

## Fecale verontreiniging in zwemwater identificeren met DNA-merkers

*Leo Heijnen, Kimberly Learbuch, Edwin Kardinaal (KWR), Serge Rotteveel, Hans Ruiter (Rijkswaterstaat, WVL), Imke Leenen (Grontmij)*

DNA-merkers, waarmee de herkomst van fecale verontreinigingen kan worden achterhaald, geven beheerders van zwemwater de mogelijkheid om beter inzicht te krijgen in de relevante vervuilingsbronnen. Hierdoor kunnen ze gerichte maatregelen nemen ter verbetering van de zwemwaterkwaliteit en daarmee voldoen aan de eisen die de zwemwaterrichtlijn van de EU stelt. Met de in dit onderzoek ontwikkelde DNA-merkers blijkt het mogelijk fecale verontreinigingen te identificeren als afkomstig van mensen, vogels, honden, varkens, herkauwers (als groep met o.a. schapen, hertachtigen & koeien) en specifiek runderen. Deze merkers zijn met succes toegepast bij door Rijkswaterstaat beheerde zwemwaterlocaties.

Conform de zwemwaterrichtlijn van de EU worden zwemwaterlocaties – op basis van de concentraties aan fecale indicatoren (*E. coli* en intestinale enterococcen) – ingedeeld in vier kwaliteitsklassen: slecht, aanvaardbaar, goed of uitstekend. Veruit de meeste Nederlandse zwemwaterlocaties scoren in de klasse ‘goed’ of ‘uitstekend’. Een beperkt aantal locaties scoort momenteel ‘slecht’. De beoordeling van zwemwaterlocaties vindt plaats op basis van periodieke metingen van de concentratie *E. coli* en intestinale enterococcen in het water. Deze indicatorbacteriën komen algemeen voor in darmen van warmbloedige dieren. Zij geven een indruk van de concentratie fecaal materiaal in water en daarmee de mogelijke aanwezigheid van ziekteverwekkende micro-organismen. Bekende bronnen van fecale verontreiniging in oppervlaktewater zijn o.a.: de aanwezigheid van (water)vogels, vervuiling door recreanten, afspoeling van agrarisch gebied, effluentlozing door RWZI's, overstorting uit rioolwater- of hemelwaterriolering, aanwezigheid van wilde fauna en afspoeling van honden feces (zie afbeelding 1).



**Afbeelding 1. Illustratie van verscheidene bronnen die de zwemwaterkwaliteit kunnen beïnvloeden.**

De EU zwemwaterrichtlijn eist dat alle zwemwaterlocaties in 2015 tenminste een 'aanvaardbare' kwaliteit hebben. Voor 'slechte' locaties zijn daarom maatregelen noodzakelijk waarmee de fecale besmetting van het zwemwater wordt beperkt. Om gericht maatregelen te kunnen treffen is het van belang inzicht te hebben in de bronnen van fecale besmetting per locatie.

De standaard zwemwaterparameters (*E. coli* en intestinale enterococci) geven dit inzicht niet. In dit onderzoek zijn daarom specifieke DNA-merkers ontwikkeld en toegepast waarmee fecale verontreinigingen, afkomstig van verschillende diergroepen, zijn te onderscheiden. Deze methode is ingezet om de herkomst van fecale besmettingen op negentien zwemwaterlocaties (in beheer bij Rijkswaterstaat) te achterhalen. Op deze locaties zijn in de afgelopen jaren geregeld overschrijdingen van de zwemwaternormen gesignaleerd. Dit onderzoek is gedeeltelijk uitgevoerd in opdracht van Rijkswaterstaat [1] en mede geïnitieerd vanuit het gezamenlijke onderzoeksprogramma van de drinkwaterbedrijven (BTO).

### ***DNA-methode voor opsporing van fecale besmettingsbronnen***

Als gevolg van genetische en morfologische verschillen en een specifiek voedselpatroon zijn er grote verschillen in de samenstelling van de darmflora van verschillende diersoorten.

Per diergroep zijn er bacterietypen geïdentificeerd die alleen in de darmflora van deze specifieke diergroep voorkomen. Deze bacterietypen zijn bruikbaar om de bron van een fecale verontreiniging te achterhalen. *Bacteroides* bacteriën worden in dit verband vaak gebruikt [2, 3, 4], maar toepassing van andere bacteriën is ook mogelijk [5, 6, 7]. Een kenmerkend DNA-fragment (merker) van de betrokken bacterie kan worden vermeerderd en gekwantificeerd [8]. Zo kan worden bepaald of de fecaliën afkomstig zijn van mensen, vogels, varkens, herkauwers (als groep) of specifiek runderen (uit de groep van herkauwers). Voor honden was het niet mogelijk om een specifieke merker te ontwikkelen voor detectie van fecale bacteriën, en is er gekozen voor een merker op basis van honden-DNA [9]. Dit is mogelijk doordat er hoge concentraties darmepitheelcellen in feces aanwezig zijn. Detectie van honden-DNA is daardoor een sterke aanwijzing voor de aanwezigheid van fecaal materiaal van honden.

Snel en specifiek detecteren en kwantificeren van de merkers is mogelijk door quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). Deze methode gebruikt synthetische DNA-moleculen om in een enzymatische reactie een kenmerkend DNA-fragment (de merker) zeer selectief te vermeerderen en detecteren. De eigenschappen van de verschillende merkers zijn onderzocht door de aanwezigheid en concentratie ervan te bepalen in een groot aantal fecesmonsters, afkomstig van de doelgroepen. Dit onderzoek maakt duidelijk dat de merkers inderdaad specifiek zijn en in hoge concentraties voorkomen in feces van de diersoort waarvoor ze zijn ontwikkeld (tabel 1). Sporadisch worden ook merkers gedetecteerd in feces van diersoorten waarin ze niet worden verwacht, maar in die gevallen bleken de merkerconcentraties zeer laag te zijn. De methode kan dus diergroepspecifieke merkers zeer gevoelig en specifiek aantonen. Om de toepasbaarheid van deze methode voor de analyse van oppervlaktewater te onderzoeken zijn gedurende de zwemseizoenen van 2012 en 2013 op grote schaal watermonsters geanalyseerd van negentien door Rijkswaterstaat beheerde zwemwaterlocaties.

**Tabel 1. Matrix die de gemiddelde concentraties weergeeft van de diergroep-specifieke merkers in de feces van verschillende diersoorten (aantal DNA-kopieën per mg feces) en het percentage fecesmonsters waarin de betreffende merker is aangetoond (% positief)**

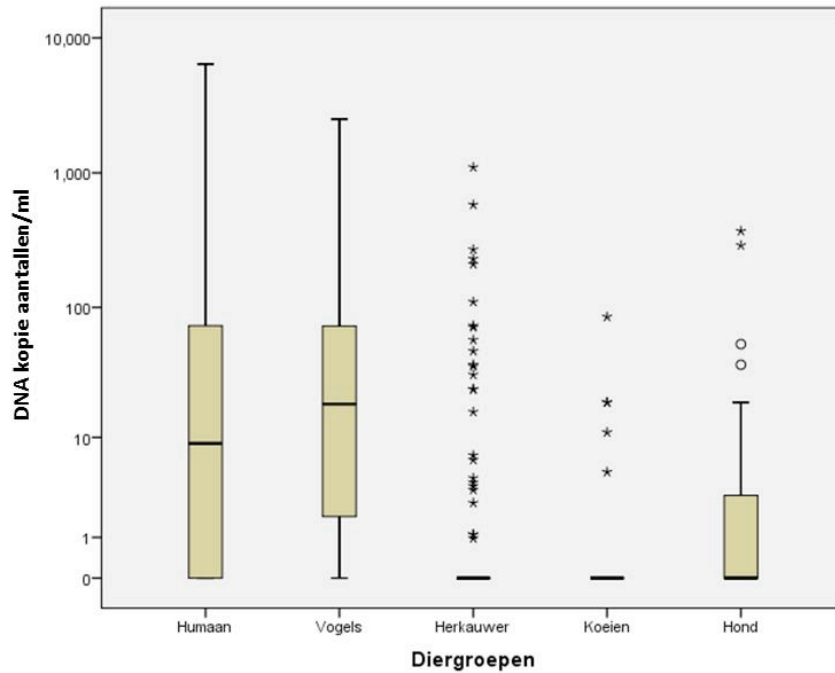
De hondenmerkers zijn niet toegepast op feces van varkens, en de merkers van overige diergroepen zijn niet toegepast op feces van honden (ng)

Diergroep →		Mensen (n=187)	Schapen (n=74)	Reeën en Herten (n=112)	Runderen (n=247)	Varkens (n=168)	Vogels (n=138)	Honden (n=45)
Mensen	Concentratie:	$2,2 \times 10^7$	0	$1,1 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$	$3,0 \times 10^{-2}$	0	ng
	% positief:	78,1	0	1,8	1,6	1,8	0	
Herkauwers	Concentratie:	$1,1 \times 10^1$	$1,4 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$	$1,6 \times 10^{-3}$	$6,7 \times 10^1$	ng
	% positief:	2,7	90,5	98,2	99,2	0,5	1,4	
Runderen	Concentratie:	0	0	0	$8,9 \times 10^4$	0	0	ng
	% positief:	0	0	0	85,4	0	0	
Varkens	Concentratie:	0	0	0	0	$4,6 \times 10^5$	0	ng
	% positief:	0	0	0	0	99,4	0	
Vogels	Concentratie:	$4,2 \times 10^{-2}$	$4,9 \times 10^{-1}$	$1,3 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-1}$	$4,4 \times 10^0$	$2,4 \times 10^7$	ng
	% positief:	0,5	17,3	8	43,7	7,7	89,1	
Honden	Concentratie:	0	0	0	$4,8 \times 10^0$	ng	0	$8,4 \times 10^5$
	% positief:	0	0	0	6,3		0	100

#### **Praktijktoepassing: analyse van zwemwater van verschillende locaties**

Bij deze negentien zwemwaterlocaties zijn in 2012 tweewekelijks watermonsters genomen. De monsters zijn geanalyseerd op *E. coli* en intestinale enterococci (beide met kweek), en op de eerder genoemde diergroep-specifieke fecale merkers voor mensen, vogels, herkauwers, runderen en varkens. Bij de monstersserie van 2013 zijn de concentraties diergroep-specifieke merkers alleen bepaald in monsters waarin verhoogde concentraties *E. coli* en/of intestinale enterococci werden waargenomen. Deze monsters zijn bovendien op de hond-specifieke merker getest.

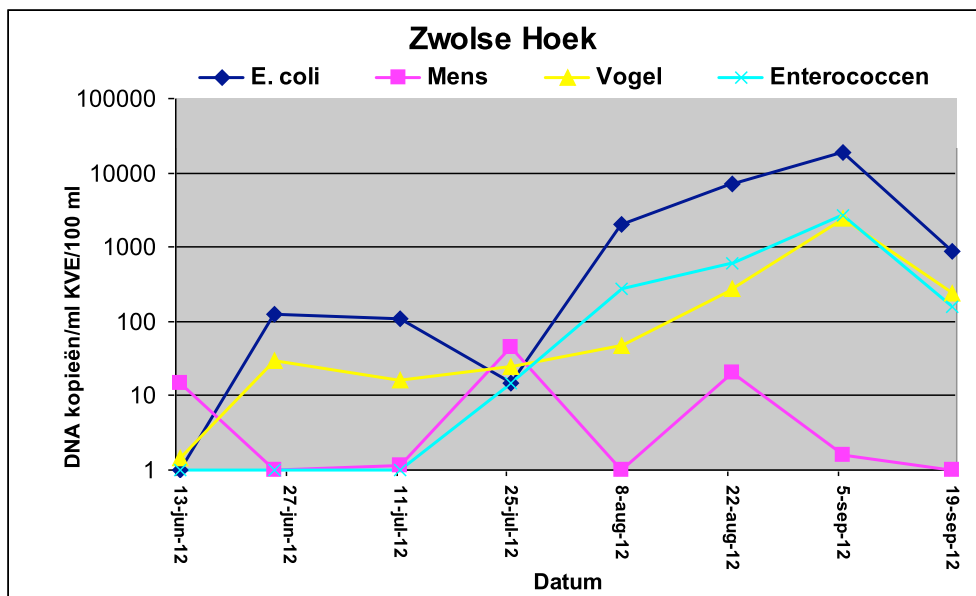
Afbeelding 2 illustreert in welke concentraties de diverse diergroep-specifieke merkers in het oppervlaktewater aangetroffen zijn. Duidelijk is dat de concentraties van merkers afkomstig van vogels en mensen het hoogst zijn. Voor herkauwers, koeien en honden liggen die concentraties lager en deze merkers worden slechts in een klein deel van de onderzochte monsters aangetroffen. De spreiding rondom de mediaan is voor elke merker nogal groot.



**Afbeelding 2. Spreiding van de concentraties van de diverse doelorganismen (in DNA-kopieën per ml) zoals gemeten in het oppervlaktewater van RWS-zwemwaterlocaties**

De horizontale zwarte strepen zijn de medianen, de grijze box de 25-percentiel, de verticale lijnen de 75-percentiel en de cirkels en sterretjes de mogelijke c.q. waarschijnlijke uitbijters.

Afbeelding 3 geeft bij wijze van voorbeeld de analyseresultaten voor *E. coli*, intestinale enterococci en diergroepspecifieke merkers (afkomstig van vogels en mensen) van monsters van locatie 'Zwolsche Hoek'.



**Afbeelding 3. Het verloop van de concentraties *E. coli* en intestinale enterococci (in kolonievormende eenheden (KVE) per 100 ml) en mensspecifieke en vogelspecifieke DNA-merkers (in DNA-kopieën per ml) bij zwemwaterlocatie 'Zwolsche Hoek' tijdens het zwemseizoen van 2012**

In deze watermonsters zijn geen DNA-merkers van fecale bacteriën van varkens, runderen en herkauwers aangetroffen. De concentraties *E. coli* en intestinale enterococci overschrijden de richtwaarde (1000 KVE/100 ml voor *E. coli* en 400 KVE/100 ml voor intestinale enterococci) op de monsters van 8 augustus, 22 augustus en 5 september. De concentraties vogelspecifieke fecale merkers volgen een vergelijkbare trend: verhoogde concentraties op 8 augustus, 22 augustus en 5 september. Dit maakt het waarschijnlijk dat vogels een belangrijke bijdrage leveren aan de overschrijdingen van *E. coli* en intestinale enterococci. Lage concentraties van de mens-specifieke merker worden waargenomen in de monsters van 13 juni, 25 juli en 22 augustus, er zijn in die monsters echter geen verhoogde concentraties *E. coli* en enterococci waargenomen. Dit geeft aan dat menselijke fecale verontreinigingsbronnen op deze locatie weliswaar aanwezig kunnen zijn, maar dat ze in deze meetserie niet hebben geresulteerd in verhoogde concentraties *E. coli* en intestinale enterococci.

De analyseresultaten van monsters van de andere locaties (samengevat in tabel 2) laten zien dat merkers voor de aanwezigheid van fecale bacteriën van vogels bij vrijwel alle locaties aanwezig zijn. Dit is in overeenstemming met observaties van locatiebeheerders en veldmedewerkers die op deze locaties regelmatig grote aantallen watervogels waarnemen.

**Tabel 2. De met de DNA-merkers aangetoonde fecale besmettingen in water van 19 Nederlandse zwemwaterlocaties**

Locatie	Aangetoonde fecale verontreinigingsbronnen (nb = niet bepaald)	
	2012	2013
Broekerhaven	vogels, soms mensen	koeien
De Neswaarden	nb	mensen, herkauwers, vogels
De Oude Pol 1	vogels, soms mensen, sporadisch herkauwers	koeien, herkauwers
De Oude Pol 2, Bijsselschebeek	nb	vogels
De Rietschoof	nb	honden, vogels
Dolfinarium (Harderwijk)	vogels, soms mensen	nb
Erkermederstrand	nb	honden, vogels
It Soal	nb	vogels, herkauwers
Nieuw Hulckensteyn	vogels, soms mensen	vogels
Oud Valkeveen (Naarden)	vogels	nb
Recreatieoord Veluwe strandbad	vogels, soms mensen	vogels
Recreatiepark 't Kleine Zeetje	vogels, soms mensen	vogels
Riviera Beach Zuid	vogels, soms mensen	vogels
Termunterzijlstrand	nb	herkauwers
Vooroever Andijk	nb	mensen, vogels
Vooroever Vlietsingel (Medemblik)	vogels, soms mensen	vogels, soms mensen
Wijksewaard	nb	vogels
Zeestrand Eemshotel, Delfzijl	nb	herkauwers, honden
Zwolsche Hoek (Noordoostpolder)	vogels, soms mensen	nb

Bij een aantal locaties wordt soms DNA van fecale bacteriën van mensen aangetoond. Deze aanwezigheid kan meestal worden verklaard door de aanwezigheid van een jachthaven, recreatie- en beroepsvaart, intensief recreatief gebruik, riooloverstorten of een rwzi in de nabijheid van deze zwemwaterlocaties. Bij een aantal locaties worden ook fecale bacteriën van herkauwers (en soms ook specifiek runderen) gedetecteerd. Dit is logisch, gezien de aanwezigheid van agrarisch gebied in de nabijheid van de zwemwaterlocatie of de aanwezigheid van sloten die door agrarisch gebied stromen en uitmonden in de buurt van de zwemwaterlocatie. Het water van dergelijke locaties of van de sloten raakt mogelijk besmet door afspoeling van feces van vee.

Door locatiebeheerders worden honden ook regelmatig genoemd als mogelijke bron voor fecale verontreiniging van zwemwater. Veel honden worden uitgelaten in de nabijheid van zwemwaterlocaties en bij sommige zwemwaterlocaties worden honden zelfs toegestaan of gedoogd op het zwemstrand en in het water. In 2013 is een methode ontwikkeld waarmee het DNA van honden specifiek kan worden aangetoond. Toepassing van deze methode op monsters afkomstig van diverse locaties laat zien dat honden op 3 van de 16 locaties een bron van betekenis zijn. Bij de locatie met de hoogste concentratie hond-specifieke merkers in het water (Erkermederstrand) wordt het strand geëxploiteerd als 'hondenstrand' waar honden vrije toegang hebben tot het zwemwater.

### ***Vogelwerende maatregelen***

Aangezien vogels op veel locaties een belangrijke bijdrage lijken te leveren aan de slechte zwemwaterkwaliteit is in een studie van Grontmij in samenwerking met KWR het gedrag van vogels en de ervaringen met vogelwerende maatregelen in beeld gebracht [1]. De studie is gebaseerd op literatuur en interviews. Verschillende maatregelen zijn beschikbaar om vogels te verjagen of het verblijf van vogels op een zwemwaterlocatie te beperken. Van belang is dat maatregelen continue worden toegepast en dat er variatie wordt aangebracht in het type maatregel. Vogels leren namelijk snel en wennen gemakkelijk aan nieuwe situaties. Om goede maatregelen te kunnen nemen is het van belang in kaart te hebben wat het gedrag van de vogels op de locatie is en om welke volgelsoorten het gaat.

Eventuele maatregelen kunnen opgedeeld worden in inrichtingsmaatregelen, aantal-regulatie, verstoring en het aanbieden van een alternatieve verblijfslocatie.

Bij inrichtingsmaatregelen op zwemwaterlocaties kan gedacht worden aan: gebruik van een ander type gras op ligweiden (schraal gras), het lokaal beheren van waterplanten, verdiepen van de zwemzone (zorgt voor minder waterplanten en daardoor minder voedsel voor vogels), het toepassen van lage beplanting rondom het strand en het (deels) afschermen van de zwemzone. Bij meeuwen is het zeker van belang dat er geen etensresten op het strand of in het water aanwezig zijn of worden achtergelaten.

Bij aantal-regulatie valt te denken aan jacht, het rapen van eieren en eieren schudden. Dergelijke acties zijn weinig succesvol gebleken en worden daarom niet als geschikte opties gezien. Het vangen van ganzen in combinatie met vergassen is in strijd met de wetgeving en daarom geen optie. Bij verstoring geldt dat het inzetten van roofvogels, honden en vossen wel een geschikte actie is voor sommige vogelsoorten. Ook het toepassen van linten of vlaggen

werkt, mits er voldoende wind is om de vlaggen of linten te laten bewegen. Het toepassen van geluidssignalen wordt niet als een bruikbare optie gezien. Ook bij het toepassen van chemische afweermiddelen zijn vraagtekens te zetten.

Uit de interviews bleek dat met betrekking tot het succes van het aanbieden van een alternatieve locatie de ervaringen uiteenlopend zijn [1]. Het alleen aanbieden van een alternatieve locatie lijkt onvoldoende, maar in combinatie met verstoring of het onaanvaardbaar maken van de zwemwaterlocatie wordt dit wel als kansrijke maatregel gezien. Van belang is dat de alternatieve locatie specifiek voor vogels wordt ingericht en voldoende rustig is. De afstand tussen de zwemwaterlocatie en de alternatieve locatie speelt hierbij een rol van belang, deze afstand mag niet te groot zijn.

### ***Conclusies en aanbevelingen***

Dit onderzoek laat zien dat de ontwikkelde DNA-merkers geschikt zijn voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen in Nederlands oppervlaktewater. Er zijn merkers ontwikkeld voor mensen, herkauwers (als groep), runderen, varkens, vogels en honden. Met deze merkerset is een redelijk volledig beeld te krijgen van de meest relevante bronnen van fecale vervuiling bij zwemwaterlocaties. De merkers blijken in hoge concentraties aanwezig te zijn in feces van de diergroepen waarvoor de merkers bedoeld zijn en ze zijn afwezig, of in zeer lage concentraties aanwezig, in de feces van andere diergroepen. Hierdoor kunnen fecale verontreinigingen zeer gevoelig worden aangetoond en kunnen verschillende diergroepen zeer specifiek worden onderscheiden. Mogelijk dat ook andere dieren, zoals paarden, konijnen en knaagdieren bij bepaalde zwemwaterlocaties een rol kunnen spelen als bron van fecale verontreiniging. Voor specifieke detectie van feces van deze diersoorten zijn echter nog geen merkers beschikbaar. Het is aan te bevelen om deze te ontwikkelen. Vooral paarden worden door beheerders van zwemwaterlocaties regelmatig genoemd als mogelijke bron.

Doordat met deze methode de bronnen van fecale besmettingen kunnen worden geïdentificeerd kunnen nu ook gerichte maatregelen genomen worden om de waterkwaliteit te verbeteren. Bij veel van de onderzochte locaties blijken vooral vogels de kwaliteit van het zwemwater te beïnvloeden. Zij zijn echter niet de enige bron van vervuiling; de monsters laten zien dat ook andere bronnen (mensen, herkauwers, runderen en honden) een bijdrage leveren. Deze nieuwe methode kan ook waardevol zijn voor onderzoek in de drinkwaterwereld. De snelheid en de mogelijkheid om besmettingsbronnen te identificeren maakt het mogelijk om snel en gericht actie te ondernemen als tijdens de productie of distributie van drinkwater fecale besmettingen worden aangetroffen. Ook kan de methode een beter inzicht geven in de risico's van fecale besmettingen. In het gezamenlijke onderzoek van de duinwaterbedrijven (DPW) en van de drinkwaterbedrijven (BTO) zal onderzocht worden in hoeverre deze methode ook toegepast kan worden in het drinkwateronderzoek.

## Literatuur

1. I. Leenen, M. Maessen, L. Heijnen, E. Kardinaal, 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* (2013).
2. A. E. Bernhard, K. G. Field, Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Applied and environmental microbiology* 66, 1587 (2000).
3. S. Mieszkin, J. F. Yala, R. Joubrel, M. Gourmelon, Phylogenetic analysis of Bacteroidales 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. *J Appl Microbiol* 108, 974 (2010).
4. S. Mieszkin, J. P. Furet, G. Corthier, M. Gourmelon, Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific Bacteroidales 16S rRNA genetic markers. *Applied and environmental microbiology* 75, 3045 (2009).
5. P. Roslev, A. S. Bukh, State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. *Appl Microbiol Biotechnol* 89, 1341 (Mar, 2011).
6. O. C. Shanks *et al.*, Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution. *Applied and environmental microbiology* 74, 745 (2008).
7. H. C. Green, L. K. Dick, B. Gilpin, M. Samadpour, K. G. Field, Genetic markers for rapid PCR-based identification of gull, Canada goose, duck, and chicken fecal contamination in water. *Applied and environmental microbiology* 78, 503 (2012).
8. L. Heijnen, K. Learbuch, Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen *BTO rapport* BTO 2013.014, (2013).
9. J. M. Caldwell, M. E. Raley, J. F. Levine, Mitochondrial multiplex real-time PCR as a source tracking method in fecal-contaminated effluents. *Environ Sci Technol* 41, 3277 (2007).