

KWR 2017.077 | November 2017

Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2017

Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2017

KWR 2017.077 | November 2017

Opdrachtnummer
401895

Projectmanager
Edwin Kardinaal

Opdrachtgever
RWS WV

Kwaliteitsborger(s)
Gertjan Medema

Auteur(s)
Edwin Kardinaal

Verzonden aan
Leo van Ballegooijen, RWS WV

Jaar van publicatie
2017

Meer informatie

Edwin Kardinaal
T 06-54290049
E Edwin.Kardinaal@kwrwater.nl



December 2017 © 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.

Inhoud

1	Inleiding	5
2	Materiaal & Methoden	7
2.1	Watermonsters	7
2.2	Filtratie	7
2.3	DNA analyse	7
3	Resultaten	10
3.1	Resultaten bronosporen 2017	10
3.2	Kwaliteitsborging	10
3.3	Resultaten veldmonsters	10
3.4	Bronnen in relatie tot fecale zwemwater indicatoren	11
3.5	Bronnen 2017 in relatie tot eerdere jaren	13
4	Conclusies	<u>1415</u>
4.1	Verloop onderzoek 2017	<u>1415</u>
4.2	Van DNA bronopsporing naar maatregelen	<u>1415</u>
5	Referenties	<u>1617</u>
Bijlage I	DNA methodiek	<u>1819</u>
	Isolatie van DNA	<u>1920</u>
	qPCR methoden	<u>1920</u>
	Kwaliteitscontrole	<u>1920</u>
Bijlage II	Resultaten 2017	<u>2122</u>

1 Inleiding

Tijdens het zwemseizoen wordt op veel zwemwaterlocaties in Nederland met regelmaat de zwemwaterkwaliteit beoordeeld aan de hand van de indicatoren *Escherichia coli* (*E. coli*) en intestinale enterococci. Op basis van 4 jaar aaneengesloten monitoring wordt de zwemwaterkwaliteit beoordeeld. Van iedere officiële zwemwaterlocatie wordt de zwemwaterkwaliteit jaarlijks aan de EU gerapporteerd. Op basis van de concentraties fecale indicatorbacteriën worden de locaties ingedeeld in klassen, variërend van “slecht” tot “uitstekend”. Sinds 2015 moeten alle zwemwaterlocaties minimaal aan de kwaliteit “aanvaardbaar” voldoen. Daarnaast worden lidstaten aangemoedigd om te streven naar een “uitstekende” waterkwaliteit (Europese Unie, 2006).

Op een aantal zwemwaterlocaties die gelegen zijn in rijkswateren is de zwemwaterkwaliteit niet op orde, de locaties zijn ingedeeld in de klasse “slecht”. Daarnaast is op een aantal locaties de kwaliteit “aanvaardbaar” maar is onduidelijk wat de onderliggende oorzaak is van deze score. In 2012 t/m 2016 heeft Rijkswaterstaat onderzoek laten uitvoeren naar de oorzaken van de beperkte zwemwaterkwaliteit van een aantal locaties in haar beheergebied (Heijnen *et al*, 2014; Kardinaal & Heijnen, 2014; Kardinaal & Heijnen, 2015; Kardinaal & Heijnen, 2016). Met behulp van DNA technieken zijn de bronnen van fecale verontreiniging in kaart gebracht. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de DNA informatie van bacteriesoorten die in hoge concentraties in de darmen van specifieke diergroepen voorkomen. Aan de hand van deze bacteriën kan met grotere zekerheid aangegeven worden wat de herkomst van de indicatororganismen *E. coli* en enterococci is. Op basis van de toegepaste DNA technieken zijn de volgende bronnen te onderscheiden: mensen, runderen, herkauwers in het algemeen, paarden en varkens (voor al deze diergroepen wordt gebruik gemaakt van de *Bacteroides* bacteriën), vogels (waarbij gebruik gemaakt wordt van de bacterie *Helicobacter*) en honden (waarbij gebruik gemaakt wordt van het mitochondriaal DNA van de hond zelf). In figuur 1.1 is geïllustreerd welke bronnen met fecale herkomst zoal in het oppervlaktewater voor kunnen komen.



FIGUUR 1.1. OVERZICHT VAN POTENTIELE BRONNEN VAN FECALE VERONTREINIGING (UIT HEIJNEN *ET AL*, 2014)

Voor Rijkswaterstaat heeft het onderzoek uit 2012 t/m 2016 waardevolle resultaten opgeleverd. Met behulp van de DNA bronopsporingstechniek is onderbouwd dat er

verschillende oorzaken zijn van de achterblijvende zwemwaterkwaliteit (vogels en/of honden en/of runderen en/of mensen).

Dit inzicht maakt het mogelijk om gericht maatregelen te initiëren waarmee de zwemwaterkwaliteit verbeterd kan worden, of draagt bij aan de onderbouwing dat een locatie niet geschikt gemaakt kan worden om zonder gezondheidsrisico te kunnen zwemmen.

De onderzoeken vanaf 2012 t/m 2016 hebben voor vele locaties inzicht gegeven in de oorzaak achter de bacteriële verontreiniging met fecale oorsprong. Er zijn echter nog een aantal locaties waar dat inzicht nog niet compleet is. Van deze locaties is het van belang om de bronnen in beeld te krijgen. Zodoende kunnen aansluitend eventueel passende maatregelen gedefinieerd worden. Gedurende het zwemseizoen 2017 is daarom het bronopsporingsonderzoek gestart op vier zwemwaterlocaties in rijkswateren.

2 Materiaal & Methoden

2.1 Watermonsters

In 2017 zijn op onderstaande locaties de bronanalyses uitgevoerd (zie tabel 2.1). In totaal zijn er op 4 locaties monsters genomen. Op alle hieronder genoemde locaties is tijdens de reguliere bemonstering extra water bemonsterd voor de nadere bronanalyse (per locatie 6 of 12 monsters). In totaal zijn 30 monsters verzameld. Al de monsters zijn gedurende het zwemseizoen genomen door Intertek.

TABEL 2.1. OVERZICHT VAN DE LOCATIES WAARVAN IN 2017 DE DNA BRONANALYSES ZIJN UITGEVOERD EN DE FREQUENTIE VAN BEMONSTEREN TIJDENS HET ZWEMSEIZOEN 2017.

Locatie	# metingen	monstername	filtratie
Strandbad Edam	12	Intertek	Intertek
Zwembad Warder	6	Intertek	Intertek
Strand Schardam	6	Intertek	Intertek
Den Haag Kijkduin	6	Intertek	Intertek
Totaal	30		

2.2 Filtratie

De filtraties en conservering van al de watermonsters zijn uitgevoerd door Intertek. Filtratie is uitgevoerd binnen 48 uur na monstername. De gebruikte volumes zijn voor alle monsters 50 ml. De monsters zijn, onder vacuüm, gefiltreerd over een polycarbonaat membraanfilter met een poriegrootte van 0,2 µm en een doorsnede van 4,5 cm. Ten behoeve van de kwaliteitscontrole is bij elke filtratierEEKS eveneens een blanco gecreëerd, wat betekent dat 50 ml DNA vrij water over een filter geleid is. Na filtratie zijn de filters opgenomen in buffervloeistof en opgeslagen in de vriezer (-20 °C). Aan het eind van het zwemseizoen zijn de monsters naar het laboratorium van KWR vervoerd, waar de verdere behandeling van de monsters plaats heeft gevonden.

Op basis van de kweekresultaten van *E. coli* en enterococci (data verkregen via RWS WVL) is een aantal monsters geselecteerd dat verder in behandeling is genomen voor de nadere DNA analyse. Vooral de momenten waarop overschrijding van de waarden uit de zwemwaterrichtlijn is geconstateerd zijn opgenomen voor de nadere bronanalyse (zie hfdst. 3 voor de lijst). Daarnaast is ook een aantal monsters geselecteerd dat dient als referentie.

2.3 DNA analyse

De DNA analyse is op te splitsen in een aantal stappen: DNA isolatie, DNA analyse (m.b.v. qPCR) en kwaliteitscontrole. Zowel voor de DNA isolatie als voor de qPCR analyses is gebruik gemaakt van KWR werkvoorschriften, voor details van deze stappen wordt verwezen naar Bijlage I. De kwaliteitscontrole bevat twee onderdelen, in de analyse wordt gebruik gemaakt van een interne controle zodat zicht ontstaat op de efficiëntie van de DNA extractie en van de qPCR analyse. De uitkomsten van de PCR analyse worden gecorrigeerd voor het rendement van deze interne controle (zie Bijlage I). De tweede controle wordt uitgevoerd doordat een collega laborant alle gerapporteerde uitkomsten controleert op juistheid. Ook de controlestappen zijn vastgelegd in KWR werkvoorschriften.

Blanco filters zijn meegenomen in de qPCR analyse. Mochten er in de blanco's (hoge) concentraties van een bepaald gen aangetroffen worden, dan worden de monsters uit de reeks waarin de blanco gecreëerd is kritisch beoordeeld en zo nodig uitgesloten van verdere analyse.

Voor een deel van de monsters (Den Haag Kijkduin) geldt dat ze onderzocht zijn met de DNA merkers die coderen voor de bronnen humaan, paard, hond en vogel en een deel van de monsters (Strandbad Edam) is onderzocht op de bronnen humaan, paard, hond, vogel, herkauwer en varken.

3 Resultaten

3.1 Resultaten bronosporen 2017

In 2017 zijn van vier zwemwaterlocaties, waarvan RWS de waterkwaliteitsbeheerder is, watermonsters verzameld waarin potentiële bronnen van fecale herkomst gemeten kunnen worden. In 2017 zijn bij KWR 42 filters aangeleverd waarvan 30 afkomstig van zwemwaterlocaties en de overige betreffen de blanco filters (gefiltreerd met DNA vrij water) zoals die bij elke filtratierEEKS meegenomen zijn.

De keuze van de te analyseren DNA monsters is gebaseerd op de overschrijdingen van de *E. coli* en/of enterococcon signaalwaarden, of op basis van opvallende verhoogde concentraties. In Nederland wordt de grens van 1800 kve/100 ml met betrekking tot *E. coli* aangehouden als een overschrijding van het acute risico (Stuurgroep Water, 2013). Voor intestinale enterococcon ligt die grens bij 400 kve/100 ml. Zowel op de locatie Warder als op de locaties Schardam was in het seizoen 2017 niet of nauwelijks sprake van verhoogde concentraties van deze parameters. Er is daarom besloten om deze twee locaties dit seizoen niet nader te onderzoeken op het voorkomen van de herkomst van fecale verontreiniging. Op de locaties Strandbad Edam en Den Haag Kijkduin was wel sprake van overschrijdingen. Het DNA onderzoek in 2017 heeft zich gericht op deze twee locaties. De hier gebruikte dataset bevat 1 monster waarvan de enterococcon concentratie deze signaalwaarde overschreed en 2 monsters waarvan de *E. coli* concentratie de signaalwaarde overschreden heeft. Daarnaast zijn eveneens monsters geanalyseerd die als referentie dienen, wat betekent dat de concentraties aan indicatorparameters laag is.

Van deze filters zijn er in totaal 12 monsters (3 van Kijkduin en 9 van Edam), afkomstig van zwemwaterlocaties, geanalyseerd met de qPCR technieken (zie Bijlage I).

3.2 Kwaliteitsborging

De rendementen van de DNA extracties zijn over het algemeen zeer goed (> 20 % rendement). Voor twee monsters lag het DNA extractierendement onder de 10%, dit is voldoende om DNA kopie aantallen te kunnen berekenen. Deze monsters (Kijkduin 23 mei 2017 & Strandbad Edam 18 april 2017) zijn wel meegenomen in de verdere analyse maar niet gecorrigeerd voor het rendement.

In de blanco filters zijn twee monsters aangetroffen waarin enige remming van de extractie is aangetroffen (Bijlage I). Uit de analyses van de blanco's blijkt verder dat alle onderzochte bronnenmarkers negatief waren.

3.3 Resultaten veldmonsters

Van de 12 geanalyseerde veldmonsters is in 8 van de monsters een bron gedetecteerd. Net als in voorgaande jaren 2015 en 2016 is in 2017 het vaakst humane *Bacteroides* aangetroffen, in 8 monsters. Daarbij is de hoogste concentratie aangetroffen op de locatie Strandbad Edam. In 4 monsters zijn ook herkauwer *Bacteroides* aangetroffen, met name op de locatie Strandbad Edam zijn de aangetroffen concentraties hoog. De overige bronnen zijn in de monsters niet aangetoond (onder de detectielimiet).

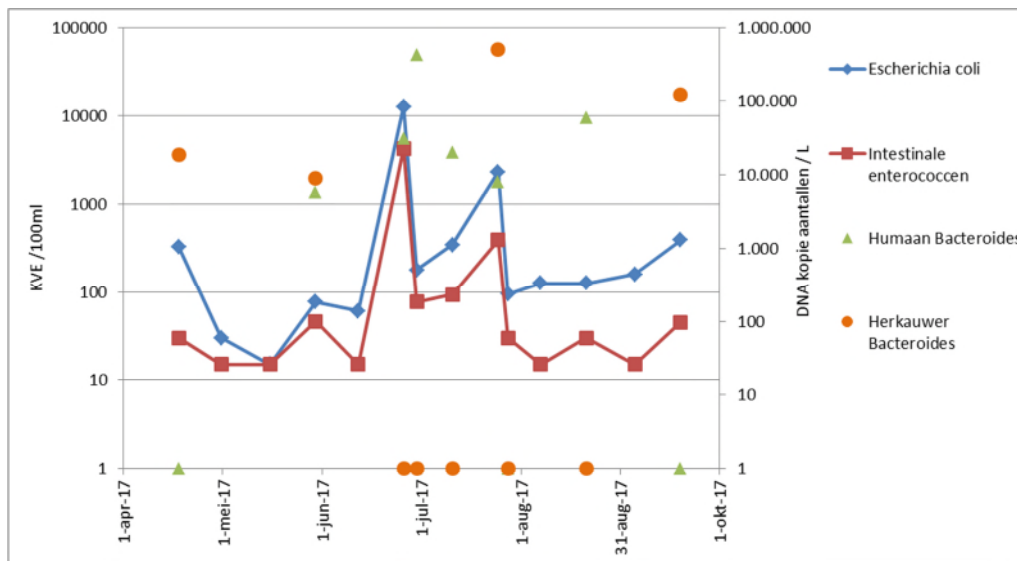
3.4 Bronnen in relatie tot fecale zwemwater indicatoren

Van alle door KWR geanalyseerde watermonsters is door de monsternemers ook water verzameld voor de analyse van de zwemwaterparameters *E. coli* en enterococcen. Zodoende kunnen de DNA resultaten goed gebruikt worden om de bron van overschrijdingen of verhoogde concentraties van deze indicatorbacteriën te onderzoeken. Uit de dataset zoals die ontvangen is van RWS WVL blijkt dat voor *E. coli* op 2 monsternamemomenten de 1800 kve/100 ml is overschreden (zie Bijlage II). In één van deze bewuste monsters overschrijdt ook de enterococcon concentratie de signaalwaarde (400 kve/100 ml). Daarnaast zijn er op twee monsternamedagen concentraties enterococcen aangetroffen die net de signaalwaarde niet overschrijden (393 KVE / 100 ml). Deze overschrijdingen zijn waargenomen op 2 verschillende zwemwaterlocaties (zie Bijlage II). De hoogste concentraties aan *E. coli* zijn aangetroffen op de locatie Strandbad Edam, ook de hoogste concentratie aan enterococcon is aangetroffen op de locatie Strandbad Edam.

In onderstaande figuren zijn de concentraties zwemwaterparameters uitgezet tegen het aantal DNA kopieën zoals die bepaald zijn in de watermonsters. De DNA kopie aantallen kunnen nogal variëren per locatie en per bron. De aantallen kunnen uiteenlopen van enkele tienduizenden tot meer dan een miljoen kopie aantallen per liter. De DNA kopie aantallen zijn dan ook weergegeven op LOG schalen, waarvan het maximum per locatie kan variëren. Op deze manier wordt de waargenomen dynamiek van elke bron het best visueel weergegeven.

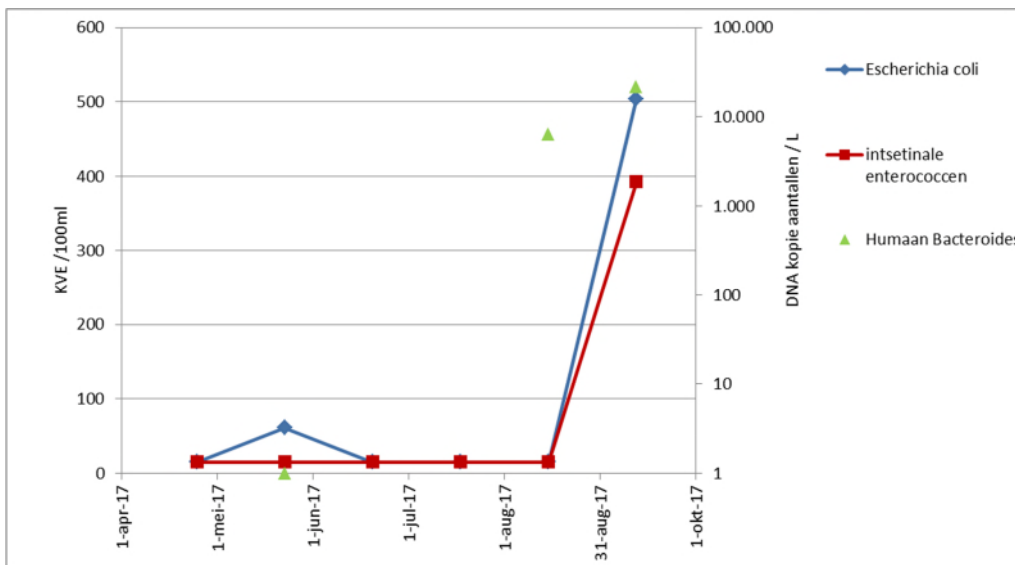
Zoals aangegeven in de onderstaande figuur (figuur 3.1) is op het moment van overschrijding van de zwemwaterparameters op 26-6-2017 alleen DNA aangetoond van humane herkomst. Bij de overschrijding van 25-7-2017 werden de bronnen humaan en herkauwer aangetoond. De bron humaan is van juni tot en met augustus in hoge concentratie aanwezig op deze locatie. De dynamiek van deze merker is in die periode vergelijkbaar met die van de *E. coli* concentratie. De bron herkauwer vertoont in die periode geen goede overeenkomst met de dynamiek zoals die voor de zwemwaterparameters waargenomen wordt, maar lijkt aan begin en eind van het seizoen wel gekoppeld aan hogere *E. coli* concentraties (geen overschrijdingen). Deze uitkomst suggereert dat verontreiniging van humane herkomst de verantwoordelijke bron is voor de overschrijding van de *E. coli* en enterococcon signaalwaarde. Echter kan ook de bron herkauwer bijdragen aan overschrijdingen van de signaalwaardes voor zwemwaterparameters (zie overschrijding 25-7-2017).

Op het moment van de overschrijdingen is er op deze locaties sprake van een periode waarin de nodige neerslag (ca. 7 en 13 mm / dag) gevallen is. Mogelijk dat overstorten van lokale bronnen leiden tot verhoogde emissie van overstort water naar deze zwemwaterlocatie. Op zich is de neerslag niet extreem hoog, maar de analyse van zwemwaterparameters valt niet vaak samen met dergelijke pieken in neerslag.



FIGUUR 3.1. CONCENTRATIEVERLOOP VAN DIVERSE BACTERIËN OP DE LOCATIE OP DE LOCATIE STRANDBAD EDAM. DE CONCENTRATIES *E. COLI* EN ENTEROCOCCEN ZIJN UITGEZET OP DE LINKERAS EN UITGEDRUKT IN KVE/100 ML. DE OVERIGE PARAMETERS ZIJN UITGEZET OP DE RECHTERAS EN UITGEDRUKT ALS DNA KOPIE AANTALLEN/ L.

Op de locatie Den Haag Kijkduin leek het hele zwemseizoen de waterkwaliteit op orde. In september 2017 werd er toch een verhoging van de concentraties *E. coli* en enterococci aangetroffen (figuur 3.2). De enige bron die op dat moment aangetoond werd is van humane herkomst. De dynamiek van de DNA concentraties van deze bron vertoont gelijkenis met de waargenomen dynamiek van de zwemwaterparameters. De verhoogde concentraties van zowel de *E. coli* als de enterococci concentraties op 12 september vallen samen met hoge concentratie van de bron humaan. Voor deze locatie geldt dat de waargenomen hoge concentraties zwemwaterparameters en de bijbehorende bron voorkomen na het moment van flinke regenval in de omgeving. Op weerstation Hoek van Holland is op 9 september 58,5 mm neerslag gemeten, de hoogste neerslag hoeveelheid tijdens het gehele zwemseizoen van 2017.



FIGUUR 3.2. CONCENTRATIE VERLOOP VAN DIVERSE BACTERIËN OP DE DE LOCATIE DENHAAG KIJKDUIN. DE CONCENTRATIES *E. COLI* EN ENTEROCOCCEN ZIJN UITGEZET OP DE LINKER AS EN UITGEDRUKT IN KVE/100 ML. DE OVERIGE PARAMETERS ZIJN UITGEZET OP DE RECHTERAS EN UITGEDRUKT ALS DNA KOPIE AANTALLEN/ L.

3.5 Bronnen 2017 in relatie tot eerdere jaren

Het jaar 2017 is het vijfde jaar op rij dat op diverse locaties van RWS de DNA bronopsporing naar fecale verontreiniging plaats heeft gevonden.

In het jaar 2017 is de locatie Den Haag Kijkduin voor het eerst opgenomen in het monsternamprogramma. Daarnaast zijn ook de locaties Schardam, Warder en Edam bemonsterd, die in 2016 ook deel uitmaakten van het onderzoeksprogramma (zie tabel 3.1).

Op de locaties Warder en Schardam waren in het zwemseizoen geen overschrijdingen of hoge concentraties zwemwaterparameters gemeten. Dat was reden om dit seizoen niet nader te onderzoeken welke bronnen de zwemwaterkwaliteit negatief zouden kunnen beïnvloeden. De resultaten van 2017 voor Strandbad Edam bevestigen het beeld van 2016 dat mensen de voornaamste bron zijn van fecale verontreiniging op deze zwemwaterlocatie.

TABEL 3.1 OVERZICHT VAN DE VOORNAAMSTE BRONNEN ZOALS GEMETEN IN DE JAREN 2016 EN 2017 OP LOCATIES WAARVAN RWS DE WATERKWALITITSBEHEERDER IS. DE VETGEDRUKTE TEKST IN DE KOLOMMEN GEEFT AAN WELKE BRON ALS VOORNAAMSTE AANGEMERKT IS.

Locaties	Aangetoonde fecale verontreinigingsbronnen	
	2016	2017
Strand Edam	humaan , hond, vogel	humaan , herkauwers
Strand Schardam	vogel	-
Zwembad Warder	humaan, hond	-
Strandbad Kijkduin	-	humaan

4 Conclusies

In het zwemseizoen 2017 is op vier locaties waarvan RWS de waterkwaliteitsbeheerder is water verzameld om de herkomst van fecale verontreiniging met behulp van DNA methoden te onderzoeken. Van deze vier locaties zijn er twee (Warder + Schardam) niet nader onderzocht met de DNA bronopsporings methodiek. De locaties Edam + Kijkduin zijn onderzocht op het voorkomen van de bronnen humaan, paarden, hond en vogel, daarnaast is op de locatie Edam ook bepaald of herkauwers en/of varkens een bron zouden kunnen zijn.

4.1 Verloop onderzoek 2017

Het verloop van de DNA analyses is in alle monsters naar behoren geweest, de rendementen van de extracties en analyses was op orde en de daarmee gegenereerde data betrouwbaar. Voor de twee nader onderzochte locaties is aan te geven welke bronnen voorkomen. Op locaties waar geen overschrijdingen dan wel verhoogde concentraties van indicatororganismen gemeten zijn (Warder + Schardam), is dit jaar geen DNA analyse naar de bronopsporing uitgevoerd. In het jaar 2017 zijn in de 12 geanalyseerde monsters sporen van fecale verontreiniging met een humane herkomst (8 maal) het meest aangetoond, gevolgd door herkauwers (4 maal).

In de resultaten zijn per locatie de bronopsporingsdata naast de data van reguliere zwemwaterparameters geplaatst. Het beeld dat hieruit ontstaat is dat een humane bron op de twee onderzochte locaties (Edam + Kijkduin) primair verantwoordelijk lijkt voor de waargenomen overschrijdingen van de signaalwaarden van *E. coli* en enterococci. Op locatie Edam speelt mogelijk ook de aanwezigheid van fecale verontreiniging met een herkauwer herkomst een rol.

4.2 Van DNA bronopsporing naar maatregelen

Op de locatie Edam blijkt ook op basis van onderzoek uit 2016 dat de humane bron vrij constant aanwezig is. Op basis het zwemwaterprofiel is de aanwezigheid van een jachthaven en een overstort aan te merken als potentiële bron. Vanuit het achterland valt alleen bij hevige neerslag invloed te verwachten op de zwemwaterkwaliteit. Het gehanteerde peil in Edam (Schermerboezem, streefpeil -0,50 NAP, bovengrens -0,30 NAP, HHNK, 2014) is namelijk lager dan het peil van het Markermeer (zomerstreefpeil -0,20 NAP), er zal dus eerder water vanaf Markermeer naar Edam toestromen dan andersom (HHNK, 2014). De bronnen op de locatie zullen meer een plaatselijke herkomst hebben. Hierbij valt te denken aan de aanwezigheid van de uitstroom van de lokaal aanwezige "Kickersloot" (Zwemwaterprofiel Strandbad Edam, 2011). Deze loopt ook langs het op de locatie aanwezige grasland wat begraasd wordt met koeien. De aangetoonde merkers van herkauwers (in dit seizoen 2017) ondersteunen die gedachte. Op dezelfde sloot zou ook overstort water terecht komen (Zwemwaterprofiel Strandbad Edam, 2011). Maatregelen zouden zich kunnen richten op deze sloot, omleiden of afsluiten behoren dan tot de mogelijkheden.

De zwemwaterkwaliteit op de locatie Den Haag Kijkduin is in 2016 als "uitstekend" beoordeeld. In augustus 2016 is op deze locatie is echter wel een eenmalige onverklaarbare hoge waarde gemeten. Mede vanwege de grote recreatiebelangen op deze locatie is dit aanleiding geweest om in 2017 monsters te verzamelen voor DNA analyse. Uit de DNA analyse blijkt dat ten tijde van verhoogde concentraties *E. coli* en enterococci (12 september) alleen een bron van humane herkomst detecteerbaar is. Vanuit het zwemwaterprofiel (versie 2016) is lokaal geen humane bron aan te wijzen (strandtenten zijn

aangesloten op het riool), behalve eventueel zwemmers zelf. Rondom 12 september was de lokale temperatuur rond de 15° C. (KNMI, 2017), wat het onwaarschijnlijk maakt dat er op het moment van monsternamen grote hoeveelheden bezoekers waren. De mogelijke herkomst van humaan materiaal is dan beperkt tot de havens van Scheveningen en Rotterdam, waar zich overstorten bevinden. Mochten er op locatie Kijkduin nu vaker verhoogde concentraties *E. coli* en/of enterococci voorkomen, dan zou middels modelberekeningen van stromingspatronen en overleving van bacteriën beoordeeld kunnen worden of de havens daadwerkelijk een bron vormen. Dergelijke berekeningen zouden ondersteund kunnen worden met een studie waarbij de complete bacteriologische samenstelling van het water beoordeeld wordt (m.b.v. de DNA techniek NGS).

5 Referenties

- Europese Unie (2006). Richtlijn 2006/7/EG van het Europees parlement en de raad.
- Geerlings S. (2015). qPCR methoden voor het opsporen van paarden als bron van fecale verontreinigingen en eDNA van de kleine modderkruiper. Stage rapport 2015.
- Heijnen L., K. Learbuch, I. Leenen, S. Rotteveel, H. Ruiter, E. Kardinaal (2014). Fecale verontreiniging in zwemwater identificeren met DNA-merkers. H2O-Online (15 april 2014).
- Heijnen, L., K. Learbuch (2012). Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen *BTO rapport* BTO 2013.014.
- Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier (2014). Toelichting op het peilbesluit Schermerboezem & VRNK-boezem.
- Kardinaal E., L. Heijnen (2014). Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2014. Rapportnummer: KWR 2014.098, i.o.v. RWS.
- Kardinaal E., L. Heijnen (2015). Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2015. Rapportnummer: KWR 2015.079, i.o.v. RWS.
- Kardinaal E., L. Heijnen (2016). Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2016. Rapportnummer: KWR 2016. 118, i.o.v. RWS.
- KNMI (2017) <http://www.knmi.nl/nederland-nu/klimatologie/daggegevens>, geraadpleegd november 2017.
- Leenen, I., M. Maessen, L. Heijnen, E. Kardinaal (2013). Bronanalyse zwemwater m.b.v. dna-technieken: bepalen bijdrage van vogels, mensen en dieren aan de zwemwaterkwaliteit. Een overzicht van ervaringen en mogelijkheden om vogels te weren. Rapport Grontmij/KWR i.o.v. RWS.
- Rijkswaterstaat Zee & Delta (2016). Zwemwaterprofiel Den Haag Kijkduin. Actualisatie uitgevoerd door ARCADIS/H2Oké Water & gezondheid Advies in opdracht van Rijkswaterstaat WVL.
- Rijkswaterstaat IJsselmeergebied (2011). Zwemwaterprofiel Strandbad Edam. Actualisatie uitgevoerd door Grontmij / DHV in opdracht van Rijkswaterstaat Waterdienst.
- Stuurgroep Water (2013). Beslisnotitie werkwijze individuele metingen en meetfrequentie microbiologische parameters zwemwaterrichtlijn, vastgesteld in de op 14 maart 2013.

Bijlage I DNA methodiek

Isolatie van DNA

Voor de kwantificatie van de bronnen van fecale herkomst met qPCR is DNA geïsoleerd uit een aantal geselecteerde watermonsters. Het KWR protocol (LMB 069 DNA extractie) voor isolatie van DNA uit geconcentreerde watermonsters is toegepast. De PowerBiofilm Kit van de firma MoBio is gebruikt voor isolatie van DNA. De toegepaste methode is in meer detail beschreven in het onderzoek van 2012 (Heijnen *et al.* 2012). Bij deze procedure wordt er vóór het isolatieproces een bekende hoeveelheid IC-DNA (Interne controle) aan het monster toegevoegd. Hiermee kan eventuele inhibitie van de qPCR-reacties en de opbrengst van de DNA-isolatie procedure bepaald worden (zie paragraaf 2.5).

qPCR methoden

De polymerase ketting reactie (PCR) is een enzymatische reactie waarmee, onder invloed van nauwkeurig gecontroleerde temperatuurwisselingen (cycli), een kenmerkend DNA-fragment (merker) tot hoge aantallen wordt vermenigvuldigd. Met behulp van korte synthetische DNA-moleculen (primers) met een DNA-volgorde (sequentie) die zeer specifiek is voor een bepaald bacterietype kan in de PCR een DNA-fragment van dit bacterietype selectief worden vermenigvuldigd. Bij Real-time PCR wordt tijdens de reactie de vorming van deze kenmerkende DNA-fragmenten on-line gevolgd. De gevormde fragmenten worden gedetecteerd met een synthetische DNA-probe die gelabeld is met een fluorescente kleurstof. Het aantal cycli waarbij het DNA-sigitaal boven de detectiegrens uitkomt ("quantification cycle" of Cq-waarde) is een maat voor de DNA-concentratie in het monster. De Cq-waarden van de referentiemonsters worden gebruikt voor berekening van een ijklijn. Deze ijklijn vormt vervolgens de basis voor het kwantificeren van de verschillende merkers in de monsters. In dit onderzoek is gebruik gemaakt van het KWR protocol LMB 065 qPCR.

Voor het detecteren van fecale verontreiniging van mensen, herkauwers en paarden is gebruik gemaakt van een merker waarmee een kenmerkend fragment van *Bacteroides* bacteriën wordt aangetoond. De methoden zijn eerder beschreven in Leenen *et al.* (2013), Heijnen *et al.* (2013) en Geerlings (2015). Onder de verzamelmethode "herkauwers" vallen de diergroepen runderen, schapen, reeën en herten. De analyses zijn uitgevoerd volgens de KWR protocollen LMB 065 (qPCR) met bijlage 12 (algemeen *Bacteroides*), bijlage 13 (humaan *Bacteroides*) en bijlage 14 (herkauwer *Bacteroides*). Voor paarden (*Bacteroides*) is de methode gevolgd zoals beschreven in Geerlings (2015).

Voor het detecteren van fecale verontreinigingen van vogels is gebruik gemaakt van een merker waarmee een kenmerkend fragment van *Helicobacter* bacteriën wordt aangetoond (GFD-merker (Heijnen en Learbuch, 2012). De analyses zijn uitgevoerd volgens de KWR protocollen LMB 068 (qPCR analyse met Sybergreen) met bijlage 10 (vogel *Helicobacter*).

Voor het detecteren van fecale verontreiniging van honden is gebruik gemaakt van een merker waarmee een kenmerkend fragment van het (mitochondriaal)DNA van honden wordt aangetoond. De methode is eerder beschreven in de RWS rapportage (KWR 2014.005) door Heijnen *et al.* (2013). De analyses zijn uitgevoerd volgens de KWR protocollen LMB 065 (qPCR) met bijlage 25 (honden).

Kwaliteitscontrole

Het rendement van de DNA-isolatie en de eventuele aanwezigheid van remmende stoffen (bijvoorbeeld humuszuren of spore-elementen) in het DNA van de monsters is bepaald door aan elk monster een interne controle (IC) toe te voegen en hiervan de opbrengst te bepalen. Het IC-DNA bestaat uit een suspensie met een bekende hoeveelheid plasmide-DNA. Dit plasmide-DNA bevat een uniek DNA-fragment wat niet aanwezig is in watermonsters. Voor detectie van dit unieke fragment zijn primers en een probe ontworpen. Met deze primers en

probe is het mogelijk om het unieke DNA-fragment te amplificeren en kwantitatief te detecteren. Door dit plasmide-DNA aan elk monster toe te voegen en de concentratie ervan (na extractie van DNA) te bepalen en te vergelijken met eenzelfde hoeveelheid plasmide-DNA dat geen extractiestap heeft ondergaan is het mogelijk om de opbrengst van de isolatie-procedure te bepalen en een indruk te krijgen van de eventuele aanwezigheid van stoffen die de PCR-reactie remmen. De, met het IC-DNA, gemeten opbrengst van de isolatie-procedure is gebruikt om de meetwaarden voor elk individueel monster te corrigeren voor verlies van DNA t.g.v. de extractiemethode.

Bijlage II Resultaten 2017

Resultaten bronopsporing 2017 en zwemwaterparameters.

Betekenis kleuren in onderstaande tabel.

R (%)
Rendement van DNA extractie tussen 10 en 20%
Bronnen van fecale verontreiniging
Positieve concentratie DNA kopie aantallen / L
DNA kopie aantallen beneden detectiegrens
<i>E. coli</i> + enterococcen
Concentratie hoger dan signaalwaarden (1800 resp. 400 kve / 100 ml)
Concentratie verhoogd (tussen helft signaalwaarden en signaalwaarden)
Concentratie lager dan de helft van de signaalwaarden (900 resp. 200 kve / 100 ml)

Datum Monstername	Code Opdrachtgever	Filtratie volume (ml)	Rendement (%)	DNA kopie aantallen / L						KVE / 100 ml		
				Humaan Bacteroides	Herkauwer Bacteroides	Hond	Vogel	Paard	Varken	E. Coli	intestinale enterococci	
23-5-2017	Den Haag, Kijkduin	50	8,5	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	61	15	
15-8-2017	Den Haag, Kijkduin	50	59,5	6,4E+03	< 3,4E+03	< 3,4E+03	< 1,7E+04	< 3,4E+03	< 1,7E+04	<	15	15
12-9-2017	Den Haag, Kijkduin	50	57,1	2,2E+04	< 3,5E+03	< 3,5E+03	< 1,8E+04	< 3,5E+03	< 1,8E+04	504	393	
18-4-2017	Strandbad Edam	50	7,0	R te laag	1,9E+04	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	332	30	
30-5-2017	Strandbad Edam	50	63,1	5,9E+03	9,1E+03	< 3,2E+03	< 1,6E+04	< 3,2E+03	< 1,6E+04	77	46	
26-6-2017	Strandbad Edam	50	41,1	3,1E+04	< 4,9E+03	< 4,9E+03	< 2,4E+04	< 4,9E+03	< 2,4E+04	12687	4277	
30-6-2017	Strandbad Edam (herbemonstering)	50	46,4	4,2E+05	< 4,3E+03	< 4,3E+03	< 2,2E+04	< 4,3E+03	< 2,2E+04	179	77	
11-7-2017	Strandbad Edam	50	54,7	2,0E+04	< 3,7E+03	< 3,7E+03	< 1,8E+04	< 3,7E+03	< 1,8E+04	347	93	
25-7-2017	Strandbad Edam	50	50,8	8,1E+03	5,0E+05	< 3,9E+03	< 2,0E+04	< 3,9E+03	< 2,0E+04	2322	393	
28-7-2017	Strandbad Edam (herbemonstering)	50	60,5	< 3,3E+03	< 3,3E+03	< 3,3E+03	< 1,7E+04	< 3,3E+03	< 1,7E+04	94	30	
21-8-2017	Strandbad Edam	50	47,4	6,0E+04	< 4,2E+03	< 4,2E+03	< 2,1E+04	< 4,2E+03	< 2,1E+04	127	30	
19-9-2017	Strandbad Edam	50	51,3	< 3,9E+03	1,2E+05	< 3,9E+03	< 2,0E+04	< 3,9E+03	< 2,0E+04	393	45	
20-4-2017	Blanco	50	6,1	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	nvt	nvt	
26-5-2017	Blanco	50	6,6	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	nvt	nvt	
1-6-2017	Blanco	50	58,0	< 3,4E+03	< 3,4E+03	< 3,4E+03	< 1,7E+04	< 3,4E+03	< 1,7E+04	nvt	nvt	
3-7-2017	Blanco	50	33,6	< 5,9E+03	< 5,9E+03	< 5,9E+03	< 3,0E+04	< 5,9E+03	< 3,0E+04	nvt	nvt	
13-7-2017	Blanco	50	49,3	< 4,1E+03	< 4,1E+03	< 4,1E+03	< 2,0E+04	< 4,1E+03	< 2,0E+04	nvt	nvt	
26-7-2017	Blanco	50	45,1	< 4,4E+03	< 4,4E+03	< 4,4E+03	< 2,2E+04	< 4,4E+03	< 2,2E+04	nvt	nvt	
28-7-2017	Blanco	50	44,7	< 4,5E+03	< 4,5E+03	< 4,5E+03	< 2,2E+04	< 4,5E+03	< 2,2E+04	nvt	nvt	
17-8-2017	Blanco	50	50,5	< 4,0E+03	< 4,0E+03	< 4,0E+03	< 2,0E+04	< 4,0E+03	< 2,0E+04	nvt	nvt	
23-8-2017	Blanco	50	50,0	< 4,0E+03	< 4,0E+03	< 4,0E+03	< 2,0E+04	< 4,0E+03	< 2,0E+04	nvt	nvt	
14-9-2017	Blanco	50	39,6	< 5,0E+03	< 5,0E+03	< 5,0E+03	< 2,5E+04	< 5,0E+03	< 2,5E+04	nvt	nvt	
21-9-2017	Blanco	50	45,7	< 4,4E+03	< 4,4E+03	< 4,4E+03	< 2,2E+04	< 4,4E+03	< 2,2E+04	nvt	nvt	