

KWR 2016.118 | December 2016

Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2016

Bronosporen fecale verontreiniging in zwemwater 2016

KWR 2016.118 | December 2016

Opdrachtnummer

401545

Projectmanager

Edwin Kardinaal

Opdrachtgever

RWS WVL

Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

Auteur(s)

Edwin Kardinaal & Leo Heijnen

Verzonden aan

Leo van Ballegooijen, RWS WVL

Jaar van publicatie
2016

Meer informatie

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

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



December 2016 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag 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, 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	8
3	Resultaten	10
3.1	Resultaten bronosporen 2016	10
3.2	Kwaliteitsborging	10
3.3	Resultaten veldmonsters	10
3.4	Bronnen in relatie tot fecale zwemwater indicatoren	11
3.5	Bronnen 2016 in relatie tot eerdere jaren	16
4	Conclusies	18
4.1	Verloop onderzoek 2016	18
4.2	Van DNA bronopsporing naar maatregelen	18
4.3	Wel <i>E. coli</i> en enterococci, geen bron en vice versa	20
5	Referenties	22
Bijlage I DNA methodiek		
Bijlage II Resultaten 2016		
Bijlage III Grafieken per locatie 2016		

1 Inleiding

Tijdens het zwemwaterseizoen wordt op veel zwemwaterlocaties in Nederland met regelmaat de zwemwaterkwaliteit beoordeeld aan de hand van de indicatoren *E. coli* en intestinale enterococci. Op basis van 4 jaar aaneengesloten monitoring wordt de uiteindelijke 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”. In 2015 moesten alle zwemwaterlocaties minimaal aan de kwaliteit “aanvaardbaar” voldoen.

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. Bovendien zijn er initiatieven om nieuwe zwemwaterlocaties te openen en zijn potentiële bronnen van fecale herkomst nog niet bekend. In 2012 t/m 2015 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). 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 2015 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 eerdere onderzoeken hebben voor een aantal locaties nog onvoldoende inzicht gegeven in de oorzaak achter de bacteriële verontreiniging met fecale oorsprong. Daarnaast is er per 2016 een aantal nieuwe locaties aangemeld waarvan nog niet duidelijk is of en door welke bronnen van fecale bacteriën de zwemwaterkwaliteit beïnvloed wordt. Van deze nieuwe locaties en de “aanvaardbaar” dan wel “slecht” scorende locaties is het van belang om de bronnen in beeld te krijgen. Zodoende kunnen aansluitend passende maatregelen gedefinieerd worden. Gedurende het zwemseizoen 2016 is daarom bronopsporing uitgevoerd op tien zwemwaterlocaties in rijkswateren.

2 Materiaal & Methoden

2.1 Watermonsters

In 2016 zijn op onderstaande locaties de bronanalyses uitgevoerd (zie tabel 2.1). Behalve op een aantal zwemwaterlocaties zijn ook monsters genomen op locaties die nadere informatie kunnen geven over de ligging van de bron. In totaal betreft het 10 locaties waarvan monsters genomen zijn. Op nagenoeg alle hieronder genoemde locaties is tijdens de tweewekelijkse reguliere bemonstering extra water bemonsterd voor de nadere bronanalyse (per locatie 12 monsters). Op het meetpunt nabij de Oude Pol (Bijsselse beek) is 1 keer per maand bemonsterd. In totaal zijn 114 monsters verzameld. De monsters zijn, gedurende het zwemseizoen, periodiek genomen door Waterschap Hunze & Aa's, Intertek en Eurofin/Omegam, voor de locaties en de verantwoordelijke monsternemers zie tabel 2.1.

TABEL 2.1. OVERZICHT VAN DE LOCATIES WAARVAN IN 2016 DE DNA BRONANALYSES ZIJN UITGEVOERD EN DE FREQUENTIE VAN BEMONSTEREN TIJDENS HET ZWEMWATERSEIZOEN 2016.

Locatie	# metingen	monstername	filtratie
Termuntenzijl Strand	12	Hunze & Aa's	WLN
Lemsterstrand, Lemmer	12	Intertek	Intertek
Nijkerk aan Zee	12	Intertek	Intertek
Strand Edam	12	Intertek	Intertek
Zwembad Warder	12	Intertek	Intertek
Strand Schardam	12	Intertek	Intertek
Vooroever Koopmanspolder	12	Intertek	Intertek
Dijkstrand Urk	12	Intertek	Intertek
De Oude Pol Extra meetpunt B, Bijsselsebeek	6	Intertek	Intertek
Ritthem Fort Rammekens Badstrand	12	Eurofin/Omegam	KWR
Totaal aantal monsters	114		

2.2 Filtratie

De filtraties en conservering van de watermonsters zijn uitgevoerd door Intertek, WLN en KWR (zie tabel 2.1). Filtratie is uitgevoerd binnen 48 uur na monstername. De gebruikte volumes variëren van 50 tot 200 ml (zie Bijlage I) van elk monster, 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 100 ml DNA vrij water over een filter geleid is. Na filtratie zijn de filters opgenomen in buffervloeistof en opgeslagen in de vriezer (-20 °C). Halverwege en aan het eind van het zwemwaterseizoen 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 enterococcon (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 overschrijdingen van de zwemwaterrichtlijnen zijn 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 alle monsters geldt dat ze onderzocht zijn met de DNA merkers die coderen voor de bronnen humaan, herkauwer, hond en vogel.

3 Resultaten

3.1 Resultaten bronosporen 2016

In 2016 is van een tiental zwemwaterlocaties waarvan RWS de waterkwaliteitsbeheerder is geanalyseerd wat de potentiële bronnen van fecale herkomst zijn. Met deze resultaten in de hand kan RWS in overleg met de stakeholders bepalen welke maatregelen ter verbetering van de zwemwaterkwaliteit genomen kunnen worden. In 2016 zijn bij KWR 144 filters aangeleverd waarvan 118 afkomstig van zwemwaterlocaties en de overige betreffen de blanco filters (gefiltreerd met DNA vrij water) zoals die bij elke filtratiereeks meegenomen zijn.

Van deze filters zijn er in totaal 46 monsters, afkomstig van zwemwaterlocaties, geanalyseerd met de qPCR technieken (zie Bijlage I). 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.

De hier gebruikte dataset bevat 4 monsters waarvan de enterococcon concentratie deze signaalwaarde overschreed en 5 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. Op alle locaties die in dit onderzoek bemonsterd zijn, zijn analyses uitgevoerd in het kader van de bronopsporing.

3.2 Kwaliteitsborging

De rendementen van de DNA extracties zijn over het algemeen zeer goed (> 20 % rendement). Van het totaal aantal monsters is van één monster het DNA extractierendement tussen de 10 en 20 %, dit is voldoende om DNA kopie aantallen te kunnen berekenen. Van het totaal aantal monsters is in één geval de DNA extractie opbrengst niet berekend als gevolg met een onduidelijke interne controle. Het betreft Zeestrand Termunten, Termunterzijl buitendijks 30-8-2016. Dit monster is wel meegenomen in de verdere analyse maar niet gecorrigeerd voor het rendement.

In alle blanco filters is geen enkele remming van de extractie aangetroffen (Bijlage I). Uit de analyses van de blanco's blijkt dat geen enkel positief resultaat is verkregen voor de onderzochte bronnen.

3.3 Resultaten veldmonsters

Van de geanalyseerde veldmonsters is in 37 van de gevallen een bron gedetecteerd. Net als in het jaar 2015 is ook in het jaar 2016 het vaakst humane *Bacteroides* aangetroffen, in 22 monsters. Daarbij is de hoogste concentraties aangetroffen op de locatie Vooroever Koopmanspolder gevolgd door hoge concentraties op de locatie De oude Pol extra meetpunt Bijsselsebeek. In 13 monsters zijn herkauwer *Bacteroides* aangetroffen, met name bij het extra meetpunt B van Oude Pol zijn de aangetroffen concentraties hoog. In 19 monsters zijn vogel specifieke *Helicobacter* bacteriën gedetecteerd, de hoogste concentraties werden aangetroffen bij de nieuwe zwemwaterlocatie Nijkerk aan Zee. De DNA sporen van honden zijn het minst aangetroffen, in totaal 10 maal. De hoogste concentraties honden DNA

werden aangetroffen op locatie Lemsterstrand bij Lemmer in april 2016 bij aanvang van het zwemseizoen. In tabel 3.1 is per locatie samengevat welke bronnen van fecale herkomst aangetroffen zijn in het jaar 2016.

TABEL 3.1 PER LOCATIE IS AANGEGEVEN WELKE BRON VAN FECALE HERKOMST IN 2016 AANGETROFFEN IS. DE VETGEDRUKTE TEKST IN DE KOLOM VAN HET JAAR 2016 GEEFT AAN WELKE BRON ALS VOORNAAMSTE ERKEND IS.

Locaties	Aangetoonde fecale verontreinigingsbronnen 2016
De oude Pol extra meetpunt Bijsselsebeek	humaan, herkauwer , vogel
Lemsterstrand Lemmer	hond , vogel
Nijkerk aan Zee	vogel , humaan, herkauwer
Ritthem fort Rammekens badstrand	humaan, hond
Strand Edam	humaan , hond, vogel
Strand Schardam	vogel
Urk Dijkstrand	hond , herkauwer
Vooroever Koopmanspolder	humaan , hond
Zeestrand Termunten, Termuntenzijl buitendijks	humaan, herkauwer, vogel, hond
Zwembad Warder	humaan, hond

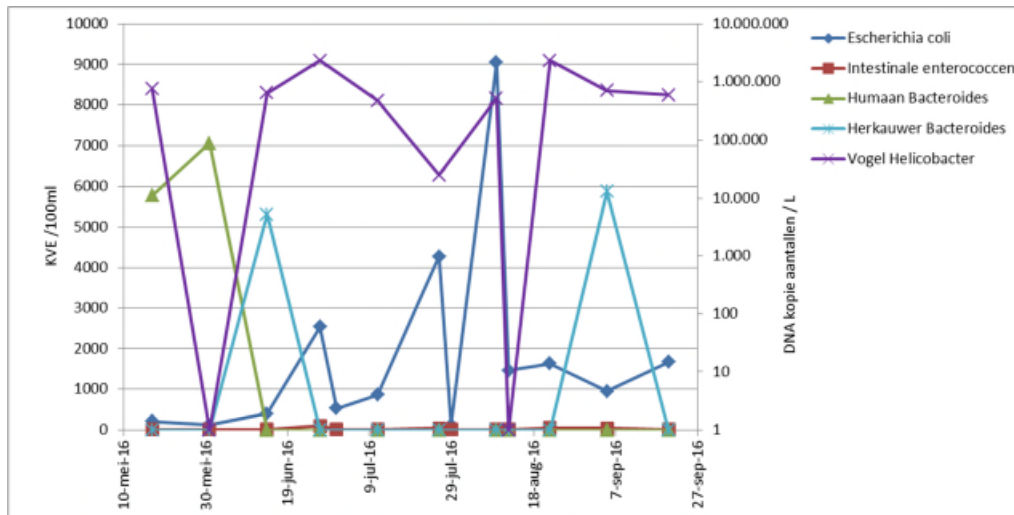
3.4 Bronnen in relatie tot fecale zwemwater indicatoren

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 deze 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 5 monsternamemomenten de 1800 kve/100 ml is overschreden (zie Bijlage II). In de dataset zitten 4 monsters waarvan de enterococcen concentratie de signaalwaarde (400 kve/100 ml) overschrijdt. Deze overschrijdingen zijn waargenomen op 4 verschillende zwemwaterlocaties (zie Bijlage II). De hoogste concentraties aan *E. coli* zijn aangetroffen op de locaties Nijkerk aan Zee en De oude Pol extra meetpunt Bijsselsebeek, de hoogste concentratie aan enterococcen is aangetroffen op De oude Pol extra meetpunt Bijsselsebeek.

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 tienmiljoen 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.

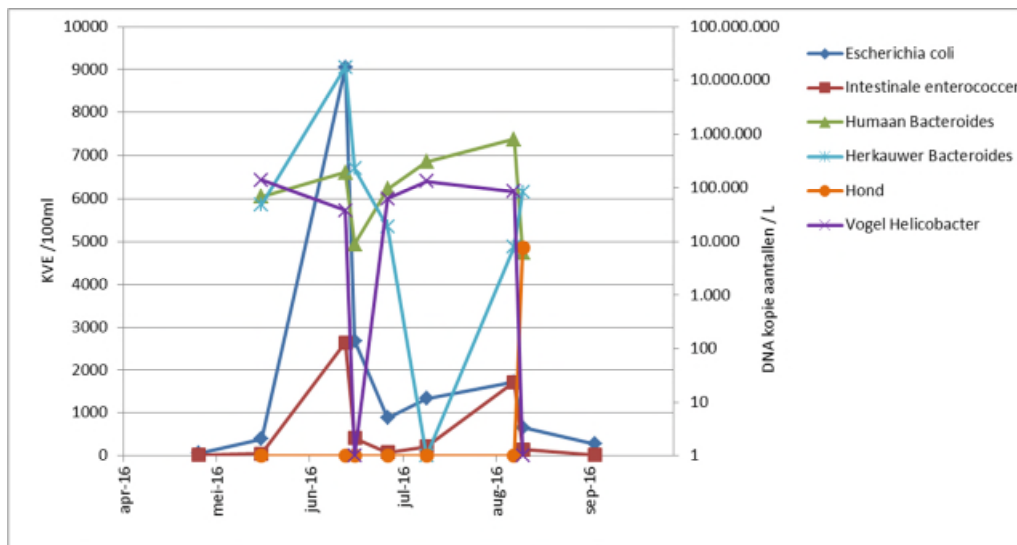
Afgaande op de onderstaande figuur (figuur 3.1) is er bij Nijkerk aan Zee één potentiële bron aan te wijzen die van belang is in relatie tot de zwemwaterkwaliteit: verontreiniging van vogel herkomst. Op het moment van overschrijding van de zwemwaterparameters (27-6-2016, 26-7-2016 en 9-8-2016) is alleen DNA aangetoond van vogel herkomst. Deze bron is gedurende het hele seizoen in hoge concentratie aanwezig op deze locatie. De dynamiek van deze merker is niet geheel synchroon aan die van de *E. coli* concentratie. De bronnen

herkauwers en humaan vertonen geen enkele overeenkomst met de dynamiek zoals die voor de zwemwaterparameters waargenomen wordt. Deze uitkomst suggereert dat vogels de verantwoordelijke bron zijn voor de overschrijding van de *E. coli* signaalwaarde.



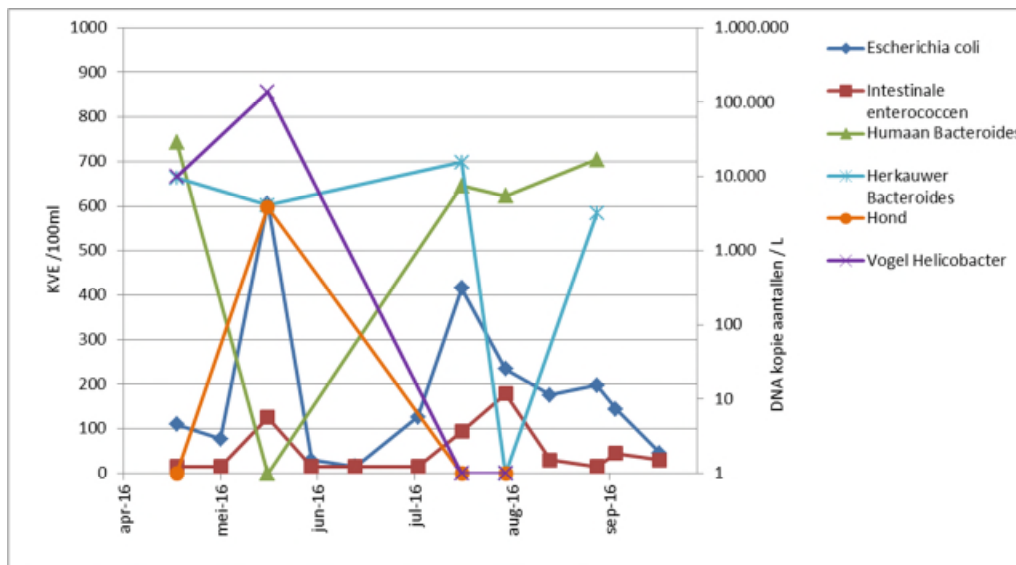
FIGUUR 3.1. CONCENTRATIEVERLOOP VAN DIVERSE BACTERIËN OP DE DE LOCATIE NIJKERK AAN ZEE. DE CONCENTRATIES *E. COLI* EN ENTEROCOCCEN ZIJN UITGEZET OP DE LINKERAS EN UITGEDRUKT IN KVE/100 ML. DE OVERIGE PARAMETERS ZIJN UITGEZET OP DE RECHTERAS EN UITGEDRUKT ALS DNA KOPIE AANTALLEN/ L.

Op de locatie de oude Pol extra meetpunt Bijsselsebeek zijn dit seizoen drie bronnen die prominent aanwezig zijn: humaan, vogels en herkauwers. De dynamiek van de DNA concentraties van deze drie bronnen vertoont gelijkenis met de waargenomen dynamiek van de zwemwaterparameters. De fikse overschrijdingen van zowel de *E. coli* als de enterococci concentraties op 14 juni vallen samen met hoge concentraties van de bronnen, ook in de herbemonstering is duidelijk te zien dat de bronnen duidelijk afnemen net als de indicatororganismen. Bij de verhoogde concentraties van *E. coli* en enterococci op 9 augustus is opnieuw duidelijk dat de bronnen humaan en vogel nagenoeg gelijke tred houden met deze parameters. Voor de herkauwers is het concentratieverloop rond deze datum minder gelijk oplopend. Voor deze locatie geldt dat de waargenomen hoge concentraties zwemwaterparameters en de bijbehorende bronnen voorkomen op het moment van fikse regenval in de omgeving van de Bijsselsebeek. Op weerstation Harderwijk is op 13 juni 185 mm en op 14 juni 193 mm neerslag gemeten. Bij Epe, een stukje verder in het achterland is op 13 juni 361 mm neerslag gemeten. Voorafgaand aan de monsterneming op 14 juni is dus inderdaad veel regen gevallen in dit gebied, wat vermoedelijk de Bijsselse Beek goed gevuld zal hebben.



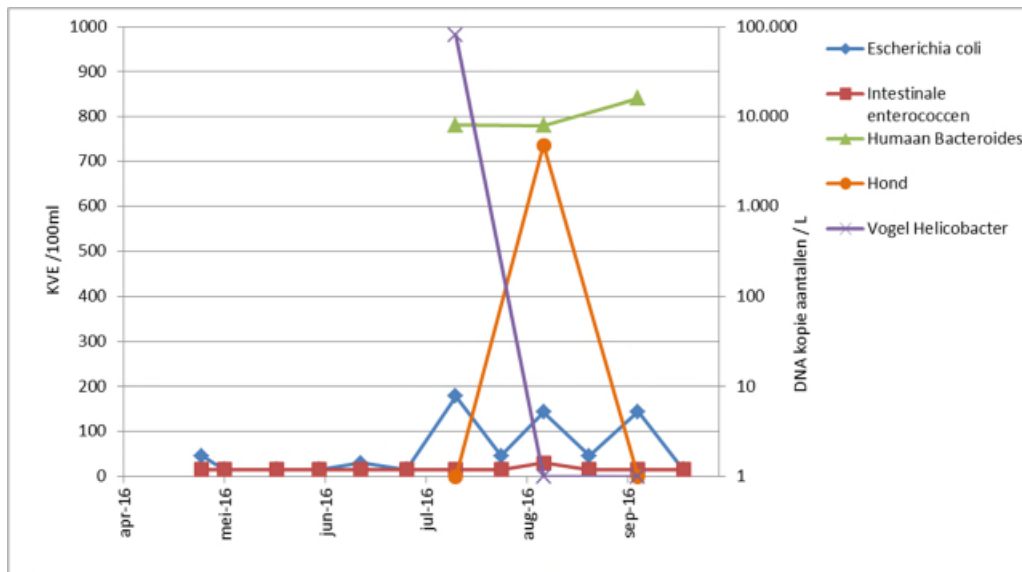
FIGUUR 3.2. CONCENTRATIE VERLOOP VAN DIVERSE BACTERIËN OP DE DE LOCATIE DE OUDE POL EXTRA MEETPUNT BIJSELSEBEEK. DE CONCENTRATIES *E. COLI* EN ENTEROCOCCEN ZIJN UITGEZET OP DE LINKER AS EN UITGEDRUKT IN KVE/100 ML. DE OVERIGE PARAMETERS ZIJN UITGEZET OP DE RECHTERAS EN UITGEDRUKT ALS DNA KOPIE AANTALLEN/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

Op Termunterzijl Strand is de herkomst van de fecale verontreiniging niet toe te wijzen aan één bron (Figuur 3.3). Op het moment van verhoogde concentratie *E. coli* en een verhoging van de enterococci concentratie (17 mei 2016) zijn er drie potentiële bronnen die ten grondslag aan deze verhoogde concentraties indicatororganismen kunnen liggen: de concentraties aan herkauwer *Bacteroides*, hond en vogel *Helicobacter* zijn duidelijk verhoogd. Echter, de bron van herkauwerherkomst is ook hoog op momenten dat *E. coli* concentraties laag zijn. Dit impliceert dat deze bron niet (primair) bijdraagt aan de overschrijding van de zwemwaterparameter *E. coli*. Anders dan in eerdere jaren valt de concentratie aan herkauwer *Bacteroides* niet altijd samen met de verhoging met *E. coli*. Dat geldt overigens voor alle bronnen die dit jaar waargenomen zijn op de locatie. De diverse bronnen kunnen dus bijdragen aan verhoogde concentraties *E. coli* en enterococci. Anders dan in eerdere jaren is er dit jaar geen overschrijding op de locatie aangetroffen.



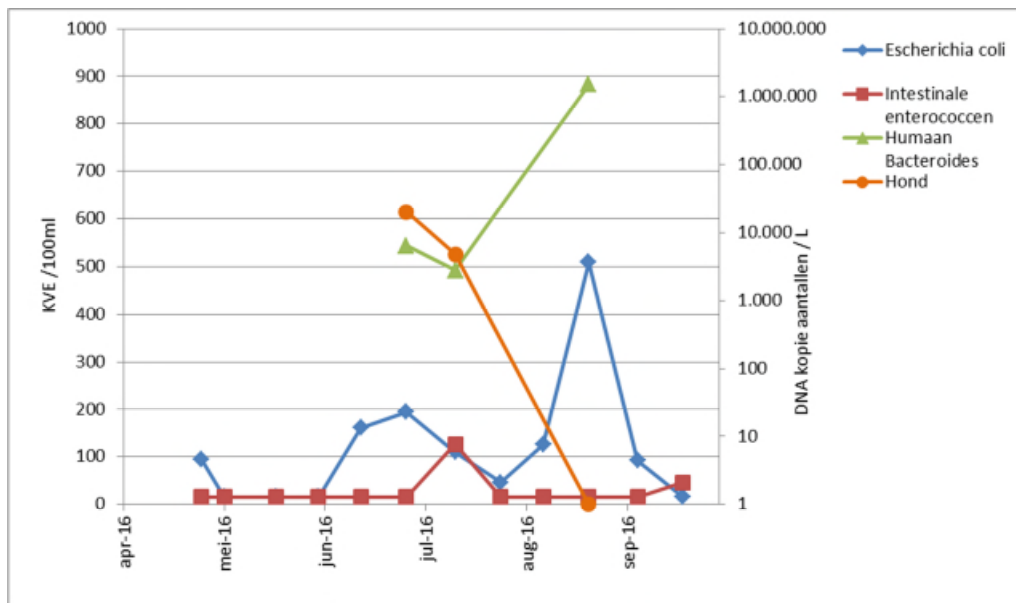
FIGUUR 3.3. CONCENTRATIE VERLOOP VAN DIVERSE BACTERIËN OP DE DE LOCATIE TERMUNTERZIJL STRAND. DE CONCENTRATIES *E. COLI* EN ENTEROCOCCEN ZIJN UITGEZET OP DE LINKER AS EN UITGEDRUKT IN KVE/100 ML. DE OVERIGE PARAMETERS ZIJN UITGEZET OP DE RECHTER AS EN UITGEDRUKT ALS DNA KOPIE AANTALLEN/ L.

Op de locatie Strandbad Edam is in het zwemwaterseizoen geen overschrijding van de signaalwaarde voor *E. coli* aangetroffen, wel enkele beperkte verhogingen van de *E. coli* concentratie. Op de locatie zijn drie potentiële bronnen van fecale verontreiniging aangetoond: vogels, humaan en hond. Hiervan komen vogel en hond incidenteel voor en niet tegelijk met het patroon van de *E. coli*. De humane bron is vrij constant aanwezig. 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 is namelijk lager dan het peil van het IJsselmeer, er zal dus water vanaf IJsselmeer naar Edam toestromen. De bronnen op de locatie zullen meer een plaatselijke herkomst hebben.



FIGUUR 3.4. CONCENTRATIE VERLOOP VAN DIVERSE BACTERIËN OP DE DE LOCATIE STRANDBAD EDAM. 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 RECHTER AS EN UITGEDRUKT ALS DNA KOPIE AANTALLEN/ L.

Op de locatie vooroever Koopmanspolder zijn in het seizoen 2016 geen overschrijdingen van signaalwaarden van de zwemwaterparameters aangetroffen. Wel zijn de concentraties *E. coli* op deze locaties een aantal keren verhoogd (16 juni en 16 augustus 2016). Op de locatie zijn twee bronnen geïdentificeerd: humaan en hond. De humane bron vertoont de sterkst overeenkomende dynamiek met die van *E. coli*. Ook in 2013 en 2014 vertoonde de *E. coli* dynamiek de sterkste overeenkomst met de humane *Bacteroides* concentraties.



FIGUUR 3.5. CONCENTRATIE VERLOOP VAN DIVERSE BACTERIËN OP DE DE LOCATIE VOOROEVER KOOPMANSPOOLDER. 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 RECHTER AS EN UITGEDRUKT ALS DNA KOPIE AANTALLEN/ L.

Grafieken zoals hierboven weergegeven voor de overige locaties die in 2016 in het monsternamprogramma zijn opgenomen, kunnen teruggevonden worden in Bijlage III.

3.5 Bronnen 2016 in relatie tot eerdere jaren

Het jaar 2016 is het vijfde jaar op rij dat op diverse locaties van RWS de DNA bronopsporing naar fecale verontreiniging plaats heeft gevonden. In 2012 beperkte de bronopsporing zich nog tot alleen de *Bacteroides* bacteriën van diverse bronnen en vogel *Helicobacter*. In 2013 is daar de detectie van honden DNA bijgekomen en is de detectie van vogel *Helicobacter* nader ontwikkeld. In 2013 is daar de methodiek voor de detectie van *Bacteroides* bacteriën van paarden herkomst bij gekomen.

Door de jaren heen is de bronopsporing nu op 41 locaties, waarvan RWS de waterkwaliteitsbeheerder is, uitgevoerd. Enkele van de locaties hebben één jaar meegedraaid in de analyserondes terwijl op andere locaties meerdere jaren op rij bepaald is wat de herkomst van fecale verontreiniging is geweest (zie Kardinaal & Heijen, 2014 + 2015). In het jaar 2016 is een aantal nieuwe locaties opgenomen in het monsternamprogramma. Daarnaast is ook een aantal locaties bemonsterd die vorige jaren ook deel uitmaakten van het onderzoeksprogramma (zie tabel 3.1).

De resultaten van 2016 bevestigen het beeld dat in eerdere jaren is ontstaan: vogels en mensen zijn de voornaamste bronnen van fecale verontreiniging op zwemwaterlocaties waarvan RWS de waterkwaliteitsbeheerder is. Op een enkele locatie zijn het herkauwers (bv Termunterzijl strand) en /of honden (bv Ritthem fort Rammekens badstrand) die de zwemwaterkwaliteit mogelijk negatief beïnvloeden.

Op die locaties waar door de jaren heen vaker een bronopsporingsonderzoek uitgevoerd is, komen bronnen herhaaldelijk naar voren, zoals op de locaties Vooroever Koopmanspolder en Ritthem. Bij de vooroever is de bron humaan een terugkerende, bij Ritthem zijn de bronnen humaan en hond die terugkeren. Eventuele maatregelen zouden zich op die bronnen kunnen

richten. Nader onderzoek op deze locaties zou moeten leiden naar de bron(nen) van fecale verontreiniging van humane origine.

Niet op elke locatie is het beeld even duidelijk, er kan per jaar een veranderend beeld ontstaan over de aanwezige bronnen. Bijvoorbeeld bij de Oude Pol lijkt in de jaren 2013/2014 een enkele bron verantwoordelijk voor de waargenomen concentraties aan indicator bacteriën, echter in de jaren 2015/2016 ontstaat een diffuser beeld met meerdere bronnen. Welke bron daadwerkelijk op een gegeven moment verantwoordelijk is voor de verhoogde concentraties aan zwemwaterparameters zal afhangen van lokale stromingspatronen en weersinvloeden zoals overmatige neerslag of windrichting.

Op de locatie Termunterzijl blijven herkauwers naast humaan in alle jaren terugkomen als voornaamste bron. In 2016 heeft de aanwezigheid van deze bronnen niet geleid tot overschrijdingen van de signaalwaarden zoals dat in eerder jaren wel gebeurde.

TABEL 3.1 OVERZICHT VAN DE VOORNAAMSTE BRONNEN ZOALS GEMETEN IN DE JAREN 2013 T/M 2016 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			
	2013	2014	2015	2016
De oude Pol extra meetpunt	vogel	humaan	vogel, humaan,	humaan,
Bijsebeek			herkauwer, hond	herkauwer, vogel
Lemsterstrand Lemmer	-	-	-	hond, vogel
Nijkerk aan Zee	-	-	-	vogel, humaan, herkauwer
Ritthem fort Rammekens badstrand	-	-	humaan, hond	humaan, hond
Strand Edam	-	-	-	humaan, hond, vogel
Strand Schardam	-	-	-	vogel
Urk Dijkstrand	-	-	vogel, humaan, hond, herkauwer	herkauwer, hond
Vooroever	humaan, vogel	humaan	-	humaan, hond
Koopmanspolder/Andijk				
Zeestransd Termunten, Termuntenzijl buitendijks	herkauwer	herkauwer, humaan	herkauwer, vogel, humaan	humaan, herkauwer, vogel, hond
Zwembad Warder	-	-	-	humaan, hond

4 Conclusies

In het zwemwaterseizoen 2016 is op tien locaties, waarvan RWS de waterkwaliteitsbeheerder is, onderzoek uitgevoerd naar de herkomst van fecale verontreiniging met behulp van DNA methoden. Dergelijke methoden zijn de afgelopen jaren ontwikkeld en toegepast in zowel de keten van de drinkwaterproductie als op vele zwemwaterlocaties in het hele land. In de rijkswateren was dit al het vijfde seizoen op rij dat de methodiek toegepast is. Op 44 locaties, waarvan de zwemwaterkwaliteit mogelijk onder druk staat, zijn afgelopen jaren monsters geanalyseerd voor RWS. Daarin is onderzocht of de herkomst van fecale bacteriën toe te schrijven was aan één of meerdere bronnen: humaan, herkauwers (o.a. schapen/runderen), honden, vogels en paarden. In 2016 zijn alle locaties onderzocht op het voorkomen van de bronnen humaan, herkauwer, hond en vogel.

4.1 Verloop onderzoek 2016

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 elke locatie is aan te geven welke bronnen voorkomen, ook op locaties waar geen overschrijdingen dan wel verhoogde concentraties van indicatororganismen gemeten zijn, is minimaal één bron aangetoond. In het jaar 2016 zijn in de 46 geanalyseerde monsters sporen van fecale verontreiniging met een humane herkomst (22) het meest aangetoond, gevolgd door vogels (19 keer), herkauwers (13 keer) en honden (10 keer).

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 meeste locaties primair verantwoordelijk lijkt voor de waargenomen overschrijdingen van de signaalwaarden van *E. coli* en enterococcen. Aansluitend zijn het vogels die voor de overschrijdingen dan wel verhoogde concentraties verantwoordelijk lijken.

4.2 Van DNA bronopsporing naar maatregelen

In dit onderzoek is ook de kandidaatlocatie Nijkerk aan Zee onderzocht. De concentraties *E. coli* en enterococcen zijn op de locatie een aantal malen boven de signaalwaarden gemeten. De voornaamste bron die hier voor verantwoordelijk lijkt zijn de vogels. In nagenoeg alle monsters zijn de concentraties vogel-gerelateerd DNA hoog. Maatregelen zouden op deze locatie zich primair moeten richten op het voorkomen van vogels op en rond de locatie om zo de locatie geschikt te maken als zwemwater.

In seizoen 2016 is ook de locatie Koopmanspolder onderdeel geweest van dit inventariserend onderzoek. Net al in eerdere seizoenen bleek de humane bron van belang op deze locatie. Het valt niet uit te sluiten zwemmers hier een bron van betekenis zijn. Er zijn echter ook een jachthaven in de buurt en in de zomermaanden is er de nodige recreatievaart rondom deze locatie. Als andere mogelijke bron wordt ook gewezen naar de RWZI bij Wevershoof (RWS, 2013). Welke bron daadwerkelijk van belang is valt op basis van de hier toegepaste DNA techniek geen uitspraak te doen. Een studie waarbij de complete bacteriologische samenstelling van het water beoordeeld wordt (m.b.v. de DNA techniek NGS), zou meer informatie kunnen verschaffen over mogelijke herkomst van de humane bron. In geval van Wevershoof zou dergelijke informatie gekoppeld kunnen worden aan modelstudies waarin stroming bekeken wordt. Mogelijk dat in geval van de lozing van de RWZI ook de verspreiding van andere tracers beoordeeld kunnen worden, middels een uitgekiend monitoringsplan.

Ook in 2016 zijn de locaties Termunterzijl Strand en de locatie Oude Pol Bijsselsebeek opnieuw meegenomen in dit DNA onderzoek. Het beeld wat op beide locaties te zien valt na meerjarige analyse verschilt enigszins. Op de locatie Termunterzijl blijven herkauwers een bron van betekenis door de jaren heen. Op basis van de DNA resultaten van eerdere jaren heeft men op het terrein waaraan het strand gelegen is (de Waddenzeedijk) maatregelen getroffen om schapen verder van de locatie te houden. Hoewel ook in dit seizoen 2016 de bron herkauwer aantoonbaar blijft, zijn er op deze locatie in het zwemwaterseizoen geen overschrijdingen van de signaalwaarden meer waargenomen.

Op de Oude Pol wisselt de voornaamste bron nog wel eens van vogel naar humaan of herkauwer. Voor de Oude Pol geldt dat zeker de Bijsselsebeek onder invloed lijkt te staan van weersinvloeden. Bij waarschijnlijk hoge afvoer zijn de bronnen humaan en herkauwer prominent aanwezig. Het stroomgebied van de beek staat blijkbaar onder invloed van overstorten en afspoeling. Aanvullend Next Generation Sequencing (NGS) onderzoek (conform Lee *et al.*, 2014) uit 2015 heeft voor deze locatie laten zien dat de bacteriologische samenstelling van het water sterk afwijkt van die op het Eemmeer, waarin zij uitstroomt (Kardinaal, niet gepubliceerd). Echter bij lage afvoer nam de bacteriologische samenstelling op de locatie dezelfde samenstelling aan als op het meer zelf. De invloed van de beek op de zwemwaterlocatie leek minder evident, stroming en verdunning kunnen hier een rol van betekenis spelen.

In eerdere jaren waarin het DNA bronopsporingsonderzoek toegepast is, zijn op diverse locaties bronnen gedetecteerd die de zwemwaterkwaliteit negatief kunnen beïnvloeden. Op een aantal locaties heeft dat geleid tot het nemen van maatregelen gericht op het voorkomen van negatieve invloed van de aangewezen bron. Enkele voorbeelden van dergelijke maatregelen zijn:

- Zwolse hoek (bron vogels): paaltjes verwijderd waarop Aalscholvers rustten, dammetjes geplaatst voor betere doorstroming;
- Kleine Zeetje (bron vogels): waterplanten maaien, bodemprofiel aangepast (betere doorstroming);
- Oude Pol: verjagen + broedbeleid zwanen, verdiepen van de bodem, stroomgebied van Bijsselsebeek laten controleren door Waterschap op foutaansluitingen (er bleek nog 1 boerderij niet aangesloten op het riool);
- Veluwe badstrand (bron vogels): het monsternamepunt is verplaatst, de zwemzone is verkleind, en het bodemprofiel is aangepast (verdiept);
- Erkermeerderstrand (bron honden): verplaatsen meetpunt naar de locatie waar de meeste zwemmers zich bevinden en niet ter hoogte van het hondenstrand
- Oud Valkeveen (bron vogels): vlieger geïnstalleerd voor het verjagen van vogels, strand onderhoud (vogelpoep verwijderen) en verdiepen van het profiel (meer stroming).

Op basis van zwemwaterprofielen van de locaties en de huidige gegevens van de locaties (op Zwemwater.nl, december 2016) kan bekeken worden of de zwemwaterkwaliteit (volgens de beoordelingsmethodiek uit de zwemwaterrichtlijn 2006/7/EG) op de hierboven beschreven locaties veranderd is (zie ook website EEA, 2016). De volgende trends zijn waarneembaar: Veluwe van aanvaardbaar/goed (2011-2014) naar goed (2012-2015); Oude Pol van slecht (2008-2011) naar aanvaardbaar (2012-2015); Kleine Zeetje van slecht (2008-20011) naar goed (2012-2015); Oud Valkeveen van slecht (2017-2010) naar aanvaardbaar (2012-2015); Erkermeerderstrand van goed/uitstekend (2011-2014) naar uitstekend (2012-2015). Op basis van deze gegevens lijkt er sprake van een verbetering van de zwemwaterkwaliteit na het uitvoeren van maatregelen. Een diepgaandere evaluatie waarbij het moment van het uitvoeren van de maatregelen in relatie geplaatst wordt tot de gemeten zwemwaterkwaliteit zou deze veronderstelling kunnen versterken.

4.3 Wel *E. coli* en enterococci, geen bron en vice versa

In 2016 heeft het DNA onderzoek voor alle locaties zich gericht op de vier bronnen humaan, herkauwer, hond en vogels. In nagenoeg alle monsters waarin *E. coli* of enterococci aangetoond zijn, is ook een bron van fecale verontreiniging aangetoond. Op een enkel moment (zoals Nijkerk aan Zee, 12-8-2016) bleek er geen bron te koppelen aan een verhoging of overschrijding van concentraties aan zwemwaterparameters. Dat kan het gevolg zijn van de beperkt aantal bronnen waarop geanalyseerd is. Echter in eerdere jaren is er op geen enkele locatie paarden of varkens als bron aangetoond. Op dit moment is er (nog) geen methode voor knaagdieren beschikbaar, dit zou in theorie nog een bron kunnen zijn. Echter zijn knaagdieren niet aantoonbaar van belang in relatie tot de verontreiniging van zwemwater in relatie tot fecale verontreiniging (Meays *et al.*, 2006). Het aantonen van bruine ratten kan wel van betekenis zijn in verband met het eventueel voorkomen van Leptospirose (ziekte van Weil) op zwemwaterlocaties. Recentelijk is door RWS onderzoek geïnitieerd om DNA technieken in te zetten om pathogene stammen van de Leptospiren op te sporen en te kwantificeren (Goris *et al.*, 2016).

Anderzijds kan het voorkomen van een hoge *E. coli* / enterococci concentratie zonder aanwijsbare bron wijzen op de aanwezigheid van de indicatororganismen die geen fecale oorsprong hebben. Zowel van *E. coli* als van enterococci zijn er indicaties dat de bacteriën (tijdelijk) in sediment kunnen overleven (Whitman, *et al.*, 2014). De mogelijkheid bestaat dat *E. coli* bacteriën van fecale herkomst "naturaliseren", of dat de bacterie zich kan aanpassen aan zijn omgeving en voor langere tijd kan overleven en niet meer terug te voeren zijn op een aantoonbare bron (Ishii *et al.*, 2006). Op momenten dat er peilfluctuaties optreden of er toenemende golfslag is zou met indicatorbacteriën besmet zand in het water terecht kunnen komen. Op locaties waar wel overschrijding van de signaalwaarden van de zwemwaterparameters vaak voorkomt zonder aannemelijke bron, zou het zand van strandjes gemonitord kunnen worden op de aanwezigheid van *E. coli* bacteriën.

Op enkele van de locaties zijn er in 2016 geen overschrijdingen van de signaalwaarden voor de zwemwaterparameters aangetoond, bijvoorbeeld Ritthem Fort Rammekens Badstrand (zie bijlage II). Op deze locatie zijn met behulp van de DNA techniek wel bronnen van fecale verontreiniging aangetoond. Blijkbaar zijn er op dergelijke locaties bronnen die bij kunnen dragen aan fecale verontreiniging, maar die niet leiden tot overschrijdingen. Voor dergelijke locaties is het verstandig om de potentiële bronnen goed in kaart te brengen en te beoordelen onder welke omstandigheden de bron wel van belang kan worden (bijvoorbeeld, bij welke neerslag). Zeker wanneer een heel seizoen de locatie gescreend is op het voorkomen van fecale bronnen met behulp van de DNA merkers valt goed in te schatten of er dynamiek zit in het voorkomen van de bewuste bronnen. Op die manier valt ook beter in te schatten of een bron van belang is voor een locatie en dus of die ook actief buiten beschouwing gelaten kan worden wanneer men tot het definiëren en nemen van maatregelen overgaat.

De diversiteit aan pathogenen in oppervlaktewater loopt uiteen van virussen en bacteriën tot protozoën. Welke pathogenen in het water voorkomen hangt mede af van de bron die verantwoordelijk is voor de verontreiniging met fecaal materiaal. In het geval van humaan fecale verontreiniging zal de kans op gezondheidsklachten veroorzaakt worden door virussen (Soller *et al.*, 2010a), maar ook door bacteriën en (bij oudere verontreinigingen) protozoën, wanneer vogels de voornaamste bron zijn dan zijn bacteriën als *Campylobacter* mogelijke boosdoeners voor de gezondheid (Schoen and Ashbolt, 2010; Soller *et al.*, 2010b). In zowel dit onderzoek als in eerdere DNA onderzoeken naar herkomst van fecaal materiaal in rijkswater (Leenen *et al.*, 2013; Heijnen & Kardinaal, 2013; Kardinaal & Heijnen, 2014 & 2015) zijn vogels en humaan de voornaamste bronnen. Gebleken is dat de relatie tussen de zwemwaterparameters en ziekteverwekkers (en daarmee gezondheidsrisico's) minder sterk zijn wanneer de bron niet van humane origine is. In het geval vogels de aanwijsbare bron zijn kan men overwegen om de normen met betrekking tot die zwemwaterparameters

anders (milder) te interpreteren (U.S. Environmental Protection Agency, 2014). Om een dergelijke aanpak te kunnen onderbouwen zou per locatie een beknopte microbiologische risico analyse (QMRA), als onderdeel van de zwemwaterprofielen, uit moeten wijzen of dit een veilige manier van handelen is.

5 Referenties

- European Environment Agency (2015). European bathing water quality in 2014. EEA Report No 1/2015, ISSN 1977-8449.
- European Environment Agency (2016).
<http://maps.eea.europa.eu/wab/stateofbathingwaters/?appid=0cd9871469ef48c6aa07f198ff5a70e2>
- 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.
- Goris, M., A. Ahmed, E. Kardinaal (2016). Pathogene *Leptospira* in oppervlaktewater. NRL rapport i.o.v. RWS-WVL.
- Heijnen L., K. Learbuch, I. Leenen, S. Rotteveel, H. Ruiters, E. Kardinaal (2014). Fecale verontreiniging in zwemwater identificeren met DNA-merkers. H2O-Online (15 april 2014).
- Heijnen, L., E. Kardinaal (2013). DNA analyse fecale verontreiniging: 2013. Rapportnummer: KWR 2014.005, i.o.v. RWS.
- Heijnen, L., E. Kardinaal, B. Wullings (2012). Robuustheid van qPCR technieken voor de analyse van zwemwater. KWR Rapport i.o.v. RWS Waterdienst.
- 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.
- Ishii S, Ksoll WB, Hicks RE, Sadowsky MJ (2006). Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds. *AEMM*, vol 72, no 1, pp 612-621.
- 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.
- Lee, D. Y., H. Lee, *et al.* (2014). Characterization of sources and loadings of fecal pollutants using microbial source tracking assays in urban and rural areas of the Grand River Watershed, Southwestern Ontario. *Water Research* 53: 121-131.
- 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.

- Meays, C., K. Broersma, R. Nordin, A. Mazumder, M. Samadpour (2006). Spatial and annual variability in concentrations and sources of *Escherichia coli* in multiple watersheds. *Environmental Science & Technology* 40: 5289-5296.
- Rijkswaterstaat IJsselmeergebied (2013) Zwemwaterprofiel Andijk Strand. Actualisatie uitgevoerd door Grontmij / Royal HaskoningDHV in opdracht van Rijkswaterstaat Waterdienst.
- Stuurgroep Water (2013). Beslisnotitie werkwijze individuele metingen en meetfrequentie microbiologische parameters zwemwaterrichtlijn, vastgesteld in de op 14 maart 2013.
- Soller, J.A., T.Bartrand, N.J., Ashbolt, J. Ravenscroft, T.J. Wade (2010a). Estimating the Primary Etiologic Agents in Recreational Freshwaters Impacted by Human Sources of Faecal Contamination. *Water Research* 44(16): 4736-4747.
- Soller, J.A., M.E. Schoen, T. Bartrand, J.Ravenscroft, T.J. Wade (2010b). Estimated Human Health Risks from Exposure to Recreational Waters Impacted by Human and Non-Human Sources of Faecal Contamination. *Water Research* 44(16): 4674-4691.
- Schoen, M.E., N.J. Ashbolt (2010). Assessing Pathogen Risk to Swimmers at Non-sewage Impacted Recreational Beaches. *Environmental Science & Technology* 44: 2286-2291.
- U.S. Environmental Protection Agency (2014). Overview of Technical Support Materials: A Guide to the Site-Specific Alternative Recreational Criteria TSM Documents. EPA-820-R-14-010.
- 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 (2014) Microbes in beach sands: integrating environment, ecology and public health. *Rev Environ Sci Biotechnol*. Sep 1; vol 13, no 3, pp 329-368.

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 2016

Resultaten bronopsporing 2016 en zwemwaterparameters.

Betekenis kleuren in onderstaande tabel.

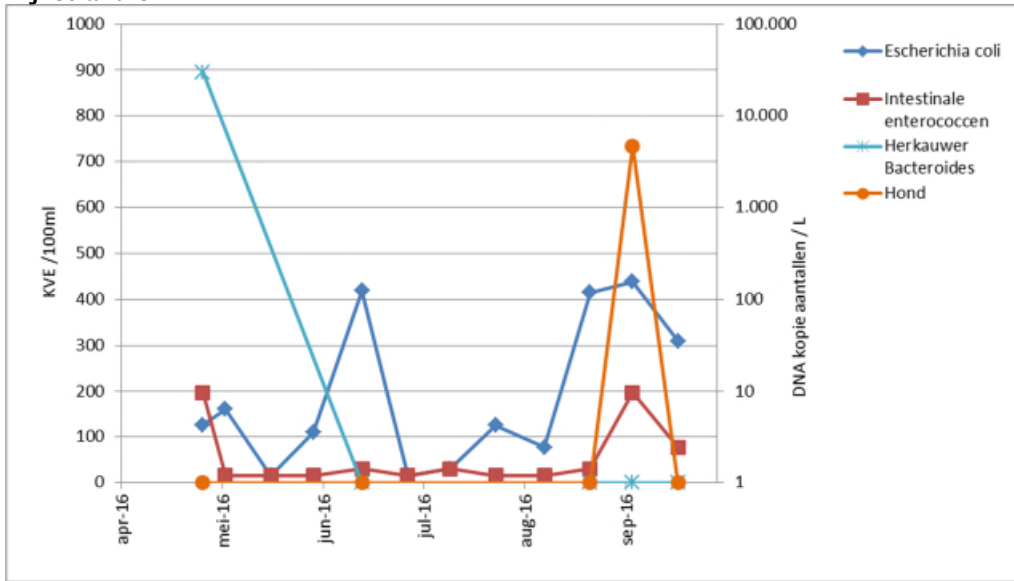
R (%)
Rendement van DNA extractie tussen 10 en 20%
Bronnen van fecale verontreiniging
Positieve concentratie DNA kopie aantallen / L
DNA kopie aantallen beneden detectiegrens
<i>E. coli</i> + enterococcen
Concentratie hoger dan signaalwaarden (1800 resp. 400 kve / 100 ml)
Concentratie verhoogd (tussen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

Datum Monstername	Locatie	Filtratie Volume ml	Rendement	DNA kopie aantallen/L				KVE / 100 ml	
				Humaan Bacteroides	Herkauwer Bacteroides	Hond	Vogel Helicobacter	<i>E. coli</i>	Intestinale enterococci
17-5-2016	De oude Pol extra meetpunt Bijseelsebeek	50	41,3	7,00E+04	4,90E+04	<4,8E+03	1,40E+05	393	46
14-6-2016	De oude Pol extra meetpunt Bijseelsebeek	50	58,0	2,0E+05	1,8E+07	< 3,5E+03	3,8E+04	9043	2640
17-6-2016	De oude Pol extra meetpunt Bijseelsebeek	50	64,3	9,0E+03	2,3E+05	< 3,1E+03	< 1,6E+04	2678	412
28-6-2016	De oude Pol extra meetpunt Bijseelsebeek	50	66,1	9,6E+04	1,9E+04	< 3,0E+03	6,3E+04	882	77
11-7-2016	De oude Pol extra meetpunt Bijseelsebeek	50	52,2	3,1E+05	< 3,8E+03	< 3,8E+03	1,3E+05	1339	215
9-8-2016	De oude Pol extra meetpunt Bijseelsebeek	50	65,6	8,10E+05	8,10E+03	<3,0E+03	8,70E+04	1713	1716
12-8-2016	De oude Pol extra meetpunt Bijseelsebeek	50	56,5	6,10E+03	8,50E+04	7,80E+03	<1,8E+04	654	143
26-4-2016	Lemsterstrand Lemmer	50	63,0	< 3,2E+03	< 3,2E+03	7,5E+04	< 1,6E+04	161	1397
30-5-2016	Lemsterstrand Lemmer	50	62,2	<3,2E+03	<3,2E+03	<3,2E+03	<1,6E+04	253	< 15,0
14-6-2016	Lemsterstrand Lemmer	50	58,9	< 3,4E+03	< 3,4E+03	< 3,4E+03	3,4E+05	94	15
17-5-2016	Nijkerk aan Zee	50	22,4	1,10E+04	<8,9E+03	<8,9E+03	7,60E+05	215	<15
30-5-2016	Nijkerk aan Zee	50	75,9	8,90E+04	<2,6E+03	<2,6E+03	<1,3E+04	127	<15
14-6-2016	Nijkerk aan Zee	50	55,5	<3,6E+03	5,30E+03	<3,6E+03	6,40E+05	397	<15
27-6-2016	Nijkerk aan Zee	50	63,6	< 3,1E+03	< 3,1E+03	< 3,1E+03	2,3E+06	2536	109
11-7-2016	Nijkerk aan Zee	50	55,4	< 3,6E+03	< 3,6E+03	< 3,6E+03	4,7E+05	858	15
26-7-2016	Nijkerk aan Zee	50	57,8	< 3,5E+03	< 3,5E+03	< 3,5E+03	2,5E+04	4277	46
9-8-2016	Nijkerk aan Zee	50	62,7	< 3,2E+03	< 3,2E+03	< 3,2E+03	5,2E+05	9043	15
12-8-2016	Nijkerk aan Zee	50	54	<3,7E+03	<3,7E+03	<3,7E+03	<1,9E+04	1466	15
22-8-2016	Nijkerk aan Zee	50	57,7	<3,5E+03	<3,5E+03	<3,5E+03	2,30E+06	1633	61
5-9-2016	Nijkerk aan Zee	50	66,5	<3,0E+03	1,30E+04	<3,0E+03	7,10E+05	955	46
20-9-2016	Nijkerk aan Zee	50	52,1	<3,8E+03	<3,8E+03	<3,8E+03	5,90E+05	1673	15
10-5-2016	Ritthem fort Rammekens badstrand	100	68,4	4,50E+03	<1,5E+03	1,50E+04	<7,3E+03	140	30
2-8-2016	Ritthem fort Rammekens badstrand	150	43,8	1,10E+05	<1,5E+03	3,70E+03	<7,6E+03	230	30
12-9-2016	Ritthem fort Rammekens badstrand	200	59,3	<840	<840	<840	<4,2E+03	30	< 15,0
12-7-2016	Strand Edam	50	56,9	8,10E+03	<3,5E+03	<3,5E+03	8,00E+04	179	< 15,0
8-8-2016	Strand Edam	50	63,3	8,00E+03	<3,2E+03	4,80E+03	<1,6E+04	143	30
6-9-2016	Strand Edam	50	65,5	1,60E+04	<3,1E+03	<3,1E+03	<1,5E+04	144	< 15,0
31-5-2016	Strand Schardam	50	63,8	<3,1E+03	<3,1E+03	<3,1E+03	<1,6E+04	272	30
6-9-2016	Strand Schardam	50	62,8	<3,2E+03	<3,2E+03	<3,2E+03	<1,6E+04	253	< 15,0
20-9-2016	Strand Schardam	50	58	<3,4E+03	<3,4E+03	<3,4E+03	4,50E+04	234	< 15,0
26-4-2016	Urk Dijkstrand	50	10,3	<1,9E+04	3,00E+04	<1,9E+04	<9,7E+04	127	197
14-6-2016	Urk Dijkstrand	50	58,0	< 3,4E+03	< 3,4E+03	< 3,4E+03	< 1,7E+04	419	30
23-8-2016	Urk Dijkstrand	50	42,8	<4,7E+03	<4,7E+03	<4,7E+03	<2,3E+04	415	30
5-9-2016	Urk Dijkstrand	50	50,7	<3,9E+03	<3,9E+03	4,70E+03	<2,0E+04	438	197
19-9-2016	Urk Dijkstrand	50	54,4	<3,7E+03	<3,7E+03	<3,7E+03	<1,8E+04	309	77
27-6-2016	Vooroever koopmanspolder	50	62,8	6,40E+03	<3,2E+03	2,00E+04	<1,0E+04	194	< 15,0
12-7-2016	Vooroever koopmanspolder	50	68	2,80E+03	<2,9E+03	4,80E+03	<1,5E+04	110	127
22-8-2016	Vooroever koopmanspolder	50	50,5	1,50E+06	<4,0E+03	<4,0E+03	<2,0E+04	509	15
18-4-2016	Zeestrand Termunten, Termunterzijl buitendijk	100	70	2,90E+04	9,50E+03	<1,4E+03	1,00E+04	110	< 15,0
17-5-2016	Zeestrand Termunten, Termunterzijl buitendijk	100	51,0	< 2,0E+03	4,1E+03	3,9E+03	1,4E+05	606	126
18-7-2016	Zeestrand Termunten, Termunterzijl buitendijk	100	66,7	7,5E+03	1,6E+04	< 1,5E+03	<7,5E+03	415	94
1-8-2016	Zeestrand termunten, Termunterzijl buitendijks	100	88,6	5,50E+03	<1,1E+03	<1,1E+03	<5,6E+03	234	179
30-8-2016	Zeestrand termunten, Termunterzijl buitendijks	100	571	1,70E+04	3,20E+03	<1,0E+03	<5,0E+03	197	< 15,0
8-8-2016	Zwembad Wårder	50	55,5	<3,6E+03	<3,6E+03	5,10E+03	<1,8E+04	61	< 15,0
6-9-2016	Zwembad Wårder	50	65,9	<3,0E+03	<3,0E+03	<3,0E+03	<1,5E+04	683	< 15,0
20-9-2016	Zwembad Wårder	50	58,8	3,50E+03	<3,4E+03	<3,4E+03	<1,7E+04	144	< 15,0

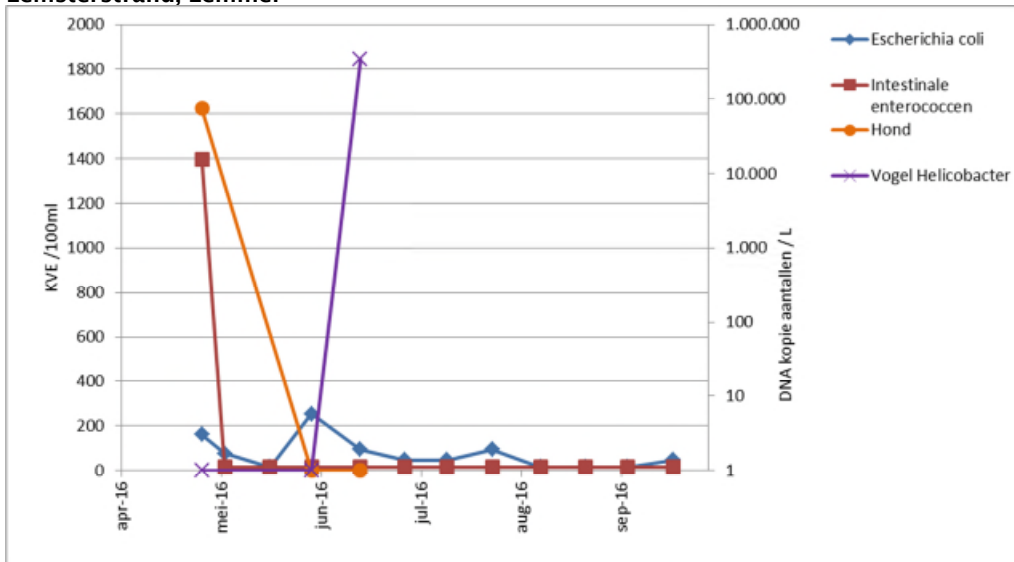
Datum Monstername	Locatie	Filtratie Volume ml	Rendement	DNA kopie aantallen/L				KVE / 100 ml	
				Humaan Bacteroides	Herkauwer Bacteroides	Hond	Vogel Helicobacter	<i>E. coli</i>	Intestinale enterococci
18-4-2016	Blanco 18-4-2016	100	67,9	<1,5E+03	<1,5E+03	<1,5E+03	<7,4E+03	nvt	nvt
28-4-2016	Blanco 28-4-2016	50	32,6	< 6,1E+03	< 6,1E+03	< 6,1E+03	< 3,1E+04	nvt	nvt
11-5-2016	Blanco 11-5-2016	100	64,9	<1,5E+03	<1,5E+03	<1,5E+03	<7,7E+03	nvt	nvt
17-5-2016	Blanco 17-5-2016	100	38,1	< 2,6E+03	< 2,6E+03	< 2,6E+03	< 1,3E+04	nvt	nvt
19-5-2016	Blanco 19-5-2016	50	23,7	<8,4E+03	<8,4E+03	<8,4E+03	<4,2E+04	nvt	nvt
2-6-2016	Blanco 2-6-2016	50	36,2	<5,5E+03	<5,5E+03	<5,5E+03	<2,8E+04	nvt	nvt
15-6-2016	Blanco 15-6-2016	50	28,0	< 7,1E+03	< 7,1E+03	< 7,1E+03	< 3,6E+04	nvt	nvt
30-6-2016	Blanco 30-6-2016	50	41,8	< 4,8E+03	< 4,8E+03	< 4,8E+03	< 3,8E+03	nvt	nvt
14-7-2016	Blanco 14-7-2016	50	33,4	< 6,0E+03	< 6,0E+03	< 6,0E+03	< 3,0E+04	nvt	nvt
18-7-2016	Blanco 18-7-2016	100	51,6	< 1,9E+03	< 1,9E+03	< 1,9E+03	< 9,7E+03	nvt	nvt
28-7-2016	Blanco 28-7-2016	50	25,8	< 7,8E+03	< 7,8E+03	< 7,8E+03	< 3,9E+04	nvt	nvt
1-8-2016	Blanco 1-8-2016	100	62,6	<1,6E+03	<1,6E+03	<1,6E+03	<8,0E+03	nvt	nvt
3-8-2016	Blanco 03-8-2016	100	55,5	<1,8E+03	<1,8E+03	<1,8E+03	<9,0E+03	nvt	nvt
11-8-2016	Blanco 11-8-2016	50	28,9	< 6,9E+03	< 6,9E+03	< 6,9E+03	< 3,5E+04	nvt	nvt
24-8-2016	Blanco 24-8-2016	50	41,8	<4,8E+03	<4,8E+03	<4,8E+03	<2,4E+04	nvt	nvt
30-8-2016	Blanco 30-8-2016	100	255,6	<1,0E+03	<1,0E+03	<1,0E+03	<5,0E+03	nvt	nvt
7-9-2016	Blanco 7-9-2016	50	39,8	<5,0E+03	<5,0E+03	<5,0E+03	<2,5E+04	nvt	nvt
13-9-2016	Blanco 13-9-2016	100	43,2	<2,3E+03	<2,3E+03	<2,3E+03	<1,2E+04	nvt	nvt
21-9-2016	Blanco 21-9-2016	50	50,1	<4,0E+03	<4,0E+03	<4,0E+03	<2,0E+04	nvt	nvt

Bijlage III Grafieken per locatie 2016

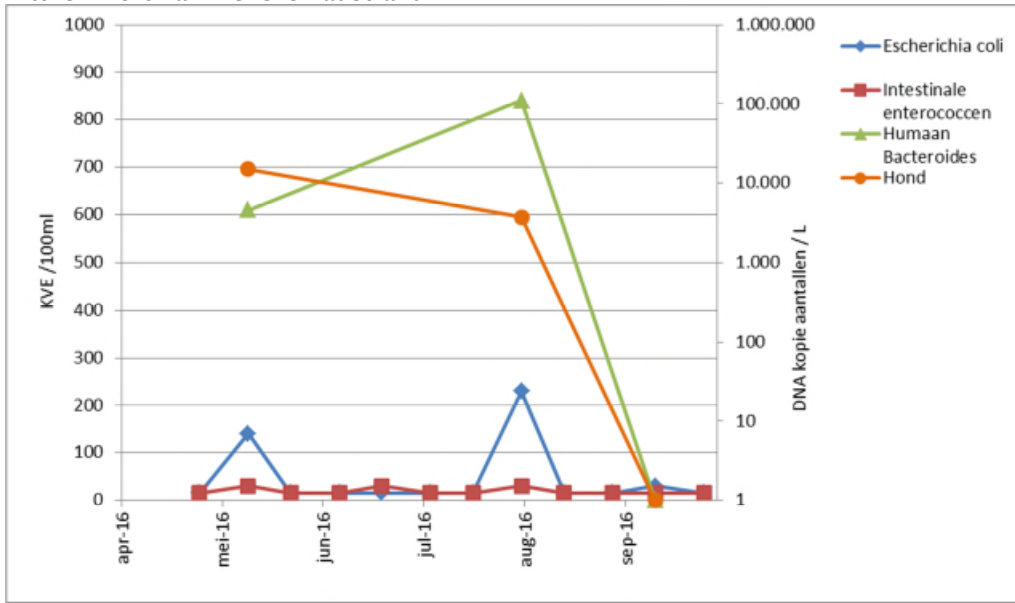
Dijkstrand Urk



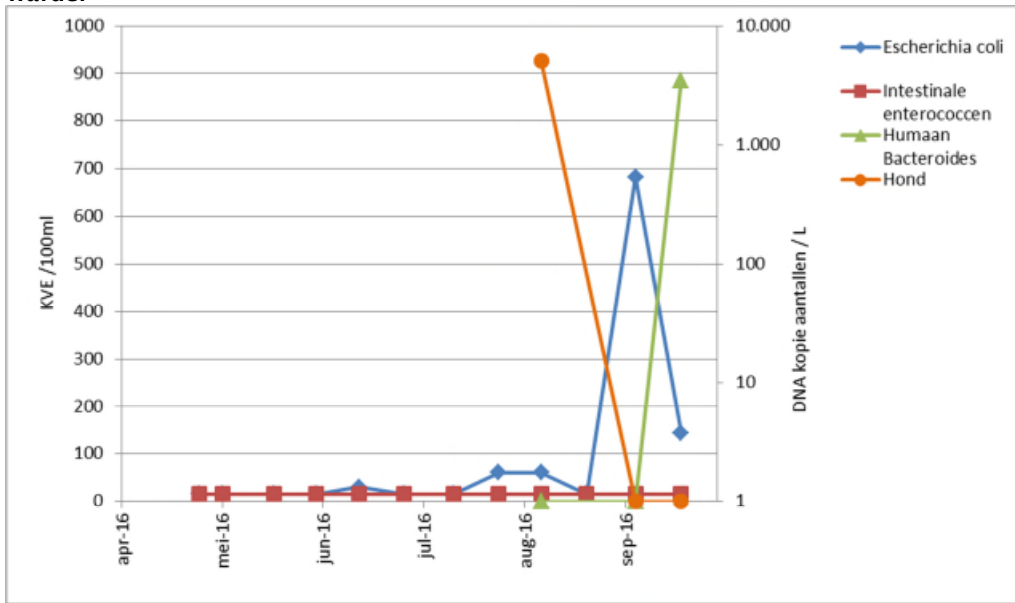
Lemsterstrand, Lemmer



Ritthem Fort Rammekens Badstrand



Warder



Schardam

