

Rapport

DNA bronopsporing in de recreatiehaven Wijdenes 2021

KWR 2021.107

Datum

13 december 2021

Opdrachtgever

SED

Meer informatie

dr.ir. M.J.M. Hootsmans
T 0622951843

Auteur(s)

M.J.M. Hootsmans

Opdrachtnummer

403852

E michiel.hootsmans@kwrwater.nl

Kwaliteitsborger(s)

L. Heijnen (gedelegeerd namens G.
Medema)

Projectmanager

M.J.M. Hootsmans

Pagina

1/8

Inhoud

1	Inleiding	3
2	Methode en aanpak	4
2.1	Verzamelen van watermonsters	4
2.2	Filtratie	4
2.3	Keuze van te analyseren monsters	4
2.4	Interpretatie van de analyse resultaten	4
2.5	DNA analyse	5
3	Resultaten en discussie	6
3.1	De opbrengst van de inhibitie en rendementscontrole	6
3.2	Resultaten DNA analyse en kweek	6
3.2.1	Recreatiehaven Wijdenes	6
4	Conclusies	8
5	Referenties	8

1 Inleiding

Voor een waterbeheerder is het van belang om de belangrijkste bronnen die bijdragen aan de overschrijdingen in concentraties *E. coli* en intestinale enterococci in beeld te krijgen. Deze indicatorbacteriën komen algemeen voor in darmen van warmbloedige dieren en de concentratie van deze bacteriën in oppervlaktewater geeft daarom een indruk van de concentratie fecaal materiaal in het water en daarmee van de potentiële aanwezigheid van ziekteverwekkende micro-organismen, zoals virussen en bacteriën.

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

Met de resultaten van de DNA analyse in de hand kan de (water)beheerder gericht maatregelen nemen. Deze zijn erop gericht om de invloed van aangetoonde bronnen te minimaliseren en zo de (zwem)waterkwaliteit te verbeteren dan wel te garanderen.

De gemeentelijke uitvoeringsorganisatie SED is voor de gemeente Drechterland al meerdere jaren bezig met het formaliseren van een aantal zwemlocaties langs de Markermeerkust. Eén van de beoogde locaties is recreatiehaven Wijdenes. Voor deze locatie is in 2018 een voorlopig zwemwaterprofiel opgesteld. Deze is echter nog niet definitief geworden, want de waterkwaliteit voldeed niet aan de vereisten voor een officiële zwemlocatie. Met betrokken partijen is door SED afgesproken om in 2018 nog een extra jaar te meten aan de zwemwater kwaliteitsparameters. De hoop was dat de eerder behaalde 'matige' resultaten toch incidenten zouden zijn. Niettemin gaven ook de metingen in 2018 slechte resultaten. In 2021 heeft men daarom opnieuw metingen laten uitvoeren gedurende het zwemseizoen.

Het doel van dit DNA-onderzoek is om te achterhalen wat in 2021 de voornaamste bron van fecale verontreiniging is die bijdraagt aan eventuele overschrijdingen van de fecale parameters *E. coli* en intestinale enterococci gedurende het zwemwaterseizoen in de recreatiehaven Wijdenes

2 Methode en aanpak

2.1 Verzamelen van watermonsters

Op de onderzochte zwemwaterlocatie is tijdens de reguliere bemonstering in het zwemseizoen 2021 voor de bepaling van indicator bacteriën (*E. coli* en intestinale enterococcen) steeds ook extra water verzameld voor de DNA bronanalyse. Dit gebeurde door het hiervoor door SED ingeschakelde laboratorium Intertek. In totaal ging het om 12 monsterdatums voor de bovengenoemde locatie. Alle monsters voor de latere DNA analyse zijn binnen 48 uur afgeleverd bij het laboratorium van Intertek. De filtratie en aansluitende conservering vond plaats volgens de hiervoor door KWR gehanteerde en met Intertek gedeelde procedure. Om een goede vergelijking van DNA-resultaten met kweekgegevens van *E. coli* en intestinale enterococcen mogelijk te maken, heeft Intertek parallel aan de watermonsters voor DNA analyse ook monsters verzameld en geanalyseerd op deze zwemwaterparameters. Deze gegevens zijn door SED aan KWR aangeleverd.

2.2 Filtratie

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

Gedurende de monsternamencampagne zijn de filters ingevroren in lysis buffer totdat de verdere DNA analyses plaatsvonden.

2.3 Keuze van te analyseren monsters

Uit de per locatie beschikbare watermonsters zijn er steeds drie gekozen voor de DNA analyse. Deze keuze is in overleg met SED gemaakt en met name bepaald door de resultaten van de analyses voor fecale indicatorbacteriën (zowel *E. coli* als de intestinale enterococcen) zoals die gedurende het zwemseizoen verkregen werden met de MPN-methode (hierna uitgedrukt als kolonievormende eenheden (kve) per 100 ml). Bij de selectie van de drie te analyseren monsters is gezocht naar twee datums met verhoogde waarden van fecale indicatoren, en één datum met lage waarden (als referentie voor de waarden van de DNA merkers bij lage bacteriewaarden).

2.4 Interpretatie van de analyse resultaten

Bij de vergelijking van DNA merker resultaten voor een monster met lage concentratie en een monster met hoge concentratie fecale indicatorbacteriën is de verwachting dat de concentratie DNA merkers in het monster met hoge concentratie informatie geeft over de verontreinigingsbron(nen) die op dat moment verantwoordelijk is voor de

verhoogde concentratie fecale indicatorbacteriën. Deze verwachting gaat uit van een goede relatie tussen de concentratie van DNA merkers en de concentratie fecale indicatororganismen. Door verschillende omstandigheden kan deze relatie niet in alle gevallen goed zijn:

- Door het toepassen van verschillende detectietechnieken (qPCR/kweek) kunnen er verschillen optreden. Met de kweek zullen alleen de indicatororganismen, die in staat zijn tot vermeerdering in een selectief kweekmedium, worden gedetecteerd terwijl met qPCR DNA wordt aangetoond. Dit betekent dat DNA-merkers over een langere periode in water detecteerbaar kunnen zijn dan kweekbare indicatorbacteriën.
- Van *E. coli* en enterococci is bekend dat er situaties zijn waarbij deze ook in het milieu kunnen overleven en vermeerderen zodat deze niet altijd een goede indicatie zijn voor de aanwezigheid van fecaal materiaal (en dus van mogelijke ziekteverwekkers).
- De gemiddelde concentraties DNA-merkers en fecale indicatororganismen zijn hoog in feces waarbij de concentratie DNA merkers gemiddeld hoger zijn dan de concentratie indicatororganismen. Er zijn echter grote variaties in de concentraties van beide parameters in individuele fecesmonsters mogelijk (Heijnen, 2015).

Door bovenstaande punten kunnen er situaties optreden waarin geen fecale indicatororganismen worden aangetoond en wel DNA merkers; en soms ook omgekeerd. Deze situaties worden vooral waargenomen in monsters met verhoogde concentraties fecale indicatorbacteriën waarbij de signaalwaarden voor overschrijding van het acute risico niet worden overschreden. Hoewel door deze verschillen niet altijd een directe relatie kan worden gelegd tussen de concentraties indicatorbacteriën en de concentratie DNA merkers geven de metingen van DNA merkers ook in deze situaties inzicht in de herkomst van fecale verontreinigingen op de bemeeten locatie.

2.5 DNA analyse

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

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

De kwaliteitscontrole bevat drie onderdelen:

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

3 Resultaten en discussie

3.1 De opbrengst van de inhibitie en rendementscontrole

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

De rendementen van de DNA-extracties (zie de tabellen per locatie) bleken voor alle geanalyseerde monsters + de blanco's goed (rendement van 20% of hoger). Deze uitkomst geeft aan dat de watermonsters afkomstig van deze zwemwaterlocaties zich goed lieten behandelen. In geen van de blanco monsters werden DNA merkers aangetroffen, zodat er naar alle waarschijnlijkheid geen kruisbesmettingen tussen monsters zijn opgetreden.

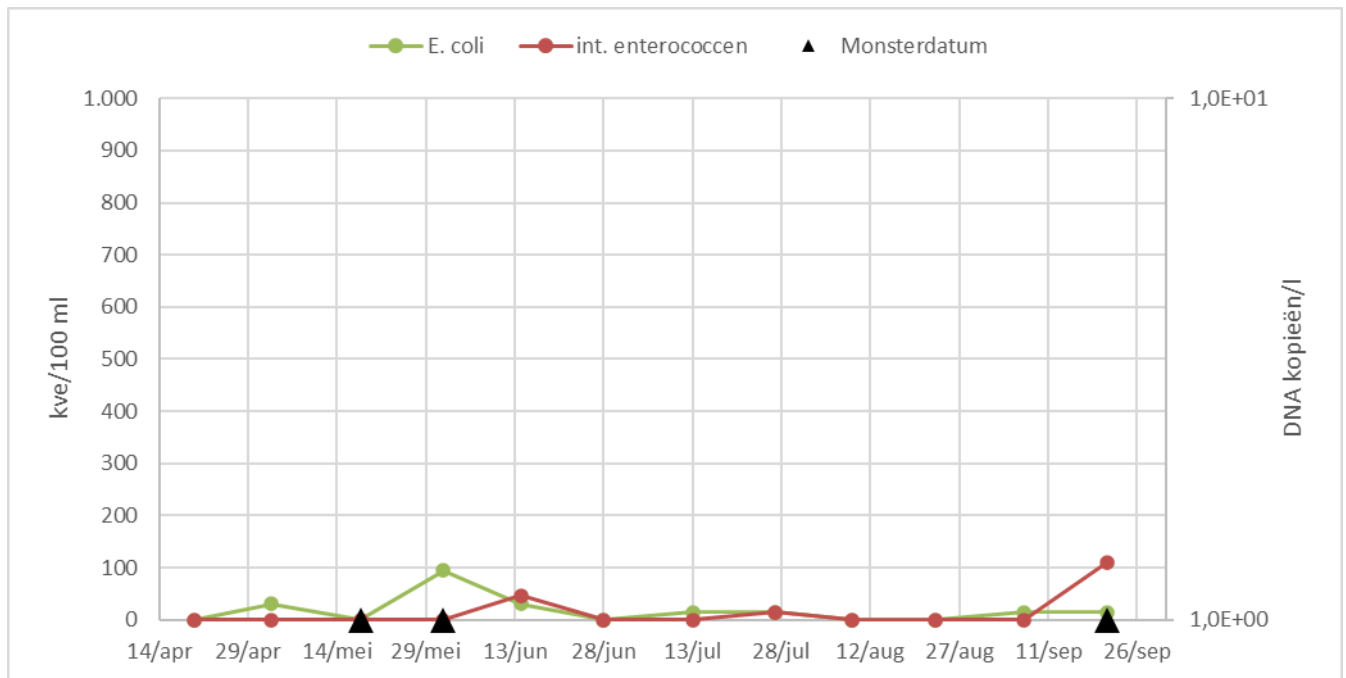
3.2 Resultaten DNA analyse en kweek

3.2.1 Recreatiehaven Wijdenes

In onderstaande Tabel 1 zijn de DNA concentraties van de onderzochte bronnen van fecale herkomst aangegeven voor de locatie Wijdenes. In geen van de veldmonsters werden signalen voor DNA merkers gedetecteerd.

Tabel 1. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor de drie onderzochte veldmonsters van de recreatiehaven Wijdenes en bijbehorende blanco's. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens.

monster code	datum / volume	omschrijving	rendement (%)	DNA kopieën/l			
				mens	hond	paard	vogel
LMB-131294-UW	18 mei 100 ml	recreatiehaven Wijdenes	51,4	<1,9E+03	<1,9E+03	<1,9E+03	<9,7E+03
LMB-131295-OW	100 ml	Blanco	47,1	<2,1E+03	<2,1E+03	<2,1E+03	<1,1E+04
LMB-131298-UW	1 juni 100 ml	recreatiehaven Wijdenes	47,4	<2,1E+03	<2,1E+03	<2,1E+03	<1,1E+04
LMB-131299-OW	100 ml	Blanco	53,6	<1,9E+03	<1,9E+03	<1,9E+03	<9,3E+03
LMB-131320-UW	21 sep 100 ml	recreatiehaven Wijdenes	33,4	<3,0E+03	<3,0E+03	<3,0E+03	<1,5E+04
LMB-131321-OW	100 ml	Blanco	35,3	<2,8E+03	<2,8E+03	<2,8E+03	<1,4E+04



Figuur 1. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci op de locatie recreatiehaven Wijdenes in 2021. *E. coli* en intestinale enterococci zijn uitgedrukt in een lineaire schaal in kve (kolonievormende eenheden) per 100 ml; de DNA-merkers zijn uitgedrukt op een loglineaire schaal in DNA-kopie aantallen / l. De drie datums met DNA analyses zijn weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as.

In Figuur 1 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococci gedurende het zwemseizoen 2021 op deze locatie. Conform de Europese zwemwaterrichtlijn is voor de zwemwaterkwaliteitsklasse 'goed' de bovengrenswaarde voor *E. coli* 1000 kve/100 ml, voor intestinale enterococci is dit 400 kve/100 ml. In Nederland wordt de grens van 1800 kolonievormende eenheden (kve)/100 ml met betrekking tot *E. coli* aangehouden als signaalwaarde voor overschrijding van het acute risico (Stuurgroep Water, 2013). Voor intestinale enterococci ligt die grens bij 400 kve /100 ml.

De metingen voor *E. coli* en intestinale enterococci zijn het hele seizoen laag en blijven ook ruim onder de signaalwaarde.

Op basis van deze resultaten kunnen dus geen mogelijke fecale bronnen worden aangewezen. De gegevens wijzen uit dat er ook geen achtergrondwaarden voor DNA merkers voor de onderzochte fecale bronnen zijn waar te nemen.

4 Conclusies

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

De gegevens wijzen uit dat er geen waarden voor DNA merkers voor de onderzochte fecale bronnen zijn waar te nemen. De bacteriële waterkwaliteit op de locatie recreatiehaven Wijdenes was in 2021 uitstekend te noemen.

Het is aan te bevelen om in 2022, als opnieuw zou worden gevolgd hoe indicator bacteriën voor zwemwaterkwaliteit zich ontwikkelen, parallel aan deze bemonstering ook watermonsters te filteren en te conserveren voor een eventuele latere bepaling van DNA merkers voor fecale bronnen. Op die manier heeft de beheerder in ieder geval de mogelijkheid om deze monsters te inspecteren indien er alsnog (te) hoge bacteriewaarden zouden optreden op de beoogde zwemwaterlocatie.

5 Referenties

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

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

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

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

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

Jaar van publicatie
2021

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

Groninghaven 7
Postbus 1072
3430 BB Nieuwegein

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

KWR 2021.107 | 13 december 2021 ©KWR

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

Keywords

fecale verontreiniging, DNA bronopsporing,
zwemwater