

Rapport

DNA bronopsporing voor RWS op zes zwemwaterlocaties in 2022

KWR 2022.115

Datum

19 december 2022

Opdrachtgever

RWS-WVL

Meer informatie

dr.ir. M.J.M. Hootsmans

T 0622951843

Auteur(s)

M.J.M. Hootsmans

Opdrachtnummer

404165

E michiel.hootsmans@kwrwater.nl

Kwaliteitsborger(s)

L. Heijnen (gedelegeerd namens G. Medema)

Projectmanager

M.J.M. Hootsmans

Pagina

1/17

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 analyseresultaten	5
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	De Oude Pol	6
3.2.2	Strandbad Edam	9
3.2.3	't Kleine Zeetje	10
3.2.4	Wijksche Waard	11
3.2.5	Scheveningen Zwarte Pad	13
3.2.6	Monster Ter Heijde	14
4	Conclusies	16
5	Referenties	16

1 Inleiding

In het beheergebied van RWS liggen diverse zwemwaterlocaties. De zwemwaterkwaliteit van deze locaties valt niet altijd in de categorie 'uitstekend' of 'goed'. 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.

Voor de waterbeheerder is het van belang om de belangrijkste bronnen in beeld te krijgen die bijdragen aan de overschrijdingen van bovengrens- of signaalwaarden in concentraties *E. coli* en intestinale enterococci. Deze indicatorbacteriën komen algemeen voor in darmen van warmbloedige dieren. 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 bijdraagt aan de verminderde (zwem)waterkwaliteit is op basis van alleen de indicator bacteriën (*E. coli* en intestinale enterococci) niet te achterhalen. Met specifieke DNA-methoden is echter wel onderscheid te maken tussen diergroepspecifieke bacteriën met een fecale herkomst en kan DNA uit dierlijke cellen worden getypeerd waarvan in de feces hoge concentraties aanwezig zijn (Heijnen & Learbuch 2013, Heijnen et al. 2014, Becker et al. 2017). Zo kunnen dergelijke bacteriën of dierlijke cellen gedetecteerd en gekwantificeerd worden. De diergroepen die momenteel in het laboratorium van KWR met zulke 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.

De potentiële bronnen van fecale verontreiniging op een officiële zwemwaterlocatie zijn beschreven in zogenaamde zwemwaterprofielen. Met de resultaten van de DNA analyse in de hand kan de (water)beheerder meer gericht maatregelen nemen. Deze proberen de invloed van aangetoonde bronnen te minimaliseren en zo de (zwem)waterkwaliteit te verbeteren dan wel te garanderen. Het doel van het in dit rapport beschreven DNA-onderzoek is om te achterhalen of de in 2022 met DNA merkers onderzochte diergroepen op zes zwemwaterlocaties inderdaad hebben bijgedragen aan overschrijdingen van de fecale parameters *E. coli* en intestinale enterococci gedurende het zwemwaterseizoen. Het gaat om vier zwemwaterlocaties gelegen in zoetwater (De Oude Pol, Strandbad Edam, 't Kleine Zeetje en Wijksche Waard), en twee zwemwaterlocaties in zee water (Monster Ter Heijde en Scheveningen Zwarte Pad).

2 Methode en aanpak

2.1 Verzamelen van watermonsters

Op de onderzochte zwemwaterlocaties is tijdens de reguliere bemonstering in het zwemseizoen 2022 voor de bepaling van indicator bacteriën (*E. coli* en intestinale enterococcen) steeds ook extra water verzameld voor de DNA merkeranalyse. In totaal ging het om 4-14 monsterdatums voor de bovengenoemde locaties (inclusief eventuele herhalingsmonsterdatums). Alle geanalyseerde monsters zijn binnen 48 uur afgeleverd bij de voor de filtratie en conservering door KWR ingeschakelde laboratoria (KWR zelf voor Wijksche Waard, voor de overige locaties was dit 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, hebben de hiervoor door RWS-WVL ingeschakelde laboratoria Intertek en Eurofins Omegam parallel aan de watermonsters voor DNA analyse ook monsters verzameld en geanalyseerd op deze zwemwaterparameters. Deze gegevens zijn door RWS-WVL 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 poriegrootte 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 monsternamercampagne 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 een tot vier gekozen voor de DNA analyse. Deze keuze is in overleg met RWS-WVL gemaakt en is 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 te analyseren monsters is in principe gekozen voor tenminste één datum met verhoogde waarden van fecale indicatoren, en één datum met lage waarden (als referentie voor de waarden van de DNA merkers bij lage bacteriewaarden). Om reden van kostenbesparing is door RWS-WVL besloten om in 2022 voor een aantal locaties geen referentie monster te bewerken, maar gebruik te maken van DNA merker referentiegegevens uit meetcampagnes van eerdere jaren. Dit betekent dat voor de betreffende locaties niet is uit te sluiten dat in 2022 mogelijk andere DNA merker referentiewaarden zouden kunnen zijn opgetreden. Het gaat om de locaties

Strandbad Edam (referentie uit 2019 en 2020), 't Kleine Zeetje (referentie uit 2020), Monster Ter Heijde en Scheveningen Zwarte Pad. Voor de laatste twee onderzochte badstranden in de regio Den Haag is door RWS-WVL in overleg met KWR besloten om de referentie waarde van locatie Scheveningen Zwarte Pad uit 2021 als referentie voor beide locaties te gebruiken.

2.4 Interpretatie van de analyseresultaten

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 soms minder 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; daarbij is de concentratie DNA merkers gemiddeld hoger 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 op verzoek van RWS-WVL voor de locaties De Oude Pol, Strandbad Edam, 't Kleine Zeetje en Wijksche Waard gebruik gemaakt van de DNA merkers gericht op de detectie van mens, hond, herkauwer en vogel. Voor de twee kustlocaties zijn eveneens de merkers voor mens, hond en vogel gebruikt, maar is de merker herkauwer vervangen door de merker voor paard.

Voor het bepalen van het voorkomen van DNA indicatief voor mens, hond, herkauwer en paard is gebruik gemaakt van groepspecifieke bacteriën uit de bacteriegroep *Bacteroides*. Voor het opsporen van verontreinigingen van vogels is gebruik gemaakt van de in hoge concentraties 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.

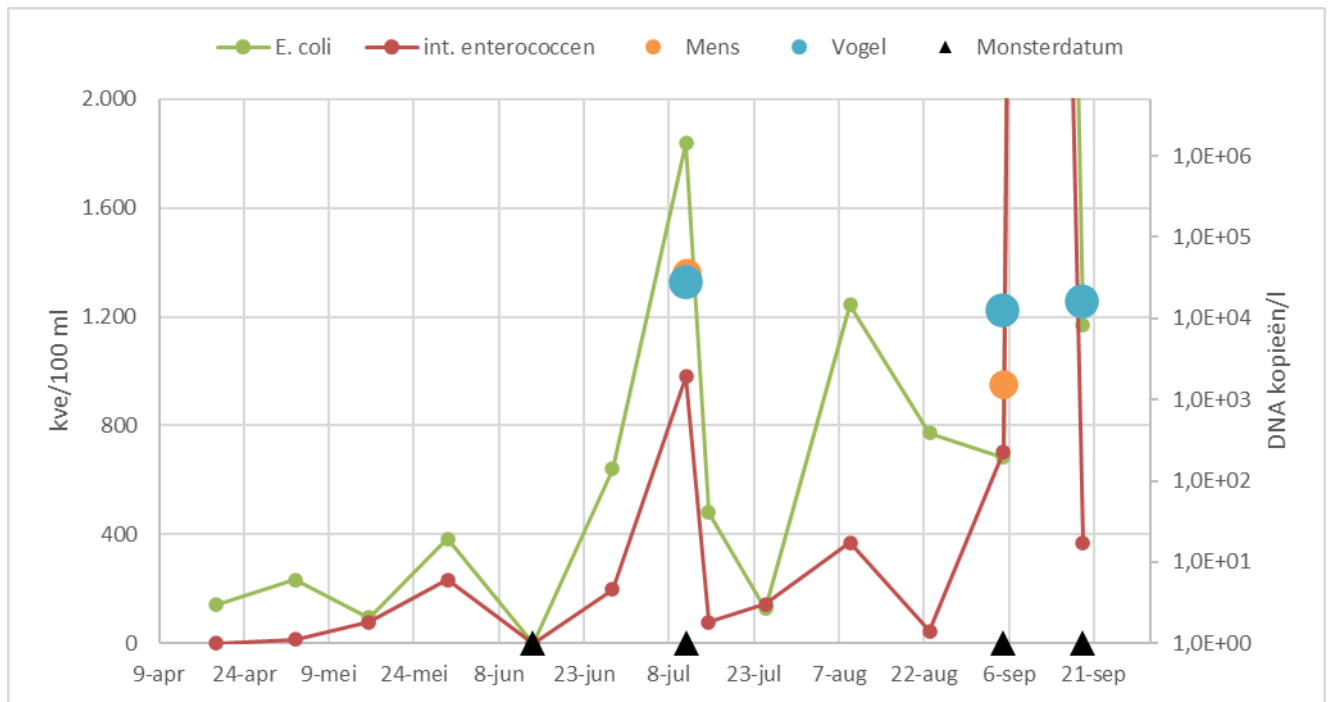
De rendementen van de DNA-extracties (zie de tabellen per locatie) bleken voor alle geanalyseerde monsters en de blanco's goed (rendement minimaal 38%, en gemiddeld 49%). Deze uitkomst geeft aan dat de watermonsters afkomstig van deze zwemwaterlocaties zich goed lieten behandelen. In geen van de blanco monsters werden DNA merkers aangetroffen, zodat er naar alle waarschijnlijkheid geen kruisbesmettingen zijn opgetreden.

3.2 Resultaten DNA analyse en kweek

3.2.1 De Oude Pol

De zwemwaterlocatie Oude Pol heeft al meerdere jaren geen goede zwemwaterkwaliteit. Bij de Oude Pol is het vermoeden dat de Bijsselsche beek een belangrijke aanvoer van verontreinigingen is. Dit jaar zijn daarom weer extra monsters genomen op de locatie waar de Bijsselsche beek uitmondt in het Veluwemeer nabij zwemlocatie de Oude Pol. De volledige naam van de nu onderzochte locatie is De Oude Pol Extra meetpunt B, Bijsselsche beek (OUDPL3).

In Figuur 1 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococcon gedurende het zwemseizoen 2022 op deze locatie. Ook de resultaten voor de op de vier geanalyseerde datums vastgestelde DNA waarden voor de fecale merkers voor mensen en vogels worden hier weergegeven. De meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococcon vertonen gedurende het seizoen diverse verhoogde waarden. De signaalwaarde voor *E. coli* wordt op 11 juli en met name op 9 september overschreden. Voor intestinale enterococcon is dat ook het geval op 11 juli, en op 5 en 9 september. Helaas is voor het (herhaal)monster op 9 september alleen een bacteriemonster verzameld en geen DNA monster.



Figuur 1. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci op de locatie De Oude Pol meetpunt B in 2022 en de op vier momenten vastgestelde DNA-resultaten van fecale merkers. *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 vier datums met DNA analyses zijn weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as. Op 9 september is de waarde voor *E. coli* 11636 kve/100ml en voor intestinale enterococci 9826 kve/100ml.

In Tabel 1 zijn de DNA concentraties van de onderzochte merkers van fecale herkomst aangegeven voor deze locatie. De hoge waarden op 11 juli en 5 september corresponderen met een signaal voor mensen en vogels; op 19 september worden merkers voor vogels gevonden. Overigens kan een verschil in concentraties tussen verschillende DNA merkers op een bepaalde datum of tussen datums niet worden geïnterpreteerd als een verschil in relatieve bijdrage van de betreffende bronnen op dat moment. Daarvoor verschillen de correlaties tussen individuele DNA merkers en de fecale indicator bacteriën in feces teveel (Heijnen, 2015). Er kan alleen worden vastgesteld dat verschillende bronnen op deze locatie een bijdrage leveren. In het in 2022 als referentie gekozen monster werden geen van de gebruikte merkers aangetroffen, net als in 2019 (Hootsmans, 2019).

Tabel 1. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor de vier onderzochte veldmonsters van de locatie De Oude Pol meetpunt B en bijbehorende blanco's. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens. NA=niet geanalyseerd

monster code	datum / volume	omschrijving	rendement (%)	DNA kopieën/l			
				mens	hond	vogel	herkauwer
LMB-154881-OW	14 juni 100 ml	De Oude Pol meetpunt B	41,1	<1,8E+03	<1,8E+03	<9,1E+03	<1,8E+03
LMB-154880-UW	100 ml	Blanco	48,3	<1,6E+03	<1,6E+03	<7,8E+03	<1,6E+03
LMB-154883-OW	11 juli 100 ml	De Oude Pol meetpunt B	56,0	3,6E+04	<1,3E+03	2,7E+04	<1,3E+03
LMB-154882-UW	100 ml	Blanco	48,4	<1,6E+03	<1,6E+03	<7,8E+03	<1,6E+03
LMB-154890-OW	5 sep 100 ml	De Oude Pol meetpunt B	50,5	1,6E+03	<1,5E+03	1,2E+04	<1,5E+03
LMB-154889-UW	100 ml	Blanco	38,1	<2,0E+03	<2,0E+03	<9,8E+03	<2,0E+03
LMB-155796-OW	19 sep 100 ml	De Oude Pol meetpunt B	49,9	<1,5E+03	<1,5E+03	1,6E+04	<1,5E+03
LMB-154891-UW	100 ml	Blanco	39,9	<1,9E+03	<2,4E+03	<9,4E+03	<1,9E+03

De in 2022 verzamelde DNA gegevens wijzen op mensen en vogels als bronnen bij De Oude Pol meetpunt B. Het brononderzoek in 2021 (Hootsmans, 2021) detecteerde daarnaast ook herkauwers als bron, hetgeen voor één meetmoment kon worden gerelateerd aan een forse hoeveelheid neerslag in de periode direct voorafgaand aan de betreffende meting. Daarmee kan toen oppervlakkige afstroming van mest naar de Bijsselsche beek hebben geleid tot inspoeling van de merker en feces van herkauwers. Of de nu en in andere jaren aangetoonde vogelmerker duidt op een bron in de directe omgeving van het meetpunt (vogels op het strand bijvoorbeeld) of op aanvoer vanuit het achterland via de Bijsselsche beek, is op basis van deze gegevens niet te zeggen.

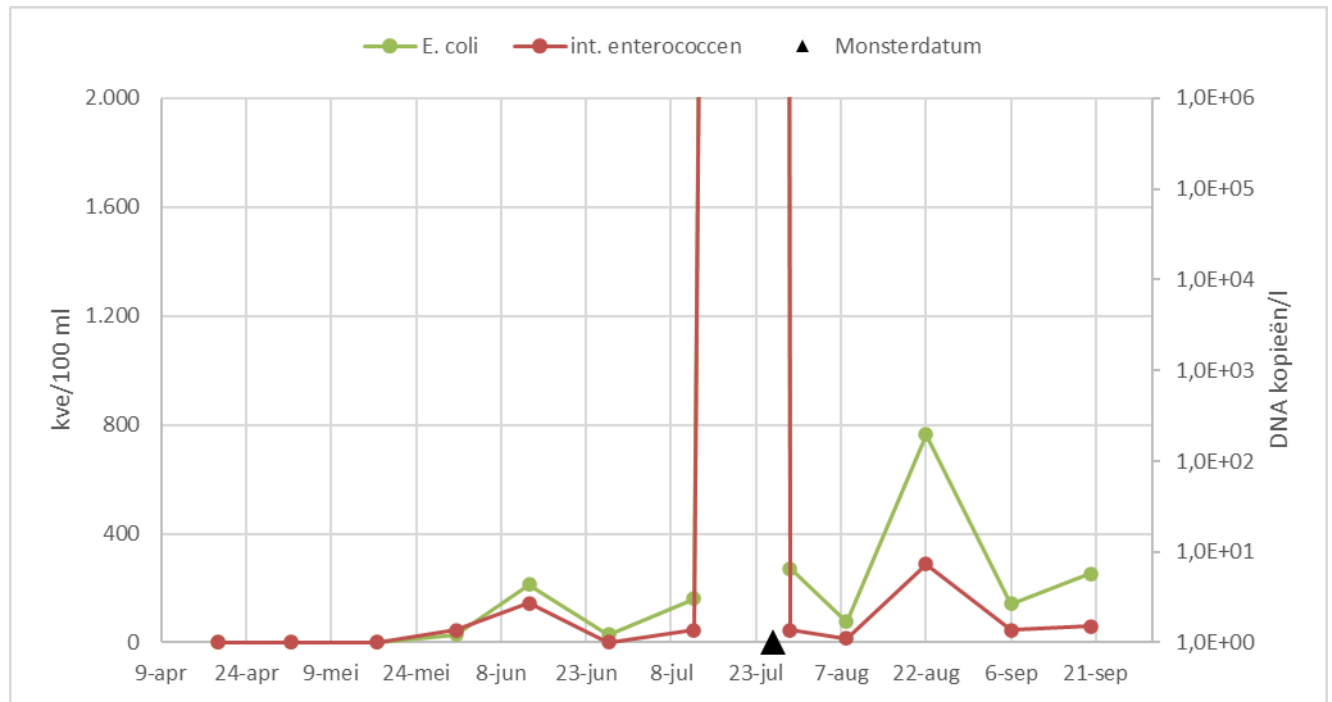
Bij eerder onderzoek met DNA merkers werden voor dezelfde locatie mens en vogel als regelmatig voorkomende bron aangewezen; in 2015, en 2016 kwam ook herkauwer voor (zie Tabel 2; Kardinaal & Heijnen, 2014, 2015, 2016). In 2019 kon geen voornaamste bron worden aangeduid (Hootsmans, 2019). Mensen lijken wel een constante factor van verontreiniging te vormen. Andere verontreinigers vormen additionele, variabele, bronnen. Het zwemwaterprofiel voor de eigenlijke zwemwaterlocatie De Oude Pol (RWS MN, 2020a) wijst als mogelijke bronnen eveneens op mensen, herkauwers en vogels, en incidenteel honden.

Tabel 2. Overzicht van de DNA merkers zoals vastgesteld in de periode 2014 t/m 2016, 2019, 2021 en 2022 op locatie Oude Pol extra meetpunt B Bijsselse beek. De **vetgedrukte** tekst in de kolommen geeft aan welke merker in een meetjaar als indicator voor de voornaamste bron aangemerkt is.

omschrijving	Aangetoonde fecale merkers					
	2014	2015	2016	2019	2021	2022
De oude Pol extra meetpt B	mens	vogel, mens, herkauwer, hond	mens, herkauwer, vogel	mens, hond, vogel	mens, herkauwer, vogel	mens, vogel

3.2.2 Strandbad Edam

De zwemwaterlocatie Strandbad Edam heeft al meerdere jaren geen goede zwemwaterkwaliteit. In Figuur 2 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococci gedurende het zwemseizoen 2022 op deze locatie.



Figuur 2. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci op de locatie Strandbad Edam in 2022. *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 datum met DNA analyses is weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as. Op 26 juli zijn de waarden voor zowel *E. coli* als de intestinale enterococci boven de detectiegrens (34659 kve/100ml).

Er zijn duidelijk verhogingen zichtbaar voor *E. coli* en de intestinale enterococci op 26 juli en 22 augustus. De signaalwaarden worden op 26 juli ernstig overschreden. De extreem verhoogde bacteriewaarden corresponderen niet met detectie van een van de ingezette DNA merkers. In 2019 en 2020 werden in het als referentie gekozen monster geen van de nu gebruikte merkers aangetroffen (Hootsmans, 2019, 2020).

In Tabel 3 zijn de DNA concentraties van de hier in 2022 onderzochte fecale merkers aangegeven. In het veldmonster van deze locatie worden geen DNA-merkers aangetoond.

Tabel 3. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor het onderzochte veldmonster van de locatie Strandbad Edam en bijbehorende blanco. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens.

monster code	datum / volume	omschrijving	rendement (%)	mens hond vogel herkauwer			
				DNA kopieën/l			
LMB-154888-OW	26 juli 100 ml	Strandbad Edam	51,8	<1,4E+03	<1,4E+03	<7,2E+03	<1,4E+03
LMB-154887-UW	100 ml	Blanco	42,5	<1,8E+03	<1,8E+03	<8,8E+03	<1,8E+03

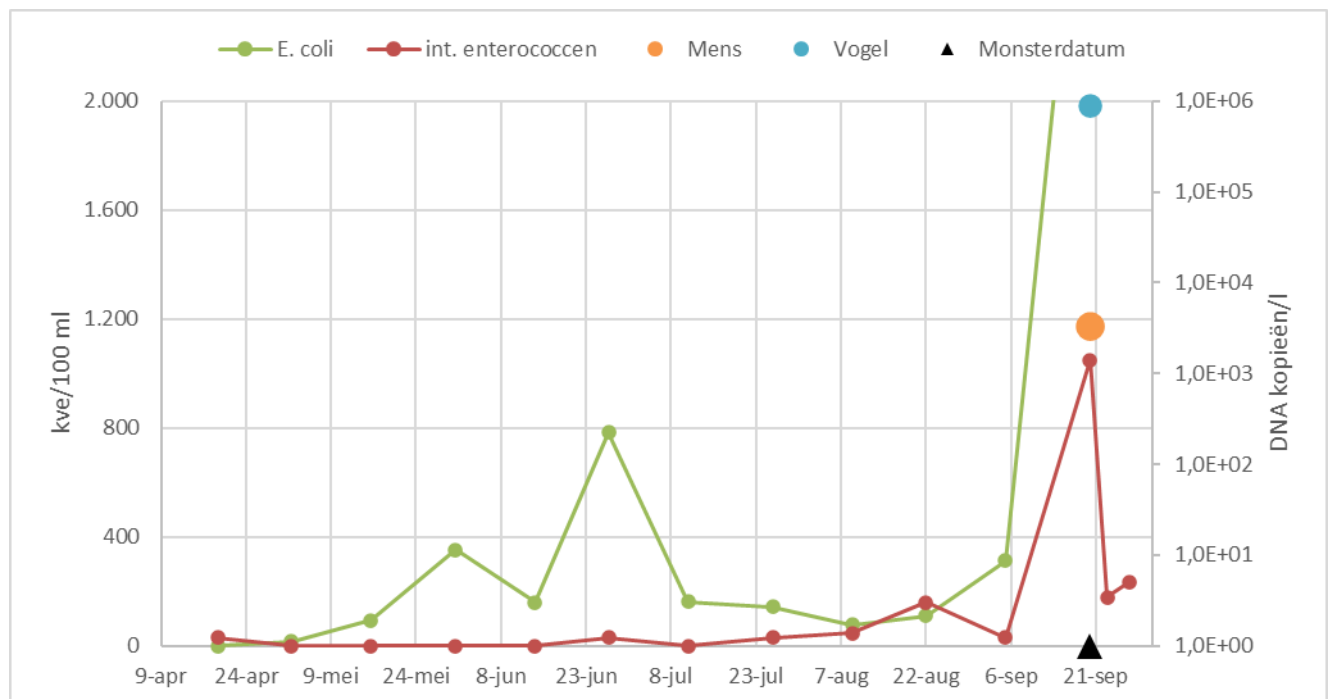
Bij eerder onderzoek met DNA merkers werden voor dezelfde locatie naast herkauwers ook mensen, honden en vogels als bron aangewezen (zie Tabel 4; Kardinaal & Heijnen, 2016; Kardinaal, 2017, 2018; Hootsmans, 2019, 2020, 2021). Het zwemwaterprofiel uit 2020 (RWS MN, 2020b) wijst mede op basis van de eerdere DNA analyses geen eenduidige fecale bron(nen) aan. Het beeld uit de DNA analyses blijkt over de jaren niet constant wat wijst op meerdere fecale verontreinigingsbronnen die invloed kunnen hebben op de waterkwaliteit.

Tabel 4. Overzicht van de DNA merkers zoals vastgesteld in de periode 2016 t/m 2022 op locatie Strandbad Edam. De **vetgedrukte tekst** in de kolommen geeft aan welke merkerin een meetjaar als indicator voor de voornaamste bron aangemerkt is.

omschrijving	Aangetoonde fecale merkers						
	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Badstrand Edam	mens , hond, vogel	mens , herkauwer	vogel , herkauwer, hond, mens	hond	mens	herkauwer	geen

3.2.3 't Kleine Zeeetje

De zwemwaterlocatie 't Kleine Zeeetje (SPAKBBS) heeft al meerdere jaren geen goede zwemwaterkwaliteit. In Figuur 3 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococci gedurende het zwemseizoen 2022 op deze locatie. Ook de resultaten voor de op de geanalyseerde datum vastgestelde DNA waarden voor de fecale merker voor mensen en vogels worden hier weergegeven.



Figuur 3. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci op de locatie 't Kleine Zeeetje in 2022 en de op één moment vastgestelde DNA-resultaten van fecale merkers. *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 datum met DNA analyses is weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as. De waarden voor *E. coli* op 20, 23 en 27 september bedragen resp. 3306, 2023 en 6119 kve/100ml.

Voor *E. coli* zijn een aantal verhoogde waarden zichtbaar: op 27 juni, en op 20, 23 en 27 september. Voor de intestinale enterococci zijn de waarden laag behalve op 20 september. De sterke verhoging op 20 september correspondeert met een verhoogde waarde voor de DNA merker voor mensen en vogels. Helaas zijn bij de beide herhalingsmonsters op 23 en 27 september geen DNA monsters genomen. In 2020 werden in het als referentie gekozen monster geen DNA merkers aangetroffen (Hootsmans, 2020).

In Tabel 5 zijn de DNA concentraties van de hier in 2022 onderzochte fecale merkers aangegeven. Er werden op de onderzochte datum DNA merkers aangetoond van mensen en vogels.

Tabel 5. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor het onderzochte veldmonster van de locatie 't Kleine Zeetje en bijbehorende blanco. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens.

monster code	datum / volume	omschrijving	rendement (%)	DNA kopieën/l			
				mens	hond	vogel	herkauwer
LMB-154892-OW	20 sep 100 ml	't Kleine Zeetje	56,2	3,3E+03	<1,3E+03	9,0E+05	<1,3E+03
LMB-154891-UW	100 ml	Blanco	39,9	<1,9E+03	<1,9E+03	<9,4E+03	<1,9E+03

Bij eerder onderzoek met DNA merkers werden voor dezelfde locatie naast mensen en vogels ook herkauwers en honden als bron aangewezen (zie Tabel 6; Kardinaal & Heijnen, 2014, 2015; Hootsmans 2020, 2021). In de periode 2016 tot en met 2019 zijn geen DNA metingen gedaan.

Het zwemwaterprofiel uit 2019 (RWS MN, 2019) wijst met name op vogels als mogelijke bron, en daarnaast op mensen (recreatievaart) en mogelijk lokaal honden en paarden. Herkauwers worden in deze versie van het zwemwaterprofiel niet benoemd als mogelijke bron, maar ze werden wel gedetecteerd in de DNA analyses van 2014.

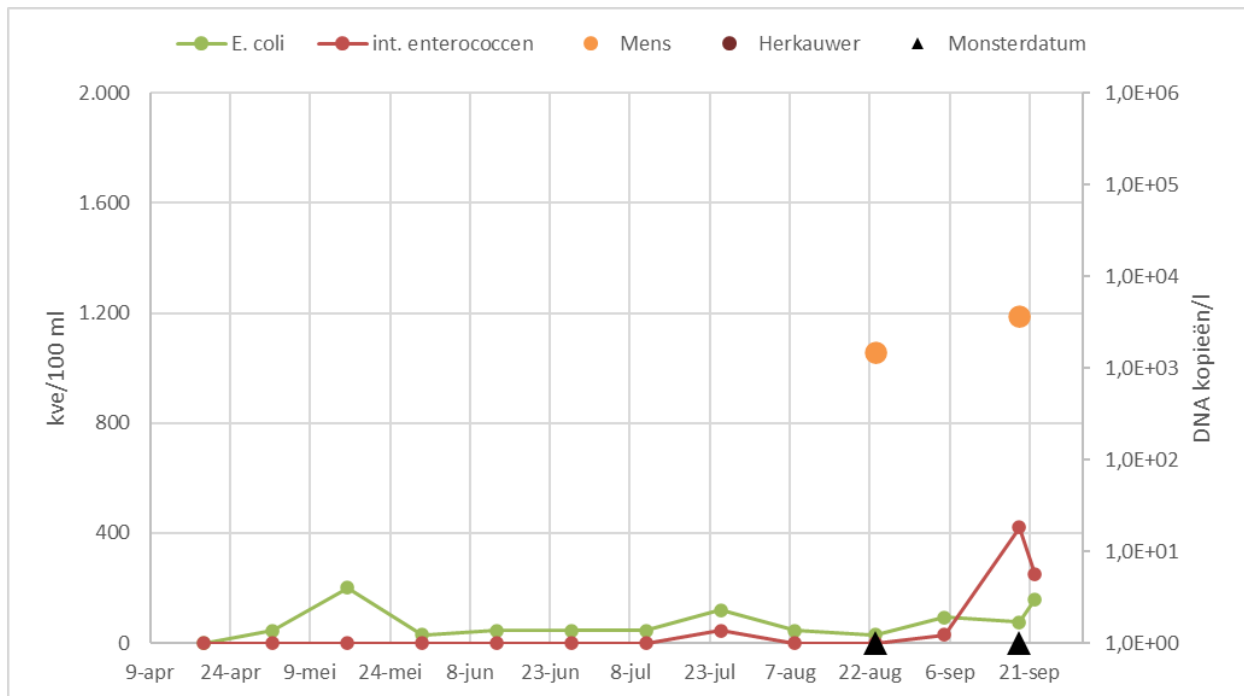
Tabel 6. Overzicht van de DNA merkers zoals gemeten in 2014, 2015, en 2020 t/m 2022 op locatie 't Kleine Zeetje..

omschrijving	Aangetoonde fecale merkers				
	2014	2015	2020	2021	2022
De oude Pol extra meetpt B	mens, herkauwer, vogel	mens, vogel, hond	geen	mens, herkauwer, vogel	mens, vogel

3.2.4 Wijksche Waard

De zwemwaterlocatie Wijksche Waard badstrand (WIJKSBDBSD_4) had in 2019 en 2021 geen goede zwemwaterkwaliteit, met behoorlijke overschrijdingen van de signaalwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci. In 2018 en 2020 was dit niet het geval.

In Figuur 4 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococci gedurende het zwemseizoen 2022 op deze locatie. Ook de resultaten voor de op de twee geanalyseerde datums vastgestelde DNA waarden voor de fecale merker voor mensen worden hier weergegeven.



Figuur 4. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci op de locatie Wijksche Waard in 2022 en de op twee momenten vastgestelde DNA-resultaten van fecale merkers. *E. coli* en intestinale enterococci zijn uitgedrukt in een lineaire schaal in kve (kolonievormende eenheden) per 100 ml; de DNA-merkers zijn uitgedrukt op een loglineaire schaal in DNA-kopie aantallen/l. De twee datums met DNA analyses zijn weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as.

Voor intestinale enterococci is een verhoogde waarde zichtbaar, boven de signaalwaarde, op 19 september. Voor *E. coli* zijn de waarden alleen licht verhoogd op 16 mei. De verhoging op 19 september correspondeert met een verhoogde waarde voor de DNA merker voor mensen. Ook de referentie van 23 augustus laat een signaal voor mensen zien (ongeveer de helft van de waarde voor 19 september). Dit kan er op duiden dat kort voor 23 augustus een verhoogde waarde van fecale bacteriën is opgetreden, die zelf echter niet meer meetbaar waren op 23 augustus. Zie ook paragraaf 2.4. De microbiologische waterkwaliteit varieert nogal over de periode 2018-2022 (data RWS ZN): er waren forse overschrijdingen van de signaalwaarden in 2019 en 2021, maar niet in 2018 en 2020.

In Tabel 7 zijn de DNA concentraties van de hier in 2022 onderzochte fecale merkers aangegeven. Er werden op de beide onderzochte datums DNA merkers aangetoond van mensen.

Tabel 7. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor de twee onderzochte veldmonsters van de locatie Wijksche Waard en bijbehorende blanco's. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens.

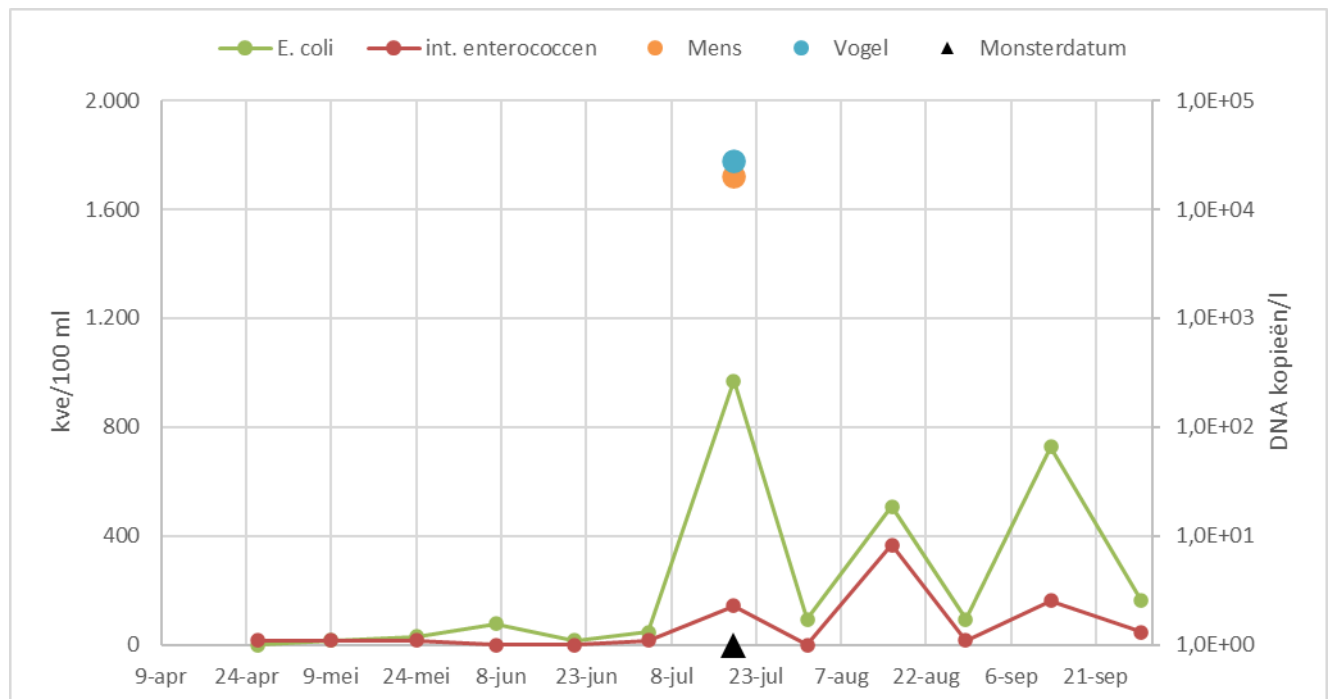
monster code	datum / volume	omschrijving	rendement (%)	DNA kopieën/l			
				mens	hond	vogel	herkauwer
LMB-151162-OW	23 aug 100 ml	Wijksche Waard	50,2	1,5E+03	<1,5E+03	<7,5E+03	<1,5E+03
LMB-151163-UW	100 ml	Blanco	48,6	<1,5E+03	<1,5E+03	<7,7E+03	<1,5E+03
LMB-153004-OW	19 sep 100 ml	Wijksche Waard	58,7	3,7E+03	<1,3E+03	<6,4E+03	<1,3E+03
LMB-153005-UW	100 ml	Blanco	48,8	<1,5E+03	<1,5E+03	<7,7E+03	<1,5E+03

Het zwemwaterprofiel uit 2020 (RWS ZN, 2020) wijst met name op mensen (zwemmers) als mogelijke bron. Maar ook de jachthaven van de camping de Rietschoof op 220 m afstand (zonder vuilwater innamepunt) wordt als een mogelijke bron benoemd, naast de passerende recreatievaart en beroepsvaart. Deze laatste twee lijken in 2022 niet waarschijnlijk, omdat diverse andere zwemwaterlocaties in de omgeving geen overschrijdingen kenden (mond. med. RWS-ZN). Op basis van de nu uitgevoerde DNA analyse lijken mensen inderdaad de meest waarschijnlijke oorzaak van de geconstateerde overschrijding van de signaalwaarde van intestinale enterococconen.

3.2.5 Scheveningen Zwarte Pad

Langs de Zuid-Hollandse kust verslechtert de zwemwaterkwaliteit de laatste jaren (met name bij Scheveningen Zwarte Pad en Monster Ter Heijde en zeer incidenteel bij Den Haag Kijkduin). Hier kunnen riooloverstorten vanuit het achterland de oorzaak zijn (mond. med. RWS-WVL).

In Figuur 5 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococconen gedurende het zwemseizoen 2022 op deze locatie. Ook de resultaten voor de op 19 juli vastgestelde DNA waarden voor de fecale merker voor mensen en vogels worden hier weergegeven. Het referentiemonster van 30 augustus 2021 (waarin geen merker signalen werden gedetecteerd; Hootsmans, 2021) is in overleg met RWS-WVL gebruikt als referentie monster in 2022 voor deze locatie en voor de hierna besproken locatie Monster Ter Heijde. Deze ligt zuidelijk ten opzichte van de locatie Scheveningen Zwarte Pad. De verwachting is, gezien de overheersende noordelijke kuststroom, dat eventuele achtergrondsignalen vanaf die locaties mee stromen langs locatie Scheveningen Zwarte Pad. Op deze manier is bespaard op referentie monsters in 2022 voor de beide locaties.



Figuur 5. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococconen op de locatie Scheveningen Zwarte Pad in 2022 en de op één moment vastgestelde DNA-resultaten van fecale merkers. *E. coli* en intestinale enterococconen zijn uitgedrukt in een lineaire schaal in kve (kolonievormende eenheden) per 100 ml; de DNA-merkers zijn uitgedrukt op een loglineaire schaal in DNA-kopie aantallen/l. De datum met DNA analyses is weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as.

De bacteriewaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci zijn op drie meetmomenten verhoogd. De signaalwaarden worden in 2022 niet overschreden. De vastgestelde DNA merker voor mensen en vogels op 19 juli valt samen met verhoogde bacteriewaarden van met name *E. coli*. Ook in 2020 werden voor Scheveningen Zwarte Pad mensen en vogels als mogelijke oorzaken van de toen geconstateerde overschrijding van de signaalwaarde voor *E. coli* vastgesteld (Hootsmans, 2020). In 2021 werd de merker voor mens aangetroffen, bij een licht verhoogde bacteriewaarde voor *E. coli* (Hootsmans, 2021).

In Tabel 8 zijn de DNA concentraties van de onderzochte fecale merkers aangegeven voor de zwemwaterlocatie Scheveningen Zwarte Pad (SCHEVNGZTPBS). Het DNA monster van 19 juli is positief voor DNA afkomstig van mensen en vogels.

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

monster code	datum / volume	omschrijving	rendement (%)	DNA kopieën/l			
				mens	hond	vogel	paard
LMB-154885-OW	19 juli 100 ml	Scheveningen Zwarte Pad	59,2	2,0E+04	<1,3E+03	2,8E+04	<1,3E+03
LMB-154884-UW	100 ml	Blanco	48,3	<1,6E+03	<1,6E+03	<7,8E+03	<1,6E+03

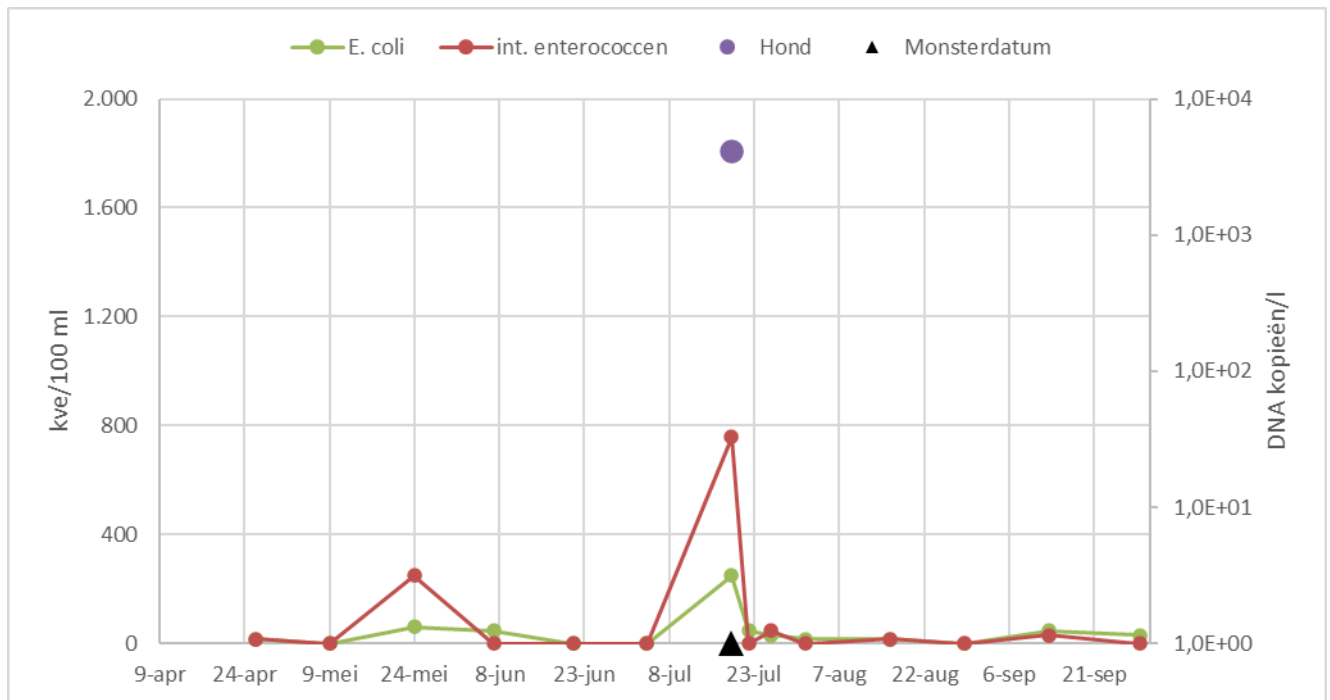
Het zwemwaterprofiel uit 2020 (RWS ZD, 2020a) geeft geen duidelijke aanknopingspunten voor de meest waarschijnlijke bronnen als reden voor verhoogde bacteriewaarden in de periode 2017-2022. Op basis van de DNA metingen van de afgelopen jaren lijken mensen en vogels de belangrijkste bron te zijn.

3.2.6 Monster Ter Heijde

Langs de Zuid-Hollandse kust verslechtert de zwemwaterkwaliteit de laatste jaren (met name bij Scheveningen Zwarte Pad en Monster Ter Heijde en zeer incidenteel bij Den Haag Kijkduin). Hier kunnen riooloverstorten vanuit het achterland de oorzaak zijn (mond. med. RWS-WVL).

In Figuur 6 zijn de resultaten weergegeven voor de met kweek bepaalde waarden voor *E. coli* en intestinale enterococci gedurende het zwemseizoen 2022 op deze locatie. Ook de resultaten van de voor 19 juli vastgestelde DNA waarden voor de fecale merker voor honden worden hier weergegeven.

De signaalwaarden voor intestinale enterococci worden in 2022 fors overschreden op 19 juli. *E. coli* is daarbij eveneens verhoogd maar in mindere mate. Op deze datum werd de DNA merker voor honden mensen vastgesteld. Op 24 mei is een verhoogde waarde zichtbaar voor intestinale enterococci en in veel mindere mate voor *E. coli*. Het als referentie gebruikte monster uit 2021 voor de locatie Scheveningen Zwarte Pad liet geen DNA merkers zien.



Figuur 6. Meetwaarden voor *E. coli* en intestinale enterococci op de locatie Monster Ter Heijde in 2022 en het op één moment vastgestelde DNA-resultaat voor fecale markers. *E. coli* en intestinale enterococci zijn uitgedrukt in een lineaire schaal in kve (kolonievormende eenheden) per 100 ml; de DNA-markers zijn uitgedrukt op een loglineaire schaal in DNA-kopie aantallen/l. De datum met DNA analyses is weergegeven met een zwarte driehoek op de horizontale as.

In Tabel 9 zijn de DNA concentraties van de onderzochte fecale markers aangegeven voor de zwemwaterlocatie Monster Ter Heijde (TERHDBSD). In het veldmonster van 19 juli is de DNA marker voor honden gedetecteerd.

Tabel 9. DNA concentraties (kopieën/l) zoals gedetecteerd voor het onderzochte veldmonster van de locatie Monster Ter Heijde en bijbehorende blanco. Gegevens met een '<' betreffen waarden beneden de detectiegrens.

monster code	datum / volume	omschrijving	rendement (%)	DNA kopieën/l			
				mens	hond	vogel	paard
LMB-154886-OW	19 juli	Monster Ter Heijde	59,6	<1,3E+03	4,2E+03	<6,3E+03	<1,3E+03
LMB-154884-UW	100 ml	Blanco	48,3	<1,6E+03	<1,6E+03	<7,8E+03	<1,6E+03

Het zwemwaterprofiel uit 2020 (RWS ZD, 2020b) wijst geen duidelijke fecale bronnen aan die bij reeds bestaande en uitgevoerde beheersmaatregelen nog tot zorg leiden. Het opduiken van de hondenmarker in 2022 suggereert dat honden hier invloed kunnen hebben op de waterkwaliteit en dat er wellicht handhaving nodig is op loslopende honden cq hun feces.

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 DNA merker resultaten.

De in 2022 verzamelde DNA gegevens wijzen op mensen en vogels als bronnen bij De Oude Pol meetpunt B. Bij eerder onderzoek met DNA merkers werden voor dezelfde locatie eveneens mens en vogel als regelmatig voorkomende bron aangewezen; in 2015 en 2016 kwam ook herkauwer voor. Het beeld laat over de jaren zien dat fecale verontreiniging van mensen hier waarschijnlijk een rol speelt en dat ook andere bronnen een bijdrage kunnen leveren.

Bij Strandbad Edam kunnen de voor zwemwater extreem hoge waarden op de analyse datum voor *E. coli* en intestinale enterococcen (boven de detectiegrens) niet worden gekoppeld aan een verhoogde waarde voor de onderzochte DNA merkers in het DNA monster. Het beeld voor mogelijke bronnen bij Strandbad Edam is over de jaren niet constant. In de afgelopen jaren zijn bij DNA analyses de merkers voor mensen, vogels, herkauwers en honden aangetroffen

Voor 't Kleine Zeetje werden DNA merkers van mensen en vogels aangetoond bij een sterk verhoogde waarde voor *E. coli* en intestinale enterococcen. Voor de zwemwaterlocatie Wijksche Waard badstrand lijken mensen de meest waarschijnlijke oorzaak van de geconstateerde overschrijding van de signaalwaarde van intestinale enterococcen.

Bij Monster Ter Heijde kon een verhoging van met name intestinale enterococcen worden gerelateerd aan de DNA merker voor honden. Bij Scheveningen Zwarte Pad was een verhoging van met name *E. coli* te koppelen aan mensen en vogels. Naast riooloverstorten als mogelijke bron (gezien het optreden van de merker voor mensen), wijzen de merkers voor vogels en honden ook op andere oorzaken van de geconstateerde verhogingen van fecale bacteriewaarden.

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.

- Hootsmans, M.J.M., (2019). DNA bronopsporing op vier zwemwaterlocaties in Midden-Nederland in 2019. Rapport KWR 2019.104.
- Hootsmans, M.J.M., (2020). DNA bronopsporing voor RWS op zes zwemwaterlocaties in 2020. Rapport KWR 2020.132
- Hootsmans, M.J.M., (2021). DNA bronopsporing voor RWS op tien zwemwaterlocaties in 2021. Rapport KWR 2021.103
- Kardinaal, E., (2017). Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2017. Rapport KWR 2017.077.
- Kardinaal, E., (2018). Bronosporen fecale verontreiniging in Rijkswateren 2018. Rapport KWR 2018.129.
- Kardinaal, E., & Heijnen, L., (2014). Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2014. Rapport KWR 2014.098.
- Kardinaal, E., & Heijnen, L., (2015). Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2015. Rapport KWR 2015.079.
- Kardinaal, E., & Heijnen, L., (2016). Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2016. Rapport KWR 2016.118.
- RWS MN, (2019). Zwemwaterprofiel 't Kleine Zeetje.
- RWS MN, (2020a). Zwemwaterprofiel De Oude Pol.
- RWS MN, (2020b). Zwemwaterprofiel Strandbad Edam.
- RWS ZD, (2020a). Zwemwaterprofiel Scheveningen Zwarte Pad.
- RWS ZD, (2020b). Zwemwaterprofiel Monster Ter Heijde.
- RWS ZN, (2020). Zwemwaterprofiel Wijksche Waard, badstrand.
- Stuurgroep Water, (2013). Beslisnotitie werkwijze individuele metingen en meetfrequentie microbiologische parameters zwemwaterrichtlijn, vastgesteld op 14 maart 2013.

Jaar van publicatie
2022

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 2022.115 | 19 december 2022 ©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