in droge stof	
	mg/kg droge stof	%
Ijzer	2900	0,29%
Mangaan	43	0,004%
TOC (in mg C)	1300 mg C	0,13%
Fosfaat (P)	92	0,01%
Koolstof (C)	6285	0,66%
Stikstof (N)	445	0,04%
Zwavel (S)	83	0,01%

4.2 Groei van *E. coli* in mineraalmedium

De minimale groeitemperatuur van *E. coli* bacteriën is bepaald door een reïncultuur van *E. coli* WR1 te enten in mineraal medium, waaraan 0,1 mg glucose-C/l als koolstofbron is gedoseerd en in afwezigheid van andere bacteriën (Figuur 12, Bijlage I). Bij 5°C vindt er geen groei plaats, ook niet bij langere incubatietijden, maar treedt er ook nauwelijks afsterving op. Vanaf 10°C vindt er groei van *E. coli* plaats, waarbij de groeisnelheid bijna even hoog is als bij 15°C en 25°C (Tabel 6). De lagfase, de tijd tussen de start van de groeiproef en het moment waarop *E. coli* daadwerkelijk gaat groeien, is wel langer bij lagere temperaturen (Tabel 6). Dit duidt erop dat de bacteriën zich mogelijk eerst aan moeten passen om goed te kunnen groeien bij de lagere temperaturen.



FIGUUR 12. GROEI VAN *E. COLI* WR1 IN MINERAAL MEDIUM BIJ 5°C, 10°C, 15°C EN 25°C. DE GROEISNELHEID IS BEPAALD OP ALGEMEEN LLA- EN *E. COLI*-SPECIFIEK LSA-AGARMEDIUM.

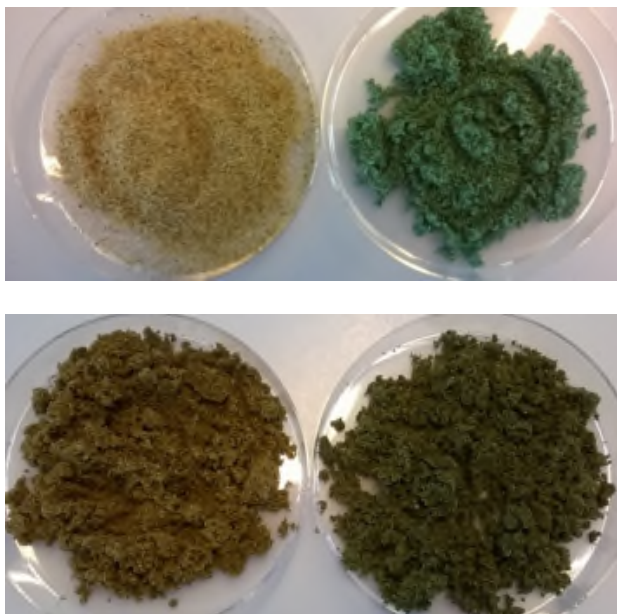
TABEL 6. GROEISNELHEID EN LAGFASE VAN *E. COLI*/WR1 IN MINERAAL MEDIUM BIJ 5°C, 10°C, 15°C EN 25°C.

	Agarmedium	Groeisnelheid (V in h ⁻¹)	Lagfase (dagen)
5°C	LLA	0,00	-
	LSA	0,00	-
10°C	LLA	0,06	4
	LSA	0,06	4
15°C	LLA	0,07	1
	LSA	0,08	1
25°C	LLA	0,06	0

4.3 *E. coli* groeiproeven in zand

4.3.1 Homogene menging van zand met vocht

Voor de groeiexperimenten in zand is het belangrijk dat het vocht, de *E. coli* bacteriën en het organisch materiaal homogeen gemengd worden met het zand. Daarom is voorafgaand aan de groeiexperimenten getest of het protocol een homogeen zandmengsel geeft. Hiervoor zijn het duinzand en entzand gemengd met water waarin 1 g/l briljant blue kleurstof is opgelost (Figuur 13). Visuele inspectie van de zandmengsels toont een homogeen zandmengsel, zonder blauwe klontjes. Dit komt overeen met eerder onderzoek waarin op deze manier een homogeen mengsel van zand met *E. coli* bacteriën wordt gevormd (KWR 2015.107).



FIGUUR 13. HOMOGENE MENGING VAN ENTZAND (BOVEN) EN DUINZAND (ONDER) MET BLAUWE KLEURSTOF IN WATER. AAN HET ZAND IS 0,1 ML VOCHT (VOCHTGEHALTE: 0,4%, LINKER SCHAALTJE) EN 1,25 ML VOCHT (VOCHTGEHALTE: 5%, RECHTER SCHAALTJE) TOEGEDIEND.

Tijdens het pilot groeiexperiment is de *E. coli* concentratie in het zand in drievoud bepaald. Deze waarden liggen dicht bij elkaar, wat erop wijst dat het zandmengsel in dit onderzoek inderdaad homogeen gemengd is (Bijlage II).

4.3.2 Pilot-experiment

Voordat er een uitgebreid groeiexperiment is ingezet, is een pilot experiment uitgevoerd bij 15°C waarin een aantal condities zijn getest:

1. Entzand, WR1, 0,4% vocht, 0% OM, 15°C
2. Entzand, WR1, 5% vocht, 5% OM, 15°C
3. Duinzand, WR1, 5% vocht, 5% OM, 15°C
4. Duinzand, 5% vocht, 5% OM, 15°C

Het organisch materiaal (OM) is toegevoegd in de vorm van ganzenkeutelextract, het vocht bestaat uit steriel leidingwater indien er geen OM wordt gedoseerd. Als er wel OM wordt gedoseerd, wordt er niet apart steriel leidingwater gedoseerd, maar is dit het vocht van het extract.

Deze condities zijn gekozen om de proefopzet te controleren, waarbij de volgende factoren van belang zijn:

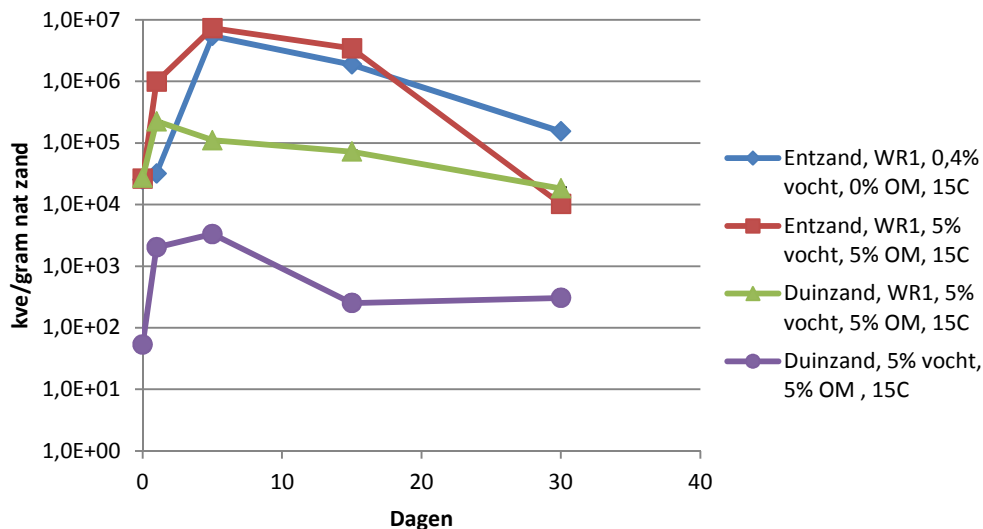
1. Reproducieren van eerdere resultaten (KWR 2015.107).
2. Heeft het toedienen van organisch materiaal (ganzenkeutelextract) een negatief of positief effect op de groei van *E. coli*?
3. Is groei van *E. coli* in duinzand mogelijk in de meest optimale condities (in aanwezigheid van organisch materiaal en aanhangend vocht)?
4. Zijn de van nature voorkomende *E. coli* bacteriën in het organisch materiaal (ganzenkeutelextract) in staat om te groeien in duinzand?

In alle condities is de groei van *E. coli* bacteriën en het koloniegetal bij 37°C bepaald. De rationale hierachter is dat de autochtone flora in het zand mogelijk de gedoseerde *E. coli* WR1 bacteriën overgroeit waardoor eventuele afwezigheid van *E. coli* groei meerdere oorzaken kan hebben, i) er vindt geen groei plaats, ii) *E. coli* wordt uitgedomineerd door de autochtone flora.

Uit Figuur 14 blijkt dat *E. coli* in alle condities kan groeien. In entzand treedt sterke groei op, waarbij een groeimaximum van $5,4 \cdot 10^6$ (zonder organisch materiaal) en $7,3 \cdot 10^6$ (met organisch materiaal) kve/gram nat zand wordt behaald na 5 dagen. Dit komt overeen met eerdere resultaten waarin een maximale opbrengst van $4,6 \cdot 10^6$ werd behaald (KWR 2015.107). In aanwezigheid van organisch materiaal is de groeisnelheid van *E. coli* hoger vergeleken met wanneer er geen organisch materiaal is toegevoegd. De afstervingsnelheid is gelijk tussen de 5 en 15 dagen. Bij het laatste meetmoment, na 30 dagen, is de afsterving van *E. coli* sneller in aanwezigheid van organisch materiaal. In deze groeiexperimenten is niet elke dag gemeten, waardoor waarschijnlijk niet de echte piekwaarden zijn gemeten die ook tussen dag 5 en 15 kunnen liggen. Dit heeft mogelijk een (beperkte) invloed op de bepaalde groeimaxima en de berekende groei- en afstervingsnelheid.

Tevens is in deze groeiexperimenten niet elke dag gemeten, waardoor waarschijnlijk niet de echte piekwaarden zijn gemeten die ook tussen dag 5 en 15 kunnen liggen. Dit geldt met name voor de groeiexperimenten in entzand.

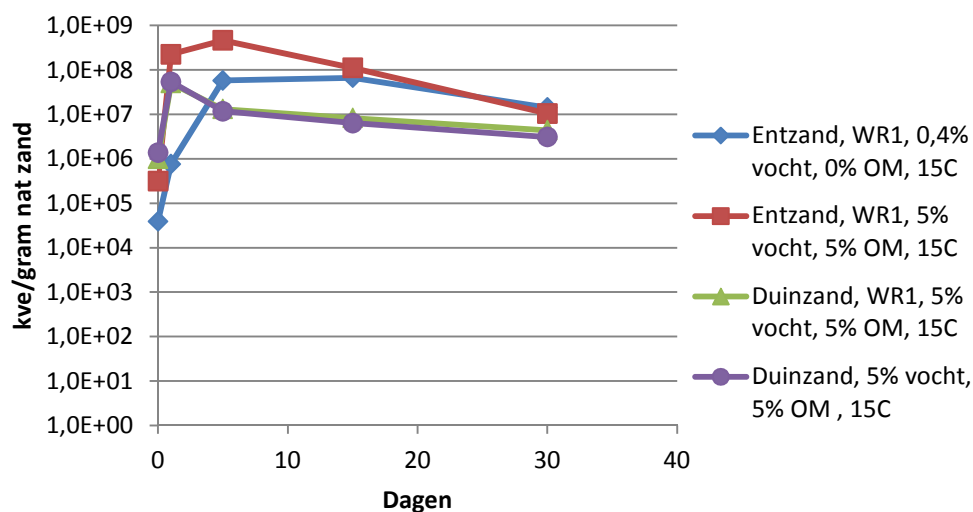
Gedoseerde *E. coli* bacteriën groeien ook in duinzand, maar hierbij wordt een lager groeimaximum bereikt ($2,2 \cdot 10^5$ kve/gram nat zand). In het duinzand waaraan geen *E. coli* WR1 is gedoseerd, is ook groei van *E. coli* bacteriën zichtbaar ($1,8 \log$ stijging tot $3,3 \cdot 10^3$ kve/gram nat zand). Dit zijn de natuurlijke *E. coli* bacteriën die aanwezig zijn in het ganzenkeutelextract dat als organisch materiaal is gedoseerd. Afsterving van *E. coli* in het duinzand is langzamer dan in entzand, ondanks de aanwezigheid van een autochtone flora.



FIGUUR 14. GROEI VAN *E. COLI* IN DUINZAND EN ENTZAND GEDURENDE 30 DAGEN BIJ 15°C. DE *E. COLI* CONCENTRATIE IS BEPAALD OP SPECIFIEK AGARMEDIUM (LSA) BIJ 44°C. GEGEVEN IS HET GEMIDDELDE MET STANDAARDDEVIATIE (DEZE IS ZEER KLEIN EN NIET OF NAUWELIJKS ZICHTBAAR). DE MEETRESULTATEN ZIJN OOK GEGEVEN IN BIJLAGE II.

In entzand stijgt het totale aantal aanwezige, kweekbare bacteriën in de eerste 5 dagen, waarna afsterving optreedt (Figuur 15). In entzand zonder organisch materiaal is het groeimaximum lager dan wanneer wel organisch materiaal is gedoseerd. Dit kan veroorzaakt worden door het verschil in OM-gehalte, de startconcentratie bacteriën of doordat de autochtone flora in het gedoseerde ganzenkeutelextract harder groeit dan de flora in het entzand of de gedoseerde *E. coli*. De maximale opbrengst voor entzand + WR1 op LLA-agar is hoger dan op *E. coli* specifiek LSA-agar, wat suggereert dat er in het schone entzand na dosering van een gekweekte *E. coli* oplossing ook groei op kan treden van andere bacteriën.

In duinzand treedt de eerste dag groei op van het totale aantal kweekbare bacteriën, waarna de concentratie daalt. Er is geen verschil tussen wel of geen *E. coli* dosering. Mogelijk komt dit door de competitie met bacteriën in de autochtone flora van het duinzand en van het organisch materiaal. De autochtone flora van het duinzand lijkt te domineren. Afsterving van bacteriën is in duinzand lager dan in entzand.



FIGUUR 15. GROEI VAN HET TOTAAL AANTAL Kweekbare bacteriën in duinzand en entzand gedurende 30 dagen, bij 15°C. Het koloniegetal is bepaald op LLA agarmedium bij 37°C. GEGEVEN IS HET GEMIDDELDE MET STANDAARDDEVIATIE (ZEER KLEIN, NIET OF NAUWELIJKS ZICHTBAAR).

Tabel 7 laat zien dat *E. coli* bacteriën na 30 dagen nog maar een klein gedeelte uitmaken van de totale bacteriële populatie. En dat deze weggecompeteerd of overgroeid worden door de autochtone flora. Het grote verschil tussen kolom 1 en de andere kolommen op dag 0 wordt veroorzaakt doordat het totale aantal bacteriën in aanwezigheid van organisch materiaal en/of duinzand hoger ligt dan in entzand zonder organisch materiaal (kolom 1).

TABEL 7. PERCENTAGE *E. COLI* BACTERIËN VAN HET TOTAAL AANTAL AANWEZIGE, Kweekbare, BACTERIËN.

	Entzand, WR1, 0,4% vocht, 0% OM, 15°C	Entzand, WR1, 5% vocht, 5% OM, 15°C	Duinzand, WR1, 5% vocht, 5% OM, 15°C	Duinzand, 5% vocht, 5% OM, 15°C
Dag 0	65,3	8,4	2,8	0,004
Dag 1	4,2	0,4	0,4	0,004
Dag 5	9,4	1,6	0,8	0,028
Dag 15	2,8	3,1	0,9	0,004
Dag 30	1,1	0,1	0,4	0,010

In de vier geteste condities treedt in meer of mindere mate groei op van *E. coli* en de autochtone flora van het zand of het ganzenkeutelextract. Dit pilotexperiment laat tevens zien dat bij heel lage vochtpercentages er al groei optreedt van *E. coli* bacteriën en de autochtone flora. De behandeling van het zand en de doseringen leidt dus tot vermeerdering van het aantal bacteriën. Groei van *E. coli* lijkt niet onderdrukt te worden door groei van de autochtone flora, al groeit de autochtone flora over het algemeen wel harder dan de *E. coli* bacteriën. Dit vertaalt zich in een afname van het *E. coli* percentage gedurende de 30 dagen van het experiment ten opzicht van het totale aantal aanwezig, kweekbare bacteriën (Tabel 7). Verder zijn de groeipatronen van *E. coli* bacteriën en het totale aantal bacteriën

grotendeels vergelijkbaar. Hierdoor is besloten om in de volgende groeiproeven alleen het *E. coli* gehalte op *E. coli* specifiek medium (LSA) te bepalen en niet het totale aantal kweekbare bacteriën op LLA medium.

4.3.3 Conditie groeiexperiment in zand

Vanwege het grote aantal groeiexperimenten en de hanteerbaarheid hiervan, zijn niet alle condities bij 5°C en 15°C getest. Omdat in de meest optimale condities (Figuur 12, mineraal medium) is aangetoond dat *E. coli* WR1 niet kan groeien bij 5°C, zijn in het vervollexperiment alleen de condities met de meest optimale omstandigheden (5% vocht, 5% OM) bij 5°C in enkelvoud getest (Tabel 8). Alle groeiexperimenten bij 15°C zijn in tweevoud uitgevoerd.

Daarnaast is de groei of afsterving van *E. coli* in steriel water met daaraan toegevoegd steriel ganzenkeutelextract bepaald om te testen of *E. coli* afsterft in leidingwater (gesteriliseerd water), en of de ganzenkeutel zelf groeistoffen bevat voor *E. coli* (steriel water met steriel ganzenkeutelextract). Vanwege het hoge gehalte organisch materiaal is gekozen voor sterilisatie in plaats van pasteurisatie, omdat anders mogelijk niet alle micro-organismen worden afgedood.

Omdat het ganzenkeutelextract een hoge concentratie *E. coli* bevat worden er in de condities met ganzenkeutelextract ook natuurlijke *E. coli* gedoseerd (18 kve/gram zand, vergeleken met $6,2 \cdot 10^3$ kve/gram zand *E. coli* WR1). Om te bepalen of deze *E. coli* bacteriën in duinzand of entzand kunnen groeien, is in een aantal condities geen gekweekte *E. coli* WR1 toegevoegd, maar alleen natuurlijke *E. coli* in de vorm van ganzenkeutelextract.

Alle geteste condities zijn weergegeven in Tabel 8.

TABEL 8. UITGEVOERDE GROEIPROEVEN MET *E. COLI*, GANZENKEUTELEXTRACT (ORGANISCH MATERIAAL), DUINZAND EN ENTZAND.

Zandsoort	<i>E. coli</i>	Vochtgehalte	Ganzenkeutelextract	Temperatuur
Entzand	3,2E+06 kve WR1	0,4%	0%	15
				15
		5%	5%	5
				15
		5%	0%	15
				15
	Geen WR1	5%	5%	5
				15
		15	15	15
				15
		0%	0%	15
				15
Duinzand	3,2E+06 kve WR1	0,4%	0%	15
				15
		5%	5%	5
				15
		5%	0%	15
				15
	Geen WR1	5%	5%	5
				15
		15	15	15
				15
		0%	0%	15
				15
	<i>E. coli</i>	Steriel ganzenkeutelextract		Temperatuur
Steriel leidingwater	7 - 9E+06 kve WR1	0%		5
		5%		5
		0%		15
		5%		15

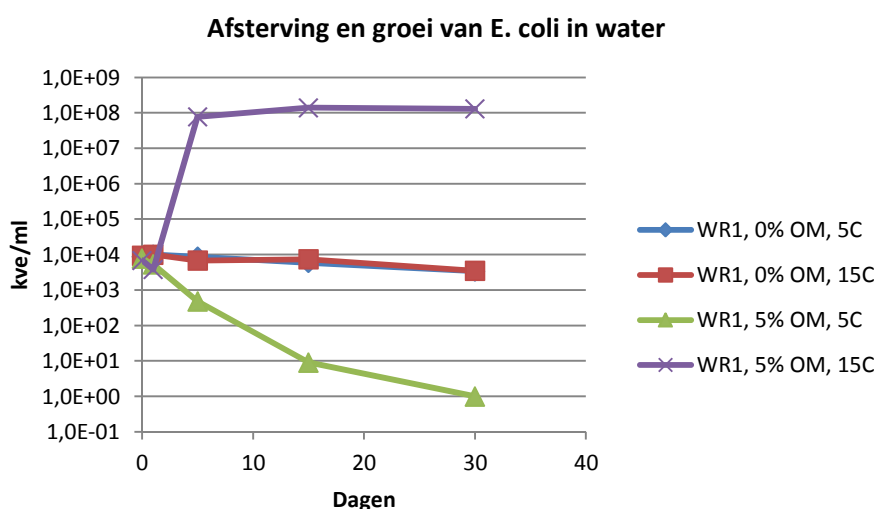
4.3.4 Groei van *E. coli* in steriel leidingwater met organisch materiaal

In Figuur 16 is de mate van groei en afsterving van *E. coli* in steriel water met steriel ganzenkeutelextract weergegeven. Dit is bepaald om na te gaan of de gekweekte *E. coli* WR1 bacteriën de voedingsstoffen uit het ganzenkeutelextract kunnen gebruiken, in afwezigheid van autochtone flora.

In afwezigheid van organisch materiaal vindt er geen groei plaats, maar sterft *E. coli* langzaam af bij zowel 5°C als 15°C. In aanwezigheid van steriel organisch materiaal vindt er bij 15°C sterke groei plaats tot een concentratie van ongeveer 10^8 kve/ml op dag 5, waarna

de concentratie stabiel blijft. Bij 5°C sterft *E. coli* snel af. Het snelle afsterven kan niet veroorzaakt worden door de autochtone flora, welke niet aanwezig is door de sterilisatiestap. Blijkbaar kan *E. coli* bij deze lage temperatuur niet groeien op het organisch materiaal in het water waardoor de afsterving duidelijk zichtbaar is. Bij 15°C vindt wel sterke groei plaats, wat de (eventueel aanwezige) afsterving van *E. coli* maskeert.

Aangezien het ganzenkeutelextract voor deze groeiproeven is gesteriliseerd, wordt de maximale concentratie (10^8 kve/ml) bereikt in afwezigheid van een competerende, autochtone flora. Het organisch materiaal en andere groeistoffen uit het extract ondersteunen dus een maximale groeipotentie van ongeveer 10^8 kve/ml. Dit komt overeen met de resultaten uit het pilotexperiment (Figuur 15), waarin een maximale concentratie kweekbare, heterotrofe bacteriën van ongeveer 10^8 kve/gram zand wordt bereikt na 5 dagen.



FIGUUR 16. GROEI- EN AFSTERVINGSCURVES VAN *E. COLI*/WR1 IN WATER MET DAARAAN GEDOSEERD 0% OF 5% GANZENKEUTELEXTRACT EN BIJ 5°C OF 15°C.

4.3.5 Groei van *E. coli* in zand

Vergelijkbaar met de resultaten uit het pilotexperiment (Figuur 14), blijkt dat *E. coli* kan groeien in zowel duinzand als entzand (Figuur 17, Figuur 18 en Bijlage V).

Bij 15°C treedt er in alle condities groei op, behalve bij 0,4% vocht en 0% OM (zwarte driehoek, waardes onder de detectiegrens en daarom niet zichtbaar in Figuur 17). In deze conditie is geen *E. coli* gedoseerd en komen de metingen niet boven de detectiegrens uit.

4.3.6 Groei van *E. coli* WR1 in zand

Bij 5°C en dosering van *E. coli* WR1, 5% vocht en 5% OM vindt er geen groei plaats (rood vierkant). Vanaf de start van het experiment sterft *E. coli* af, in zowel entzand als duinzand.

Gekweekte *E. coli* WR1 bacteriën lijken niet of in zeer beperkte mate te kunnen groeien in duinzand (blauw ruit en paarse cirkel, Figuur 17). In entzand groeien de gekweekte bacteriën wel goed. Dit is terug te zien in de maximale concentraties die worden bereikt: ongeveer 10^6 kve/ml in entzand versus 4×10^4 kve/ml in duinzand. De maximale groeipotentie die ganzenkeutelextract kan leveren in afwezigheid van een autochtone flora (ongeveer 10^8 kve/ml, Figuur 16) wordt hier niet bereikt. Zeer waarschijnlijk wordt dit veroorzaakt door de

aanwezigheid van de autochtone flora in het duinzand en entzand, wat met *E. coli* competeert voor de aanwezige groeistoffen.

Nadat de maximale concentratie is bereikt, verloopt de afsterving in duinzand minder snel dan in entzand (Tabel 9). Alleen in de condities waaraan, naast *E. coli* WR1, ook organisch materiaal met *E. coli* uit ganzenkeutels, worden toegevoegd vindt er (beperkte) groei plaats (groene driehoek).

4.3.7 Groei *E. coli* uit ganzenkeutelextract

Zonder *E. coli* WR1 dosering (oranje ruit) vindt er bij 5°C eerst beperkte groei plaats in beide zandsoorten, waarna de *E. coli* bacteriën alsnog afsterven. In duinzand vindt er vervolgens tussen dag 15 en 30 nog groei plaats, waar dit in entzand niet het geval is.

Bij 15°C zijn er duidelijke verschillen tussen groei van *E. coli* in duinzand en entzand (blauw vierkant, Figuur 17, Figuur 18, Tabel 9). De groei tussen dag 0 en dag 1 is in beide zandsoorten ongeveer even groot. In entzand wordt op dag 5, en op duinzand op dag 1, de hoogste concentratie bereikt waarna *E. coli* afsterft. In duinzand duurt de groei minder lang wat leidt tot lagere maximale concentraties. Na dag 15 treedt er in duinzand weer groei op, waar meerdere, mogelijke verklaringen voor zijn. Mogelijk geeft het restant organisch materiaal dat aanwezig is, of het afbraakmateriaal van afgestorven bacteriën, een extra groeipotentie welke pas na langere tijd beschikbaar komt. Een andere mogelijkheid is dat het hier om een langzaam groeiende bacterie, afkomstig uit het zand of het ganzenkeutelextract, gaat die gedetecteerd kan worden op LSA medium bij 44°C. De concentratie van deze bacterie is laag, waardoor deze groei in andere condities niet wordt gezien. Deze bacteriën zijn niet getypeerd, waardoor niet vast te stellen is of het hier om een *E. coli* of een andere thermo tolerante bacterie gaat.

In entzand lijkt de aan- of afwezigheid van organisch materiaal weinig invloed te hebben op *E. coli* groei (groene driehoek vergeleken met paarse cirkel). Bij 5% OM is de groei tussen dag 0 en 1 sneller, maar de maximale concentratie op dag 5 en de daarop volgende afsterving zijn nagenoeg gelijk. In het duinzand zijn de verschillen groter, met name de groei tussen dag 0 en 1 en de maximale concentratie zijn beide hoger bij dosering van 5% OM. Het grotere verschil in duinzand kan veroorzaakt worden door groei van *E. coli* die via het ganzenkeutelextract is gedoseerd, aangezien gekweekte *E. coli* WR1 bacteriën niet of nauwelijks kunnen groeien in duinzand (blauwe ruit en paarse cirkel).

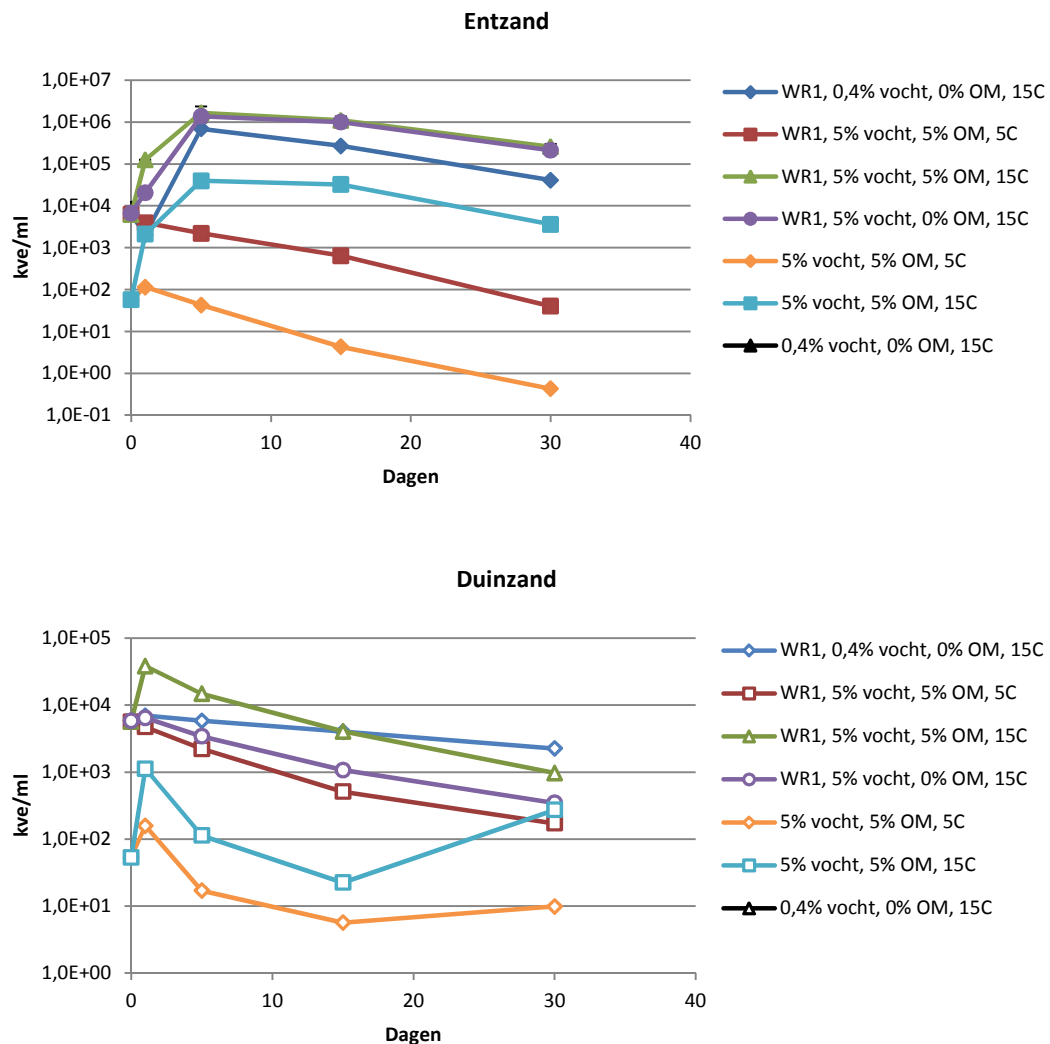
Of natuurlijke, fecale *E. coli* uit ganzenkeutels beter zijn aangepast op groei in duinzand dan gekweekte *E. coli* WR1 is niet te zeggen door het grote verschil in de startconcentratie ($5,3 \times 10^1$ vs $5,7 \times 10^3$ kve/gram nat zand).

Naast de gekweekte *E. coli* WR1 bacteriën kunnen ook de *E. coli* bacteriën die in het ganzenkeutelextract aanwezig zijn groeien in entzand en duinzand. In entzand volgt de groei van *E. coli* bacteriën uit ganzenkeutels hetzelfde patroon als gekweekte bacteriën, waarbij tussen dag 0 en dag 5 sterke groei optreedt en vervolgens afsterving plaats vindt. In entzand is de stijging in log-waardes het hoogst en is ook de absolute maximale concentratie hoger.

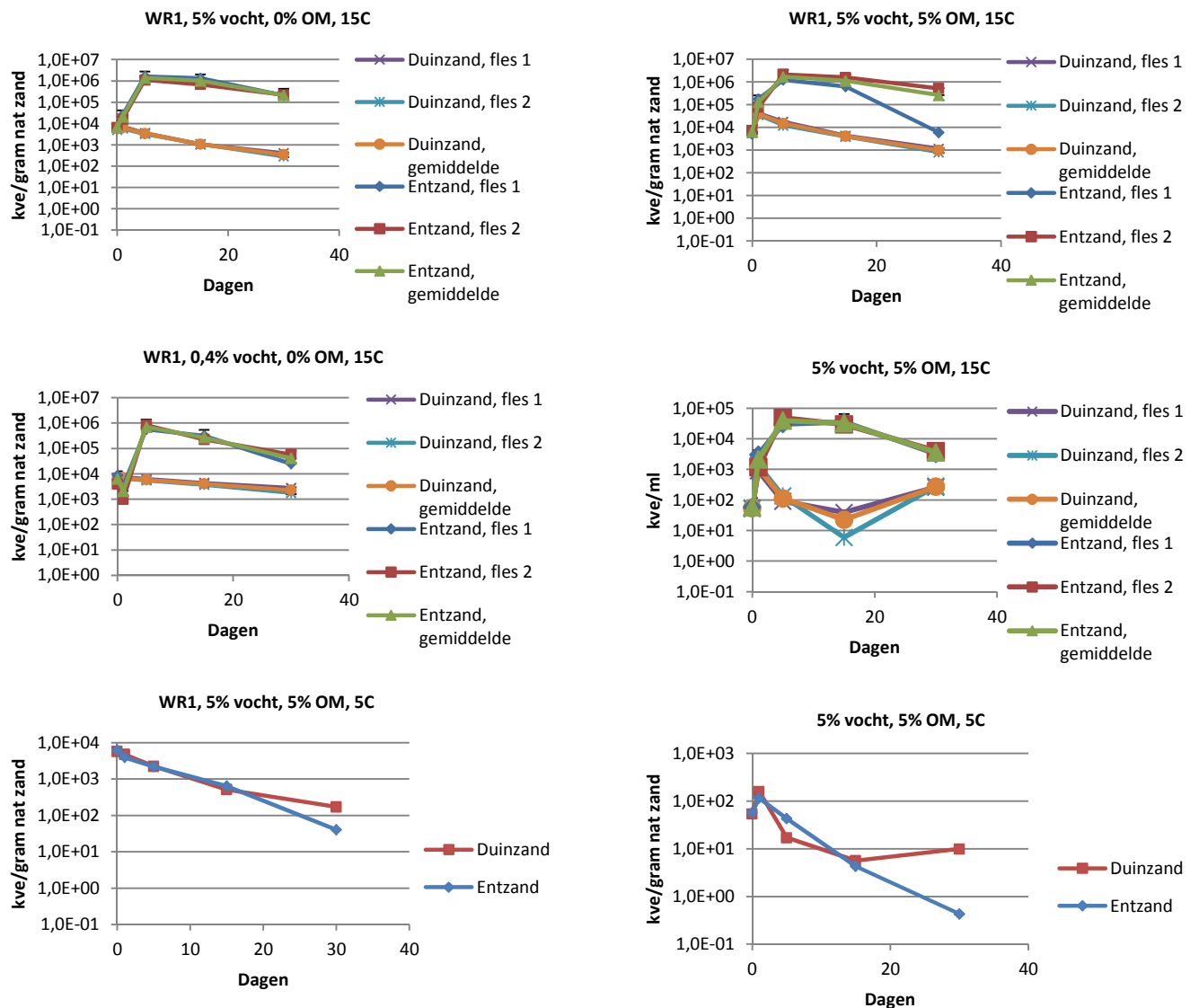
4.3.8 Effect van vochtgehalte op *E. coli* groei in zand

Een hoger vochtpercentage heeft een licht positief effect op *E. coli* groei in entzand (blauwe ruit vergeleken met paarse cirkel). Bij 0,4% vocht daalt de *E. coli* concentratie eerst, alvorens er sterke groei optreedt. Bij 5% vocht vindt er meteen groei plaats, de maximale concentratie van beide condities op dag 5 verschilt nauwelijks. Bij een hoger vochtpercentage gaat de

afsterving ook minder snel, al zijn de verschillen klein. In duinzand is dit juist omgedraaid, waarbij 0,4% vocht minder snel tot afsterving leidt dan 5% vocht.



FIGUUR 17. GROEI VAN *E. COLI* IN DUINZAND EN ENTZAND BIJ VERSCHILLENDE VOCHTCONDITIES EN GEHALTES ORGANISCH MATERIAAL (OM) IN DE VORM VAN GANZENKEUTELEXTRACT. DE WEERGEGEVEN RESULTATEN ZIJN HET GEMIDDELDE VAN TWEE GROEIEXPERIMENTEN VOOR DE CONDITIES OP 15°C. DE EXPERIMENTEN BIJ 5°C ZIJN IN ENKELVOUD UITGEVOERD. DE WAARDES VAN 0,4% VOCHT, 0% OM, 15C (ZWARTE DRIEHOEK) LIGGEN ONDER DE DETECTIEGREN EN ZIJN DAAROM NIET WEERGEGEVEN IN DEZE GRAFIEK.



FIGUUR 18. GROEI- EN AFSTERVINGSCURVES VAN *E. COLI* IN DUINZAND EN ENTZAND. DE INDIVIDUELE EXPERIMENTEN EN HET BEREKENDE GEMIDDELDE ZIJN WEERGEGEVEN.

4.3.9 Groeisnelheid, afstervingsnelheid en maximale concentratie van *E. coli* in zand

Van alle groeiexperimenten is in Tabel 9 de startconcentratie *E. coli* weergegeven, de maximale concentratie, of deze waarden significant van elkaar verschillen, de dag waarop het maximum is bereikt en de afstervingsnelheid vanaf de dag waarop het maximum werd bereikt.

De maximale waarden variëren sterk tussen de verschillende condities en zandsoorten. De hoogste waarden worden bereikt in entzand, bij dosering van WR1, 5% vocht, 5% OM en bij incubatie bij 15°C. De waarden in entzand liggen bij dosering van *E. coli* WR1 1,6 tot 2,3 log hoger dan bij dezelfde condities in duinzand. In duinzand worden juist de hoogste *E. coli* concentraties bereikt als zowel *E. coli* WR1 als ganzenkeutelextract is gedoseerd. Desondanks liggen deze nog steeds lager dan de hoogste concentratie gemeten in entzand.

In entzand wordt de maximale waarde in de meeste gevallen later bereikt dan in duinzand (dag 5 versus dag 1). Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de competitie van *E. coli* met andere bacteriën in het duinzand die zijn aangepast aan het zand.

Belangrijk bij deze waardes is dat met name de maximale concentratie en de afstervingssnelheid sterk beïnvloed worden door de aanwezigheid van een autochtone flora. Zoals eerder beschreven kan groei van de autochtone flora *E. coli* groei onderdrukken, wat tot lagere maximale concentraties kan leiden, of tot hogere afstervingssnelheden. Tevens is in deze groeiexperimenten niet elke dag gemeten, waardoor waarschijnlijk niet de echte piekwaarden zijn gemeten die ook tussen dag 5 en 15 kunnen liggen. Dit geldt met name voor de groeiexperimenten in entzand.

De afstervingssnelheden van *E. coli* in zand liggen lager vergeleken met waardes die eerder in natuurlijk oppervlaktewater zijn bepaald ($0,1 - 0,25 \log_{10} \cdot d^{-1}$, Hijnen et al., 2007). *E. coli* bacteriën overleven langer in entzand en duinzand dan in natuurlijke water. Het is niet te zeggen of is wordt veroorzaakt door een langzamere afsterving van de bacteriën of dat de afsterving gelijk is maar dat dit wordt gecompenseerd door groei waardoor de afstervingssnelheid lager lijkt.

TABEL 9. *E. COLI* CONCENTRATIE BIJ DE START VAN HET EXPERIMENT, DE MAXIMALE WAARDE (NMAX) EN OF DEZE SIGNIFICANT VAN ELKAAR VERSCHILLEN (P, WILCOXON-RANK TEST), DE DAG WAAROP HET MAXIMUM WORDT BEREIKT EN DE EXPONENTIËLE AFSTERVINGSCONSTANTE ($K_a = \log_{10} D^{-1}$) IN DUINZAND, ENTZAND EN WATER. DE AFSTERVINGSCONSTANTE IS BEREKEND VANAF HET TIJDPUNT WAAROP DE HOOGSTE CONCENTRATIE IS GEMETEN T/M DAG 30. DOOR HET BEPERKTE AANTAL MEETPUNTEN KAN DE K_a NIET ZEER NAUWKEURIG WORDEN BEPAALD. N.B.: NIET BEREKEND, NS: NIET SIGNIFICANT

	Entzand				
	Dag 0 (kve/gram nat zand)	Nmax (kve/gram nat zand)	p	Tijd tot Nmax (dagen)	K _a (log ₁₀ D ⁻¹)
WR1, 0,4% vocht, 0% OM, 15°C	6,3E+03	6,9E+05	<0,001	5	-0,0314
WR1, 5% vocht, 5% OM, 5°C	6,3E+03	6,3E+03	NS	0	-0,0154
WR1, 5% vocht, 5% OM, 15°C	6,3E+03	1,7E+06	<0,001	5	-0,0306
WR1, 5% vocht, 0% OM, 15°C	6,7E+03	1,4E+06	<0,001	5	-0,0348
5% vocht, 5% OM, 5°C	5,7E+01	1,1E+02	NB	1	0,0062
5% vocht, 5% OM, 15°C	5,8E+01	4,0E+04	<0,001	5	-0,0310
0,4% vocht, 0% OM, 15°C	<0,06	<0,07	NB	5	NB

	Duinzand				
	Dag 0 (kve/gram nat zand)	Nmax (kve/gram nat zand)	p	Tijd (dagen)	K _a (log ₁₀ D ⁻¹)
WR1, 0,4% vocht, 0% OM, 15°C	5,9E+03	7,0E+03	0,18	1	-0,0300
WR1, 5% vocht, 5% OM, 5°C	5,7E+03	5,7E+03	NS	0	-0,0198
WR1, 5% vocht, 5% OM, 15°C	5,7E+03	3,8E+04	0,18	1	-0,0224
WR1, 5% vocht, 0% OM, 15°C	5,8E+03	6,4E+03	<0,001	1	-0,0230
5% vocht, 5% OM, 5°C	5,4E+01	1,6E+02	NB	1	-0,0156
5% vocht, 5% OM, 15°C	5,3E+01	1,1E+03	<0,001	1	-0,0276
0,4% vocht, 0% OM, 15°C	<0,6	<0,6	NB	1	NB

	Steriel leidingwater			
	Dag 0 (kve/ml)	Nmax (kve/ml)	Tijd (dagen)	K _a (log ₁₀ D ⁻¹)
WR1, 0% OM, 5°C	8,8E+06	1,0E+07	1	-0,0322
WR1, 0% OM, 15°C	9,3E+06	1,0E+07	1	-0,0322
WR1, 5% OM, 5°C	7,8E+06	5,3E+06	0	-0,0002
WR1, 5% OM, 15°C	6,9E+06	1,4E+11	15	-0,0582

5 Discussie

5.1 *E. coli* als indicatororganisme

De literatuurstudie en de resultaten van de groeiproeven laten zien dat *E. coli* in beperkte mate kan groeien in verschillende grondsoorten waaronder duinzand. Met name de eerste dagen na dosering treedt er groei op. De mate van groei hangt samen met het vochtgehalte en hoeveelheid organisch materiaal, waarbij in de groeiproeven bij 15°C groei mogelijk was, maar bij 5°C nauwelijks.

Groei van *E. coli* in duinzand en, in mindere mate, entzand wordt zeer waarschijnlijk beperkt door predatie door protozoën en door de autochtone flora van het duinzand, welke aangepast is aan de condities in het zand en zo competeert met *E. coli* voor de beschikbare voedingsstoffen. In entzand is door het drogingsproces minder autochtone flora aanwezig. De autochtone flora van het entzand zal zich waarschijnlijk ook eerst aan moeten passen aan de nieuwe situatie, na dosering van vocht, organisch materiaal en *E. coli*, waardoor het langer kan duren voordat deze bacteriën gaan groeien. Hierdoor heeft *E. coli* meer voedingsstoffen tot zijn beschikking en vindt er minder competitie plaats waardoor de groei van *E. coli* sterker is in entzand en hogere maximale concentraties worden bereikt vergeleken met groei in duinzand. Deze maxima zijn echter duidelijk beneden de maximale groeipotentie die bereikt kan worden met het aanwezige gehalte organisch materiaal van het ganzenkeutelextract.

De mogelijke groei van *E. coli* kan consequenties hebben voor het gebruik als indicatororganisme. Een goed bruikbaar indicatororganisme voldoet aan verschillende eisen, waarvan één is dat ze niet (na)groeien in het milieu. Aangezien gekweekte *E. coli* WR1 in (beperkte) mate kan groeien in duinzand voldoet het hier niet aan. Dit kan de verhouding tussen indicator organisme (*E. coli* van fecale oorsprong en/of van nature aanwezig) en pathogeen beïnvloeden. Deze beïnvloeding lijkt vooral de eerste dagen na besmetting op te kunnen treden. Afhankelijk van de afstervingsnelheid van *E. coli* en het pathogeen waarmee het vergeleken wordt, en de mogelijke verschillen hier tussen, geldt dit ook voor de dagen daarna. Dit zal echter in verder onderzoek bepaald moeten worden.

Ondanks dat groei mogelijk is, is die onder de geteste omstandigheden maar beperkt en leidt de groei kortdurend tot licht hogere *E. coli* concentraties. Daardoor moet *E. coli* nog steeds gezien worden als een indicator voor fecale verontreiniging, ook in duinzand. Algemeen genomen geldt nog steeds dat als *E. coli* aanwezig is, dit zeer waarschijnlijk ook voor fecale pathogenen geldt.

Het onderzoek laat ook zien dat dit voor entzand anders kan liggen, daar kan de concentratie *E. coli* door groei in entzand beduidend (meerdere log-eenheden) worden verhoogd. Dit verschil tussen duin- en entzand wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat er op entzand minder natuurlijke flora aanwezig is, dus minder competitie om de beschikbare nutriënten, waardoor *E. coli* verder uit kan groeien. In een dergelijke situatie is de oorsprong van de besmetting mogelijk wel van fecale herkomst, maar zijn de *E. coli* gehaltes minder representatief en is de mate van de besmetting minder goed vast te stellen.

5.2 *E. coli* bacteriën in onttrokken duininfiltoraat: fecale of natuurlijke afkomst?

Bij de duinwaterbedrijven worden in het onttrokken duininfiltoraat soms *E. coli* bacteriën gevonden. Voor de AMVD is het van belang om te weten of het hier om fecale of natuurlijke *E. coli* gaat.

Op basis van de groeiexperimenten, waarin *E. coli* bacteriën slechts zeer beperkt en kortstondig kunnen groeien in duinzand, lijkt het niet waarschijnlijk dat *E. coli* in onttrokken duininfiltoraat van natuurlijke afkomst zijn en in het milieu zo sterk zijn gegroeid dat ze aanleiding zijn om hun rol als indicator voor fecale verontreiniging in dit milieu te herzien. Het is wel mogelijk dat de concentratie licht wordt overschat als de juiste condities aanwezig zijn en de fecale *E. coli* bacteriën licht hebben kunnen groeien in het duinzand. Het is mogelijk dat onder andere omstandigheden (bijvoorbeeld hogere temperatuur) sterkere groei op kan treden.

Als groei van *E. coli* bacteriën in duinzand makkelijk en vaak optreedt, kan worden verwacht dat bij bemonstering van het zand hogere *E. coli* concentraties worden gevonden. *E. coli* is echter niet aangetoond in het duinzand. Groei van *E. coli* in het duinzand kan mogelijk wel optreden in microklimaten waar de omstandigheden op dat moment groei toelaten.

Het literatuuronderzoek laat zien dat genetische technieken indicaties kunnen geven over groei van *E. coli*: *E. coli* die groeien in het milieu zijn te onderscheiden van *E. coli* uit feces, doordat bepaalde *E. coli* stammen de dominante *E. coli* populatie worden in dat milieu. Het is mogelijk om dat in een vergelijkend onderzoek te onderscheiden. Het is nog niet mogelijk om van individuele *E. coli* stammen betrouwbaar te beoordelen of zij van fecale of milieu origine zijn.

Idealiter worden de groeiexperimenten in zand uitgevoerd met gekweekte *E. coli* WR1 en een natuurlijk *E. coli* isolaat dat uit zand is geïsoleerd. Omdat voor de experimenten een groot aantal bacteriën nodig is, is het op dit moment technisch niet haalbaar. De concentratie *E. coli* in het zand is zeer laag waardoor er niet genoeg natuurlijke *E. coli* bacteriën geïsoleerd kunnen worden. Een optie is om een natuurlijke *E. coli* die uit zand is geïsoleerd op te kweken tot een hogere concentratie, maar dit kan ook invloed hebben op de eigenschappen van de bacterie. Daarom is er voor gekozen om de experimenten uit te voeren met *E. coli* WR1.

5.3 Groei van andere micro-organismen

Uit de literatuur en dit onderzoek blijkt dat *E. coli* bacteriën (beperkt) kunnen groeien in zand. Of dit echter ook geldt voor andere micro-organismen is niet geheel duidelijk. Mens-pathogene virussen zullen niet groeien, aangezien deze afhankelijk zijn van een gastheercel voor groei. Bacteriën daarentegen zouden wel kunnen groeien, mits de omstandigheden dat toestaan.

Uit literatuur is bekend dat enterococci kunnen groeien in zand en sediment (Staley *et al.*, 2014). Waarbij enterococci met name goed kunnen groeien in gesteriliseerd zand, maar niet of in zeer beperkte mate als het zand niet eerst gesteriliseerd is en de concurrerende autochtone flora gedood is.

5.4 Voorzorgsmaatregelen voor het gebruik van entzand

Dit onderzoek laat zien dat *E. coli* bacteriën en kweekbare, heterotrofe bacteriën goed kunnen groeien in entzand met slechts 0,4% vocht en geen toegevoegd organisch materiaal. Indien entzand besmet raakt, kan er dus snel groei optreden waardoor het zand verder

besmet raakt. Om dit te voorkomen is het belangrijk dat het entzand hygiënisch wordt behandeld en om besmetting door werkzaamheden zoveel mogelijk te voorkomen.

6 Conclusies en aanbevelingen

6.1 Conclusies

- *E. coli* kan in beperkte mate groeien in duinzand in aanwezigheid van de autochtone flora.
- Een hoger vochtgehalte, gehalte organisch materiaal en temperatuur leidt tot een sterkere groei.
- Er is een kleine kans dat *E. coli* bacteriën in het onttrokken duininfilttraat natuurlijke *E. coli* zijn, en niet van fecale oorsprong. Er zijn methodes om dit onderscheid te maken, maar deze moeten nog opgezet worden voor de Nederlandse situatie.

6.2 Aanbevelingen

Op basis van de literatuurstudie en de groeiproeven in duin- en entzand blijkt dat *E. coli* in milieucondities kan groeien. Onder de geteste omstandigheden is de groei in duinzand maar beperkt. Als er niet veel achtergrondflora aanwezig is (zoals in entzand) kan *E. coli* sterker uitgroeien. Ook zouden andere condities (bijvoorbeeld een hogere temperatuur) *E. coli* groei kunnen bevorderen. Specifieke omstandigheden die zich in de duinen voordoen waarbij de achtergrondflora gering is (bijvoorbeeld in een droge toplaag zand zonder vegetatie) zou aanleiding kunnen zijn tot sterkere groei van *E. coli*. Aanbevolen wordt om de groei van *E. coli* onder dergelijke omstandigheden na te gaan.

Uit het literatuuronderzoek is gebleken dat verschillende *E. coli* populaties van elkaar te onderscheiden zijn door middel van genetische analyse. Het wordt daarom aanbevolen om deze techniek op te zetten. Nadeel van deze techniek is wel dat er eerst per locatie een database opgebouwd moet worden met daarin genetische analyses van *E. coli* van verschillende (fecale) herkomst, waarmee de aangetroffen *E. coli* kunnen worden vergeleken.

Als er meer bekend is over mogelijke groei van *E. coli* in zand en of de *E. coli* in onttrokken duininfilttraat van natuurlijke of fecale afkomst zijn, kan deze kennis worden meegenomen in de AMVD. Op basis van dit onderzoek is er onvoldoende aanleiding om de AMVD van duininfiltratie, waarbij er nu vanuit wordt gegaan dat *E. coli* in het onttrokken duininfilttraat van fecale oorsprong zijn, aan te passen.

7 Referenties

Alm EW, Burke J, Hagan E – Persistence and potential growth of the fecal indicator bacteria, *Escherichia coli*, in shoreline sand at Lake Huron – 2006, J Great Lakes Res, vol 32, pp 401-406

Beversdorf LJ, Bornstein-Forst SM, McLellan SL – The potential for beach sand to serve as a reservoir for *Escherichia coli* and the physical influences on cell die-off – 2006

Byappanahalli MN, Whitman RL, Shively DA, Evert Ting WT, Tseng CC, Nevers MB – Seasonal persistence and population characteristics of *Escherichia coli* and enterococci in deep backshore sand of two freshwater beaches – 2006, J Water Health, vol 04, no 3, pp 313-320

Chandrasekaran R, Hamilton MJ, Wang P, Staley C, Matteson S, Birr A, Sadowsky MJ – Geographic isolation of *Escherichia coli* genotypes in sediments and water of the Seven Mile Creek – A constructed riverine watershed – 2015, Science of the Total Environment, vol 538, pp 78-85.

Cloutier DD, Alm EW, McLellan SL – The influence of land-use, nutrients, and geography on microbial communities and fecal indicator abundance at Lake Michigan beaches – 2015, AEMM, published online

Hijnen WAM, Lugtenberg AT, Ruiter H, Vink RRJ en Medema GJ. 2007. Decay rate index of *E. coli* and enterococci in fresh and salt bathing waters. AWWA Water Quality Technology Conference, Charlotte, US.

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

Ishii S, Sadowsky MJ – Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution – 2009

Ishii S, Yan T, Vu H, Hansen DL, Hicks RE, Sadowsky MJ – Factors Controlling Long-Term Survival and Growth of Naturalized *Escherichia coli* Populations in Temperate Field Soils – 2010

KWR 2015.107. TKI Calciet: met Hollandse kalkpellets de markt op

LaLiberte P and Grimes DJ – Survival of *Escherichia coli* in Lake Bottom Sediment – 1982

Perchec-Merien AM, Lewis GD – Naturalized *Escherichia coli* from New Zealand wetland and stream environments – 2013, FEMS Microbiol Ecol, vol 83, pp 494-503

Shaw MK, Marr AG and Ingraham JL – Determination of the minimal temperature for growth of *Escherichia coli* – 1971

Solo-Gabriele HM, Wolfert MA, Desmarais TR, Palmer CJ – Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment – 2000, AEMM, vol 66, pp 230-237

Staley C, Dunny GM, Sadowsky MJ – Environmental and animal-associated enterococci – 2014, Advances in Applied Microbiology, vol 87, pp 147-186

Staley ZR, Robinson C, Edge TA – Comparison of the occurrence and survival of fecal indicator bacteria in recreational sand between urban beach, playground and sandbox settings in Toronto, Ontario – 2016, Science of the Total Environment, vol 541, pp 520-527

Tate III RL – Cultural and environmental factors affecting the longevity of *Escherichia coli* in histosols – 1978

Taucer-Kapteijn M, Hoogenboezem W, Medema G – Environmental growth of the faecal indicator *Enterococcus moraviensis* – 2016, Water Science & Technology

Taucer-Kapteijn M, Hoogenboezem W, Hoogenboezem R, de Haas S, Medema G – Source tracking of *Enterococcus moraviensis* and *E. haemoperoxidus* – 2016, Journal of Water and health

Whitman RL, Nevers MB – Foreshore sand as a source of *Escherichia coli* in nearshore water of a Lake Michigan beach – 2003, AEMM, vol 69, no 9, pp 5555 – 5562

Whitman RL, Nevers MB, Byappanahalli MN – Examination of the watershed-wide distribution of *Escherichia coli* along southern Lake Michigan: an integrated approach – 2006, AEMM, vol 72, no 11, pp 7301-7310

Whitman R, Harwood VJ, Edge TA, Nevers M, Byappanahalli M, Vijayavel K, Brandão J, Sadowsky MJ, Alm EW, Crowe A, Ferguson D, Ge Z, Halliday E, Kinzelman J, Kleinheinz G, Przybyla-Kelly K, Staley C, Staley Z, Solo-Gabriele HM – Microbes in beach sands: integrating environment, ecology and public health – 2014, Rev Environ Sci Biotechnol. Sep 1; vol 13, no 3, pp 329-368

Bijlage I *E. coli* groei in mineraalmedium

Incubatietijd	5C, LLA	5C, LSA	10C, LLA	10C, LSA	15C, LLA	15C, LSA	25C, LLA
Dagen	kve/ml	kve/ml	kve/ml	kve/ml	kve/ml	kve/ml	kve/ml
0	15	22	22	13	28	22	22
1	27	27	20	5	37	32	90
2	25	10	20	18	228	132	487
3	13	3	22	23	573	758	293
4	8	5	18	38	1.143	1.683	1.282
5	15	2	58	45	6.900	5.200	
6	13	3	118	132	11.550	6.983	
7	17	2	335	365	20.367	25.917	37.783
8	13	5	963	1.142	22.533	17.200	13.617
9	10	0	3.000	2.467	30.000	21.200	23.033
10	15	0	9.217	6.800	26.033	13.117	15.367
11	5	3	19.383	16.333	27.000	16.650	32.517
14			15.750	19.483	10.267	21.733	
15			16.167	27.483	16.100	14.000	
16			14.483	22.017	10.133	13.267	

Bijlage II Pilot groeiexperiment

Dagen	<i>E. coli</i> (44C, LSA-agar)			
	Entzand Filcom 0,2-0,5 en 0,4-0,63 mm			
	+ WR1		+ WR1 en ganzenkeutel	
	kve/g nat zand	sd	kve/g nat zand	sd
0	4,3E+02	4,7E+01	4,0E+03	1,2E+02
1	5,4E+02	8,9E+01	1,5E+05	2,0E+04
5	9,2E+04	1,5E+04	1,1E+06	5,0E+04
15	3,2E+04	4,7E+03	5,2E+05	5,0E+04
30	2,6E+03	4,3E+02	1,5E+03	3,5E+02

Dagen	<i>E. coli</i> (44C, LSA-agar)			
	Duinzand Castricum			
	+ WR1 en ganzenkeutel		+ ganzenkeutel	
	kve/g nat zand	sd	kve/g nat zand	sd
0	9,6E+03	3,9E+02	1,9E+01	6,0E+00
1	8,0E+04	3,4E+03	7,2E+02	3,4E+01
5	3,9E+04	4,2E+03	1,2E+03	3,2E+02
15	2,6E+04	2,8E+03	8,9E+01	2,1E+01
30	6,5E+03	9,1E+02	1,1E+02	1,8E+01

Dagen	Koloniegetal 37C (LLA-agar)			
	Entzand Filcom 0,2-0,5 en 0,4-0,63 mm			
	+ WR1		+ WR1 en ganzenkeutel	
	kve/g nat zand	sd	kve/g nat zand	sd
0	6,6E+02	5,5E+01	4,7E+04	9,6E+03
1	1,3E+04	3,7E+03	3,4E+07	4,9E+06
5	9,9E+05	1,3E+05	7,0E+07	1,0E+07
15	1,1E+06	5,0E+04	1,7E+07	1,5E+06
30	2,4E+05	4,8E+04	1,6E+06	1,0E+05

Dagen	E.coli (44C, LSA-agar)			
	Duinzand Castricum			
	+ WR1 en ganzenkeutel		+ ganzenkeutel	
	kve/g nat zand	sd	kve/g nat zand	sd
0	3,5E+05	5,7E+04	4,9E+05	2,0E+05
1	1,8E+07	2,7E+06	1,9E+07	1,5E+06
5	4,7E+06	6,6E+05	4,2E+06	6,6E+05
15	2,9E+06	2,1E+05	2,3E+06	1,4E+05
30	1,6E+06	9,1E+04	1,1E+06	1,3E+05

Bijlage III Chemische analyse duinzand

Chemische analyse	Concentratie in droge stof	
	mg/kg droge stof	(%)
Ijzer	2900	0,29%
Mangaan	43	0,00%
TOC	1300 mg C	0,13%
Fosfaat (P)	92	0,01%
Koolstof (C)	6285	0,66%
Stikstof (N)	445	0,04%
Zwavel (S)	83	0,01%
Al ₂ O ₃	27439	2,74%
BaO	371	0,04%
Bi ₂ O ₃	<200	< 0,02 %
CaO	11495	1,15%
CeO ₂	<200	< 0,02 %
CoO	<200	< 0,02 %
Cr ₂ O ₃	<200	< 0,02 %
CuO	<200	< 0,02 %
Fe ₂ O ₃	5377	0,54%
HfO ₂	<200	< 0,02 %
K ₂ O	11309	1,13%
La ₂ O ₃	<200	< 0,02 %
MgO	1483	0,15%
Mn ₃ O ₄	<200	< 0,02 %
MoO ₃	<200	< 0,02 %
Na ₂ O	6396	0,64%
Nb ₂ O ₅	<200	< 0,02 %
NiO	<200	< 0,02 %
P ₂ O ₅	371	0,04%
PbO	<200	< 0,02 %
Sb ₂ O ₃	<200	< 0,02 %
SiO ₂	854509	85,45%
SnO ₂	<200	< 0,02 %
SrO	<200	< 0,02%
Ta ₂ O ₅	<200	< 0,02%
ThO ₂	<200	< 0,02%
TiO ₂	649	0,06%
U ₃ O ₈	<200	< 0,02%
V ₂ O ₅	<200	< 0,02%

WO ₃	464	0,05%
Y ₂ O ₃	<200	< 0,02%
ZnO	<200	< 0,02%
ZrO ₂	<200	< 0,02%

Bijlage IV Korrelgrootteverdeling duinzand

x ₀ /mm	Cumulatieve verdeling (%)	Verdeling per fractie (%)
0,0045	0,67	0,67
0,0055	0,80	0,13
0,0065	0,90	0,10
0,0075	0,98	0,08
0,0090	1,08	0,10
0,0110	1,19	0,11
0,0130	1,27	0,08
0,0155	1,37	0,10
0,0185	1,49	0,12
0,0215	1,61	0,12
0,0250	1,75	0,14
0,0300	1,93	0,18
0,0375	2,18	0,25
0,0450	2,44	0,26
0,0525	2,78	0,34
0,0625	3,30	0,52
0,0750	3,79	0,49
0,0900	3,95	0,16
0,1050	4,06	0,11
0,1250	5,73	1,67
0,1500	12,38	6,65
0,1800	26,63	14,25
0,2150	46,97	20,34
0,2550	67,98	21,01
0,3050	85,91	17,93
0,3650	96,46	10,55
0,4350	100,00	3,54
0,5150	100,00	0,00
0,6150	100,00	0,00
0,7350	100,00	0,00
0,9750	100,00	0,00

Bijlage V Meetresultaten van groeixperiment (na correctie voor recovery)

Entzand Filcom 0,2-0,5 en 0,4-0,63 mm						
		Dag 0	Dag 1	Dag 5	Dag 15	Dag 30
WR1, 0,4% vocht, 0% OM, 15C	kve/g nat zand	8,7E+03	3,1E+03	5,7E+05	3,1E+05	2,5E+04
		3,9E+03	9,9E+02	8,2E+05	2,2E+05	5,7E+04
	gem	6,3E+03	2,1E+03	6,9E+05	2,7E+05	4,1E+04
	sd	3,4E+03	1,5E+03	1,8E+05	6,2E+04	2,3E+04
WR1, 5% vocht, 5% OM, 5C	kve/g nat zand	6,3E+03	3,9E+03	2,2E+03	6,4E+02	4,0E+01
WR1, 5% vocht, 5% OM, 15C	kve/g nat zand	5,1E+03	1,7E+05	1,2E+06	6,3E+05	5,9E+03
		7,4E+03	7,7E+04	2,1E+06	1,6E+06	5,1E+05
	gem	6,3E+03	1,3E+05	1,7E+06	1,1E+06	2,6E+05
	sd	1,6E+03	6,9E+04	6,4E+05	6,7E+05	3,6E+05
WR1, 5% vocht, 0% OM, 15C	kve/g nat zand	7,0E+03	2,5E+04	1,6E+06	1,3E+06	2,1E+05
		6,4E+03	1,6E+04	1,1E+06	6,9E+05	2,2E+05
	gem	6,7E+03	2,1E+04	1,4E+06	1,0E+06	2,1E+05
	sd	3,7E+02	6,4E+03	3,8E+05	4,5E+05	9,9E+03
5% vocht, 5% OM, 5C	kve/g nat zand	5,72E+01	1,14E+02	4,29E+01	4,29E+00	4,29E-01
5% vocht, 5% OM, 15C	kve/g nat zand	5,80E+01	3,04E+03	3,04E+04	3,50E+04	3,19E+03
		<3	1,18E+03	4,88E+04	2,99E+04	4,03E+03
	gem	5,80E+01	2,11E+03	3,96E+04	3,24E+04	3,61E+03
	sd	#DIV/0!	1,32E+03	1,30E+04	3,58E+03	5,92E+02
0,4% vocht, 0% OM, 15C	kve/g nat zand	<0.06	<0.06	<0.07	<0.06	<0.06
		<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
	gem	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
	sd	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Duinzand Castricum						
		Dag 0	Dag 1	Dag 5	Dag 15	Dag 30
WR1, 0,4% vocht, 0% OM, 15C	kve/g nat zand	6,9E+03	7,5E+03	6,1E+03	4,3E+03	2,7E+03
		5,0E+03	6,5E+03	5,5E+03	3,7E+03	1,8E+03
	gem	5,9E+03	7,0E+03	5,8E+03	4,0E+03	2,3E+03
		sd	1,4E+03	7,0E+02	4,4E+02	7,0E+02
WR1, 5% vocht, 5% OM, 5C	kve/g nat zand	5,7E+03	4,7E+03	2,2E+03	5,1E+02	1,7E+02
WR1, 5% vocht, 5% OM, 15C	kve/g nat zand	5,6E+03	4,2E+04	1,7E+04	4,2E+03	1,1E+03
		5,8E+03	3,5E+04	1,2E+04	3,9E+03	8,0E+02
	gem	5,7E+03	3,8E+04	1,5E+04	4,1E+03	9,7E+02
		sd	1,6E+02	4,9E+03	3,7E+03	2,4E+02
WR1, 5% vocht, 0% OM, 15C	kve/g nat zand	6,6E+03	7,0E+03	3,6E+03	1,1E+03	4,1E+02
		5,1E+03	5,8E+03	3,3E+03	1,1E+03	2,9E+02
	gem	5,8E+03	6,4E+03	3,4E+03	1,1E+03	3,5E+02
		sd	1,1E+03	8,4E+02	4,7E+00	8,5E+01
5% vocht, 5% OM, 5C	kve/g nat zand	5,39E+01	1,58E+02	1,71E+01	5,66E+00	9,88E+00
5% vocht, 5% OM, 15C	kve/g nat zand	5,47E+01	8,90E+02	9,07E+01	3,89E+01	2,62E+02
		5,18E+01	1,35E+03	1,35E+02	5,90E+00	2,82E+02
	gem	5,33E+01	1,12E+03	1,13E+02	2,24E+01	2,72E+02
		sd	2,04E+00	3,28E+02	3,16E+01	2,33E+01
0,4% vocht, 0% OM, 15C	kve/g nat zand	<0.6	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
		<0.6	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
	gem	<0.6	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
		sd	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Groei en afsterving in water

	Dag 0	Dag 1	Dag 5	Dag 15	Dag 30
WR1, 0% OM, 5C	8,8E+03	1,0E+04	8,7E+03	5,9E+03	3,4E+03
WR1, 0% OM, 15C	9,3E+03	1,0E+04	6,8E+03	7,4E+03	3,5E+03
WR1, 5% OM, 5C	7,8E+03	5,3E+03	4,8E+02	9,0E+00	1,0E+00
WR1, 5% OM, 15C	6,9E+03	3,8E+03	7,7E+07	1,4E+08	1,3E+08

Bijlage VI NGS van duinzand en ganzenkeutelextract

Resultaten NGS op familieniveau

	Percentage sequenties		
	Zand	Keutelgans_2	Keutelgans_1
Acidobacteria_Gp16_family_incertae_sedis	2,70	0,00	0,00
Acidobacteria_Gp17_family_incertae_sedis	2,42	0,00	0,00
Acidobacteria_Gp4_family_incertae_sedis	7,26	0,00	0,00
Acidobacteria_Gp6_family_incertae_sedis	16,69	0,01	0,01
Actinobacteria_unclassified	3,31	0,00	0,00
Streptomyetaceae	1,53	0,00	0,00
Solirubrobacterales_unclassified	1,24	0,00	0,00
Bacteroidetes_unclassified	0,30	0,01	0,00
Sphingobacteriaceae	0,04	22,63	19,68
Flavobacteriaceae	0,03	19,17	17,05
Planctomycetaceae	6,08	0,00	0,00
Proteobacteria_unclassified	0,87	0,01	0,02
Alphaproteobacteria_unclassified	0,98	0,01	0,00
Hyphomicrobiaceae	1,65	0,04	0,05
Rhizobiales_unclassified	2,84	0,03	0,03
Rhodobacteraceae	0,08	1,83	3,18
Betaproteobacteria_unclassified	1,52	0,03	0,03
Burkholderiaceae	0,03	0,01	0,00
Burkholderiales_unclassified	0,42	2,97	2,67
Comamonadaceae	0,21	2,69	3,11
Enterobacteriaceae	0,00	7,12	7,76
Gammaproteobacteria_unclassified	1,50	0,01	0,01
Moraxellaceae	0,02	26,78	29,76
Pseudomonadaceae	0,06	2,78	3,01
Xanthomonadaceae	0,15	4,90	4,59
Spartobacteria_family_incertae_sedis	2,17	0,00	0,00
Bacteria_unclassified	24,85	0,06	0,04
Bacillales_unclassified	1,12	0,01	0,01
Enterococcaceae	0,00	0,83	1,04
Other (<1%)	19,92	8,07	7,94

Resultaten NGS op orderniveau

	Percentage sequenties		
	Zand	Keutelgans_2	Keutelgans_1
Acidobacteria_Gp16_order_incertae_sedis	2,70	0,00	0,00
Acidobacteria_Gp17_order_incertae_sedis	2,42	0,00	0,00
Acidobacteria_Gp4_order_incertae_sedis	7,26	0,00	0,00
Acidobacteria_Gp6_order_incertae_sedis	16,69	0,01	0,01
Actinobacteria_unclassified	3,31	0,00	0,00
Actinomycetales	6,23	1,49	1,57
Solirubrobacterales	2,30	0,00	0,00
Bacteroidetes_unclassified	0,30	0,01	0,00
Bacteroidales	0,00	0,02	0,02
Sphingobacterales	0,49	22,98	20,00
Flavobacterales	0,04	19,17	17,05
Planctomycetales	6,08	0,00	0,00
Proteobacteria_unclassified	0,87	0,01	0,02
Alphaproteobacteria_unclassified	0,98	0,01	0,00
Rhizobiales	5,51	0,61	0,67
Rhodobacterales	0,08	1,83	3,18
Betaproteobacteria_unclassified	1,52	0,03	0,03
Burkholderiales	0,73	6,06	6,17
Myxococcales	1,16	0,00	0,00
Enterobacterales	0,00	7,12	7,76
Gammaproteobacteria_unclassified	1,50	0,01	0,01
Pseudomonadales	0,07	29,56	32,77
Xanthomonadales	0,41	4,90	4,59
Spartobacteria_order_incertae_sedis	2,17	0,00	0,00
Bacteria_unclassified	24,85	0,06	0,04
Bacillales	3,30	1,23	1,29
Lactobacillales	0,00	0,91	1,12
Clostridiales	0,16	1,41	1,33