



KWR | April 2016

**Toepassing
inventarisatie
protocol
“*Verspreiding van
fecaliën*” bij
productielocatie
Ouddorp (Evides)**

Toepassing inventarisatieprotocol "Verspreiding van fecaliën in DPWE - waterwingebieden"

KWR | Februari 2016

Opdrachtnummer

400911/001/016

Rapportnummer

KWR 2016.019

Projectmanager

Martin de Haan/Edu Dorland

Opdrachtgever

DPWE

Kwaliteitsborger(s)

Flip Witte/Han Runhaar/Gertjan Medema

Auteurs

Edu Dorland en Leo Heijnen (KWR)
met medewerking van Marten Annema en
Trudy Suylen (Evides)

Verzonden aan

DPWE bedrijven

Jaar van publicatie
2016

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



KWR | April 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.

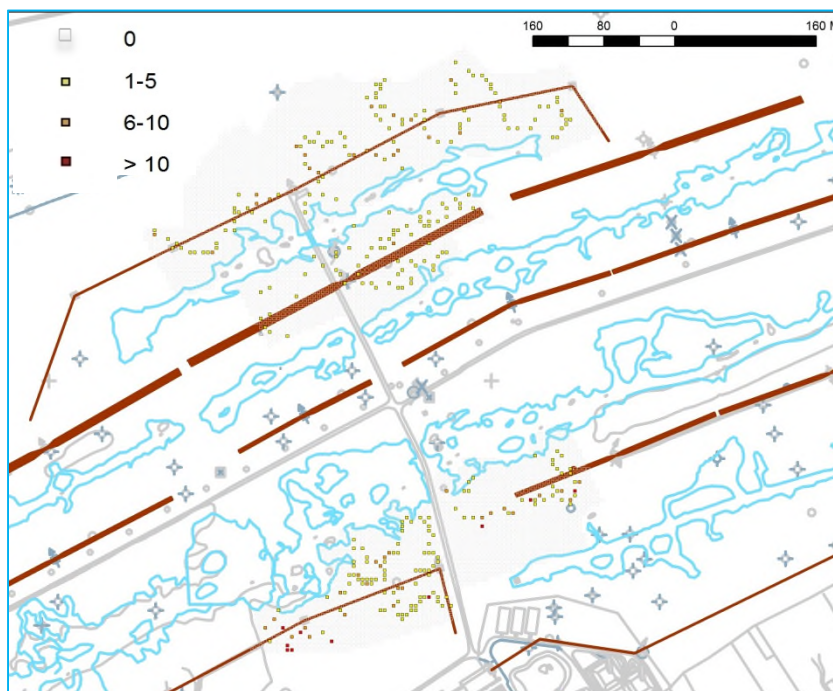
KWR Managementsamenvatting

Verspreiding fecaliën in productielocatie Ouddorp in kaart gebracht

Auteurs

Edu Dorland en Leo Heijnen (KWR), met medewerking van Marten Annema en Trudy Suylen (Evides)

Het potentiële infectierisico in duindrinkwatergebieden wordt o.a. bepaald door de verspreiding van fecaliën in ruimte en tijd en door de aanwezigheid van pathogenen in deze feces. Voor productielocatie Ouddorp is middels vier inventarisatierondes vastgesteld dat de fecale belasting door runderen, ganzen en – in mindere mate – konijnen het grootst is. Feces van overige bronnen, zoals mensen en honden, is zeer beperkt. In feces van deze diersoorten zijn hoge concentraties *Campylobacter*, *Escherichia coli* en enterococci aanwezig. De resultaten van dit onderzoek kunnen worden gebruikt in modellen die infectierisico's bepalen en kunnen bijdragen aan optimalisatie van het gevoerde beheer van dergelijke gebieden.



Verspreiding van runderfecaliën in productielocatie Ouddorp in de periode juni 2014-maart 2015.

Belang: Kennis van mestverspreiding is essentieel voor inschatten besmettingsrisico's

Over het voorkomen en de verspreiding van fecaal materiaal in de terrestrische delen van waterwingebieden is weinig bekend, terwijl deze factoren in belangrijke mate van invloed zijn op het besmettingsrisico. In 2013 heeft KWR een inventarisatieprotocol opgesteld om deze verspreiding in kaart te brengen. Aandachtspunten hierbij waren de nauwkeurige plaatsbepaling van de fecaliën in relatie tot de afstand tot de drains of puttenstrengen. In dit

onderzoek is het protocol toegepast in productielocatie Ouddorp, een terrein waar ook grote grazers aanwezig zijn.

Aanpak: inventariseren en plaatsbepaling

Allereerst zijn de belangrijkste potentiële besmettingsbronnen vastgesteld. Dit waren runderen, ganzen en mogelijk ook mensen en honden. Vervolgens is het onderzoeksgebied ingeperkt tot de risicogebieden op basis van kennis over het voorkomen van deze potentiële bronnen. Ook de

aanwezigheid van een ondiepe onverzadigde zone boven drains (en dus grotere kans op kortsluitstroming) was hierbij een selectie criterium. In 2015 zijn vier inventarisatierondes uitgevoerd, verspreid over het jaar. In elke ronde is de positie van fecaliën op het terrein nauwkeurig vastgelegd met een GPS. Door de aantallen aangetroffen fecaliën te vermenigvuldigen met de gemeten versgewichten, is vervolgens de totale fecale belasting geschat. Daarnaast zijn monsters van deze fecaliën verzameld om met de kweekmethode en q-PCR analyses de concentraties van pathogenen en indicatororganismen te bepalen.

Resultaten: runderen en ganzen zorgen voor hoge fecale belasting en besmettingsrisico

Op basis van de geschatte totale fecale belasting per diersoort wordt geconcludeerd dat voor het onderzoeksgebied runderen de grootste belasting vormen, gevolgd door ganzen en konijnen. Reeën, hazen, honden en mensen vormen een geringe belasting. Hoewel de runderen zich vrijelijk door het gebied kunnen begeven, werden de hoogste aantallen feces geteld bij drains 4 en 7. Ook van ganzen, konijnen en reeën werden de meeste keutels geteld bij drain 7. De verspreiding van ganzen en konijnen in het gebied wordt vooral bepaald door factoren als rust, beschutting en voedselaanbod.

Pathogenen en indicatororganismen in feces

Campylobacter was aanwezig in alle verzamelde monsters van runderen, hond en konijn. *E. coli* O157, *Cryptosporidium parvum* en *C. hominis*, *Giardia* A en B werden niet aangetoond. *E. coli* en enterococci

werden met zowel de kweekmethode als met q-PCR analyses aangetoond in feces van ganzen, honden, reeën en runderen. In het enige humane feces monster waren geen humane virussen aanwezig. Ook werden opmerkelijk genoeg geen *E. coli* en enterococci aangetoond. Wel was *Campylobacter* in dit monster aanwezig. De afsterving van *Campylobacter*, *E. coli* en enterococci in twee runderfeces monsters over de periode 19 augustus-14 oktober was beperkt. Runderfecaliën kunnen derhalve voor langere tijd een potentiële besmettingsbron zijn.

Implementatie: onderken potentiële risico's van aanwezigheid runderen en ganzen

Bij de inzet van begrazing door middel van runderen in duinwatergebieden moet rekening worden gehouden met de potentiële infectierisico's die dat met zich meebrengt. De runderen zorgen voor een hoge fecale belasting waarin de ziekteverwekker *Campylobacter* aanwezig is. Dit geldt ook voor ganzen en in mindere mate voor konijnen. In deze productielocatie vormen recreanten en honden in dit kader nauwelijks een probleem. Uit (model)berekeningen zal moeten blijken of de bodempassage en de nazuivering ervoor zorgen dat het drinkwater van Ouddorp aan de infectierisico-eis voldoet.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het KWR rapport KWR2016.019 *Toepassing inventarisatie protocol "Verspreiding van fecaliën" bij productielocatie Ouddorp (Evides)*.

Inhoudsopgave

KWR Managementsamenvatting	3
Inhoudsopgave	5
1 Introductie	7
1.1 Aanleiding en achtergrond	7
1.2 Onderzoeksvragen	7
2 Beschrijving onderzoeksgebied en methoden	9
2.1 Beschrijving onderzoeksgebied	9
2.2 Selectie terreindelen en typering drains	11
2.3 Inventarisatiemethodiek	13
2.4 Bepaling indicatororganismen en relevante pathogenen	14
2.4.1 Beschrijving kweekmethode door Aqualab Zuid	14
2.4.2 Beschrijving Kwantitatieve PCR methoden (q-PCR) door KWR	15
2.4.3 Detectie van <i>Cryptosporidium</i> met q-PCR	15
2.4.4 Detectie van <i>Giardia</i> met q-PCR	15
2.4.5 Detectie van <i>Campylobacter</i> met q-PCR	15
2.4.6 Detectie van <i>E. coli</i> O157 met q-PCR	15
2.4.7 Detectie van <i>E. coli</i>	15
2.4.8 Detectie van enterococcen	16
2.4.9 Extractie van DNA uit feces	16
2.4.10 Rendement van de DNA-extractie procedure	16
2.5 Bepaling virussen in humane feces	16
3 Resultaten	18
3.1 Gewicht runderfecaliën en ganzenkeutels	18
3.2 Resultaten per drain	18
3.2.1 Drain 4	18
3.2.2 Drain 6-midden	19
3.2.3 Drain 7	19
3.2.4 Drain 9-west	19
3.3 Resultaten per diersoort	20
3.3.1 Rund	20
3.3.2 Gans	22
3.3.3 Konijn	23

3.3.4	Ree	24
3.3.5	Haas	24
3.3.6	Mens en hond	25
3.4	Fecale belasting per drain en afstand tot aan drain	26
3.5	Pathogenen en indicatororganismen in feces	28
3.5.1	Pathogenen: <i>E. coli</i> O157, <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> , <i>Campylobacter</i> in q-PCR-analyses	31
3.5.2	Fecale indicatororganismen (<i>E. coli</i> en enterococcen) in q-PCR-analyses	31
3.5.3	Fecale indicatororganismen (<i>E. coli</i> en enterococcen) in kweek analyses	31
3.5.4	Virus bepalingen (RIVM)	32
4	Discussie en conclusies	33
4.1	Verspreiding van fecaliën en totale fecale belasting	33
4.2	Gebruikte methode	35
4.3	Conclusies en aanbevelingen	35
4.4	Dankwoord	36
5	Literatuur	37
6	Bijlage	38
6.1	Verspreidingskaarten fecaliën	38
6.2	Vereenvoudigde vegetatiekaart	38

1 Introductie

1.1 Aanleiding en achtergrond

Het is voor (duin)drinkwaterbedrijven van belang inzicht te hebben in het voorkomen (hoeveelheid) en de verspreiding (ligging in relatie tot winmiddelen) van fecaal materiaal in de terrestrische delen van de waterwingebieden. Kennis van deze factoren helpt de waterbedrijven die drinkwater bereiden uit oppervlaktewater te voldoen aan de verplichting vanuit het Drinkwaterbesluit tot het opstellen van een kwantitatieve risicoanalyse voor het bereide drinkwater.. Een belangrijke onderzoeksvraag bij deze bedrijven is de concentratie pathogenen in het ruwe water. De duinpassage wordt op grond van studies (Schijven, 2001) voldoende geacht voor microbiologisch veilig water, maar er zijn aanwijzingen dat dit duininfiltraat uit de relatief ondiepe winningen wel eens fecaal wordt besmet. Dat is voor deze bedrijven één van de onzekerheden in hun kwantitatieve risicoanalyses en heeft de afgelopen jaren in DPWE-verband diverse studies geïnitieerd (o.a. Nobel en Schrama, 2003; Hijnen *et al.*, 2013; Dorland *et al.*, 2014).

Er is al vrij veel onderzoek (metingen en literatuuronderzoek) gedaan naar het voorkomen van pathogenen zoals *Campylobacter*, *Cryptosporidium* en *Giardia* in feces van verschillende diersoorten, met name in grote grazers (o.a. Hoogenboezem *et al.*, 2001; Heijnen, 2009; Heijnen, 2012a) die in de duinen kunnen voorkomen. En ook over de uitspoeling, transport en afsterving in de ondergrond van bacteriën is vrij veel bekend (o.a. Hijnen *et al.*, 2012; 2013). Over het voorkomen en de verspreiding van fecaal materiaal in de terrestrische delen van de waterwingebieden is juist veel minder bekend, terwijl deze factoren in belangrijke mate van invloed zijn op de uitkomsten van bijvoorbeeld het stochastische model voor de voorspelling van infectierisico's van Hijnen *et al.* (2012) en Penders *et al.* (2015)..

In 2013 is door KWR een inventarisatieprotocol ontwikkeld om kennis te verzamelen over verspreiding van fecaliën in waterwingebieden en dit protocol is in Infiltratiegebied Castricum (ICAS) toegepast (Dorland *et al.*, 2014). Uit dit onderzoek bleek dat in ICAS in de fecaliën van verschillende diersoorten, zoals vos, konijn, en mogelijk ook ganzen, die dichtbij en rondom de winmiddelen waren gevonden, hoge concentraties indicatororganismen en pathogene micro-organismen werden aangetroffen. De verspreiding van deze diersoorten, en daarmee de verspreiding van hun feces, was van verschillende factoren afhankelijk, zoals voedselaanbod (vos), aanwezigheid van schuilmogelijkheden (konijn), en de mate van vrij uitzicht (gans). Hierdoor lijkt het mogelijk om middels aangepast terreinbeheer te sturen in de aanwezigheid van deze diersoorten.

De pilot bij ICAS heeft echter niet alle onderzoeksvragen kunnen beantwoorden. Zo kwam in dit gebied geen fecale belasting voor van mens, hond, rund of andere grote grazers. Van ganzen werden alleen oude feces aangetroffen. Dit leidde tot de aanbeveling voor het toepassen van het opgestelde inventarisatieprotocol in een gebied waar deze potentiële besmettingsbronnen wél aanwezig zijn. Een andere aanbeveling was het nauwkeurig bepalen van de locatie van de fecaliën om zo de ruimtelijke verspreiding en de afstand van fecaliën tot aan de dichtstbijzijnde winput of drain nog beter in kaart te kunnen brengen.

1.2 Onderzoeksvragen

Het doel van dit onderzoek is om m.b.v. het opgestelde inventarisatieprotocol kwalitatief (soorten, locaties) en kwantitatief (hoeveelheid) te bepalen wat de fecale depositie op een beperkt aantal, vooraf geselecteerde risicovolle locaties in het onderzoeksgebied is.

De onderzoeksvragen hierbij waren:

- Wat zijn in het onderzoeksgebied de dominante soorten?

In welk deel van het jaar zijn deze soorten in het gebied aanwezig?

In welke delen van het onderzoeksgebied zijn de potentiële risico's op infectie het grootst?

Hoe is de ruimtelijke verspreiding van fecaliën in het gebied?

Wat is de fecale belasting per diersoort?

Welke indicatororganismen en potentiële pathogenen zijn in de aangetroffen fecaliën aanwezig?

2 Beschrijving onderzoeksgebied en methoden

2.1 Beschrijving onderzoeksgebied

Het onderzoek heeft plaats gevonden in productielocatie Ouddorp gelegen in het natuurgebied Oostduinen, dat onderdeel is van het Natura 2000-gebied Duinen Goeree en Kwade Hoek (Figuur 2-1). Sinds de aanpassing van de waterwinning in de Middel- en Oostduinen in 2000 en 2001, hebben soorten en gemeenschappen van voedselarme, basenrijke duinvalleien zich sterk ontwikkeld (Aggenbach *et al.*, 2007). In een deel van deze begroeiingen nemen soorten van relatief voedselrijke omstandigheden toe. Soorten van voedselarme wateren namen vlak na de maatregelen toe, maar zijn in de daarop volgende jaren weer afgenomen. Ook droge, basenrijke voedselarme duingraslanden zijn sterk in kwaliteit verbeterd en in omvang uitgebreid.



Figuur 2-1. Ligging van productielocatie Ouddorp (rode pijl) en begrenzing (geel) van Natura 2000-gebied 'Duinen Goeree & Kwade Hoek'. Foto: Synbiosys.alterra.nl.

Beheer en recreatie

Een groot deel van de Oostduinen wordt door middel van seizoensbeweiding begraasd. In de periode juni 2014-maart 2015 betrof dit de inschatting van 25 Charolais runderen en 19 stuks zwartbont rundvee (16 GVE/100ha/jaar). In juni 2015 werden opnieuw 23 runderen ingezet, in augustus aangevuld met nog eens 24 runderen (Figuur 2-2). In maart worden de runderen uit het gebied gehaald, om bloei van kwetsbare planten mogelijk te maken. Maaibeheer wordt ingezet voor de omvorming van laag struweel naar duingrasland. In basenrijke valleien wordt maaibeheer ingezet om sterke ontwikkeling van Riet en Duindoorn, en in zuurdere valleien van Kruipwilg, tegen te gaan.



Figuur 2-2. In productielocatie Ouddorp worden voor begrazingsdoeleinden zwartbont runderen ingezet.

Het gebied is toegankelijk voor recreatie. In het gebied zijn openbare wandel- en fietspaden aanwezig (Figuur 2-3), maar cijfers over recreatie(druk) ontbreken. Buiten deze paden is het gebied niet toegankelijk. Honden dienen aan de lijn te worden gehouden, maar hier wordt regelmatig geen gehoor aan gegeven.



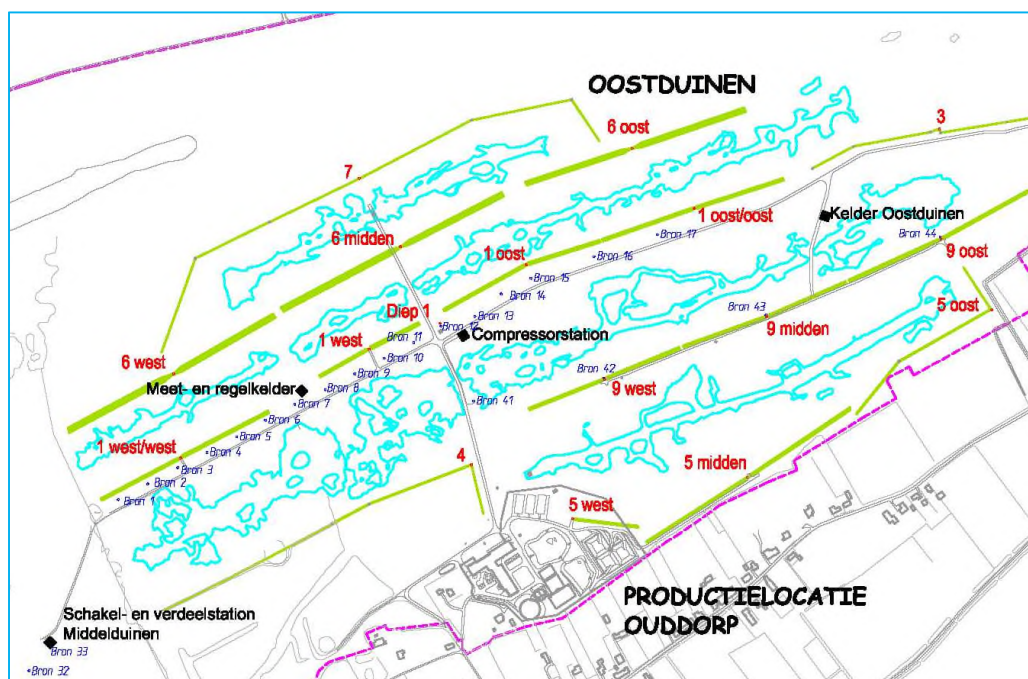
Figuur 2-3. Bovenaanzicht van productielocatie Ouddorp met daarop zichtbaar de wandel- en fietspaden. Bron: Google earth, 2013.

2.2 Selectie terreindelen en typering drains

Gezien de grootte van de productielocatie, was een inperking van de te onderzoeken terreindelen noodzakelijk. Een selectie heeft plaatsgevonden in overleg met Marten Annema en Trudy Suylen (beiden Evides). Een eerste criterium voor deze selectie waren de aanwezigheid van potentiële besmettingsbronnen, waarbij vanuit Evides de prioriteit werd gelegd bij runderen, ganzen, mensen en honden. Een tweede selectiecriterium betrof de dikte van de onverzadigde zone boven de drain. In geval van een ondiepe onverzadigde zone is het gevaar op kortsluitstroming richting de drain immers groter. Op basis van deze criteria is gekozen om het gebied rondom drains 4, 6-midden, 7, en 9-west te onderzoeken (Tabel 2-1 en Figuur 2-4 en 2-5).

Tabel 2-1. Score van drains op selectiecriteria 'aanwezige potentiële infectiebronnen' en 'aanwezigheid ondiepe onverzadigde zone'.

Drain nummer	Belangrijkste potentiële besmettingsbronnen	Ondiepe onverzadigde zone aanwezig
4	Mens, hond, rund	Nee
6 - midden	Gans, rund	Ja
7	Gans, rund, ree, konijn	Nee
9 - west	Gans, rund	Ja



Figuur 2-4. Ligging drains (rode nummers) en infiltratiepanden (blauwe omlijning) in productielocatie Ouddorp. Zie Figuur 2-5 voor begrenzing onderzoeksgebied.

Tijdens de inventarisaties is het gebied aan weerszijden van de drain afgezocht op de aanwezigheid van fecaliën. Het totale oppervlak dat op deze manier is onderzocht, staat vermeld in Tabel 2-2. Een grafische weergave van het areaal dat op deze manier is afgelopen, is te zien in Figuur 2-5. In hoofdstuk 3 worden de aantallen fecaliën weergegeven als som per gridcel van 5 x 5 m. De belangrijkste kenmerken van de onderzochte gebieden rondom de vier drains staan vermeld in Tabel 2-2. De vegetatiebeschrijvingen zijn naar Aggenbach en Annema, 2005 en Van der Goes en Groot, 2015; zie ook Bijlage). Drain 4 wordt gekenmerkt door twee zeer verschillende natuur(doel)typen. Het meest westelijk deel is een droog tot vochtig (naald)bos, terwijl het oostelijke gedeelte voornamelijk bestaat uit duingrasland met Geel walstro en kalkindicatoren. Hier ligt ook de invalsweg voor een groot

deel van de recreanten, met daarom hogere risico's op feces van mens en hond. Bij Drain 6-midden is een afwisseling aanwezig van verschillende natuurtypen. Vegetaties die behoren tot kalkrijke en kalkarme, voedselarme duingraslanden liggen dicht bij elkaar. Op lager gelegen locaties bevinden zich matig voedselrijke, vochtige graslanden met overgangen naar duinvalleivegetaties. Ook komen hier duindoornstruwelen voor. Drain 7 grenst aan de voet van de duinovergang en betreft hoofdzakelijk duingrasland met Geel walstro en kalkindicatoren. Op de lager gelegen delen worden duinvalleien met knopbiesvegetatie aangetroffen evenals duinvallei-vegetaties met Moeraswespenorchis (vorm met klavers). Op de duinhelling, zelf geen onderdeel van het onderzochte gebied, komt veel duindoorn-, meidoorn- en wegedoornstruweel voor. Vanuit deze begroeiing betreden reeën het gebied. Ook worden hier de meeste konijnen aangetroffen. Drain 9-west betreft een basenrijke, voedselarme duinvallei met overgangen naar kalkrijke, voedselarme drogere duingraslanden en duindoornstruwelen. Hier komen o.a. grote aantallen orchideeën voor.

Tabel 2-2. Kenmerken van de onderzochte drains.

Drain	Globale dimensies onderzocht gebied (lxb in m)	Schatting onderzocht oppervlakte (ha)	Vegetatietype
4	320 x 95	3.0	Duingrasland, bos
6-midden	560 x 60	3.4	Vochtige duinvallei
7	770 x 140	10.8	Duingrasland
9-west	320 x 65	2.1	Vochtige duinvallei



Figuur 2-5. Globale weergave van het areaal dat tijdens de 1^e inventarisatieronde is afgezocht op fecaliën (grijs gearceerd). Tijdens de 3^e en 4^e ronde is het onderzochte gebied bij drains 6-midden en 7 in westelijke richting uitgebreid; voor drain 9-west geldt dat in oostelijke richting (rood belijnde vakken). Elke gridcel heeft een oppervlak van 5 x 5 m. Zie volgende paragraaf voor een beschrijving van de gebruikte methode.

2.3 Inventarisatiemethodiek

In 2015 zijn vier inventarisatieronden in het gebied uitgevoerd, te weten op 25 maart, 27 mei, 19 augustus en 14 oktober. Bij de planning van deze inventarisaties is rekening gehouden met het feit dat de potentiële besmettingsbronnen niet in alle gevallen jaarrond in het gebied aanwezig zijn. Zo zijn de runderen alleen in de periode juni-maart aanwezig en ontbreken ze in het voorjaar. Het hoogste aantal ganzen wordt in mei geteld, als de ouderganzen met hun nog niet vliegvlugge jongen in het gebied verblijven. Mensen, honden, reeën, konijnen en hazen kunnen wel het gehele jaar in het gebied worden aangetroffen. In dit gebied komt de vos niet voor. Tabel 2-3 geeft een overzicht van de focus per inventarisatieronde.

Tabel 2-3. Overzicht van onderzochte diergroepen per inventarisatieronde.

Ronde	Datum	Bron fecaliën		
		Rund	Gans	Konijn / Haas / Ree / Hond / Mens
1	18-03-15	Alle fecaliën		Alleen vers
2	27-05-15	Niet	Alleen vers	Niet
3	19-08-15	Alleen vers		
4	14-10-15	Alleen vers	Alleen vers	

Tijdens rondes 1, 3 en 4 zijn de aanwezige fecaliën van runderen geteld en is nauwkeurig hun positie bepaald met behulp van een GPS-RTK (tot ca. 2-3 cm nauwkeurig). Op 25 maart, toen de runderen net uit het gebied gehaald waren, zijn alle fecaliën van runderen in het onderzoeksgebied op deze manier in kaart gebracht. Dit leverde zo het eindresultaat op van de totale fecale belasting door runderen gedurende de periode juni 2014-maart 2015. Vanwege het hoge aantal fecaliën is de positie ervan in sommige gevallen groepsgewijs bepaald. Op 19 augustus en 14 oktober zijn alleen de verse fecaliën geteld en ingemeten.

Tijdens het inventariseren van runderfecaliën zijn ook de fecaliën van andere bronnen geteld en zijn de locaties ervan bepaald. Er is dus niet vlakdekkend gezocht naar fecaliën van konijnen, hazen, reeën, honden en mensen. Hoewel op deze manier een compleet beeld voor de verspreiding van runderfecaliën kon worden opgesteld, is dat dus niet het geval voor de overige bronnen. Van deze soorten is de bepaalde fecale belasting derhalve een onderschatting.

Op 27 mei lag de focus geheel op het inventariseren van de ganzenfecaliën in de omgeving van de vier drains. Tijdens deze ronde, waarbij geen runderen in het gebied aanwezig waren, zijn de fecaliën van de andere bronnen niet gemonitord. Vanwege het grote oppervlak van het onderzoeksgebied is dit niet vlakdekkend onderzocht op aanwezigheid van ganzenkeutels. In plaats daarvan zijn looproutes gebruikt die in elk geval de locaties aandeden waarvan vooraf bekend was dat daar (veel) ganzen aanwezig waren.

Fecale belasting en afstand tot aan drain

Zowel van enkele fecaliën van ganzen (n=30) als van runderen (n=5) is in augustus 2015 het versgewicht bepaald. Van de ganzenfecaliën is tevens het drooggewicht bepaald door de verzamelde monsters gedurende vier weken aan de buitenlucht te drogen. Van de runderfecaliën zijn naast het gewicht ook de dimensies (lengte, breedte, hoogte) globaal bepaald om zo een schatting van de dichtheid te kunnen maken.

Op basis van deze gemiddelde gewichten en het aantal getelde fecaliën kon voor runderen en ganzen een schatting worden gemaakt van de totale fecale belasting per drain. Voor konijn en haas zijn voor deze berekening de gemiddelde gewichten per keutel gebruikt die tijdens het onderzoek in ICAS zijn bepaald, te weten 0,10 resp. 0,28 gram (Dorland *et al.*, 2014).

Daarnaast is op basis van de inventarisatieronde op 25 maart, waarbij een vlakdekkend beeld is verkregen van de totale fecale seizoensbelasting door runderen, een frequentie verdeling van de afstand van elke feces tot aan de dichtstbijzijnde drain gemaakt.

2.4 Bepaling indicatororganismen en relevante pathogenen

Tijdens de inventarisatieronden op 27 mei, 19 augustus en 14 oktober zijn in totaal 25 monsters van fecaliën verzameld. Deze monsters zijn door Aqualab Zuid en KWR geanalyseerd op aantallen indicatororganismen en pathogenen (Tabel 2-4). Op 14 oktober werd één humane feces aangetroffen. Deze is ook verzameld en op gelijke wijze geanalyseerd. In aanvulling hierop is een submonster naar het RIVM gestuurd voor analyse op de aanwezigheid van humane virussen (zie paragraaf 2.5). Op 14 oktober zijn ook twee runderfeces monsters verzameld die reeds op 19 augustus aanwezig waren. Op deze manier kon een beeld worden verkregen van de afsterving van indicatororganismen en relevante pathogenen.

Tabel 2-4. Overzicht van verzamelde fecaliën monsters

Datum	Organisme	Aantal monsters
27-05-15	hond	1
27-05-15	gans	8
19-08-15	rund	4
14-10-15	hond	1
14-10-15	konijn	2
14-10-15	mens	1
14-10-15	ree	2
14-10-15	rund-herhaal	2
14-10-15	rund	4

2.4.1 Beschrijving kweekmethode door Aqualab Zuid

Aqualab Zuid heeft de concentratie *Escherichia coli* (*E. coli*) en enterococcen bepaald in de fecaliën die zijn verzameld op drie tijdstippen (27 mei, 19 augustus en 14 oktober 2015).

Om de concentratie *E. coli* en enterococcen te bepalen is steeds 0,5 gram feces afgewogen (versgewicht - FW) in een potje met glasparsels. Aan elk potje is 10 ml pepton fysiologisch zout (PFZ) toegevoegd, waarna het monster werd gehomogeniseerd door krachtig te schudden en het monster daarna gedurende 2 minuten in een ultrasoonbad te plaatsen. Per monster is van de verkregen suspensie een volume van 1 ml van een 10-voudige verdunningsreeks gefiltreerd over membraanfilters met een poriegrootte van 0,45 µm.

Voor het bepalen van de concentratie *E. coli* in de monsters van 27 mei, zijn de filters overgelegd op lauryl-sulfaat-agar (LSA) en gedurende (5 ± 1) uur bij (25 ± 2) °C en vervolgens gedurende (14 ± 2) uur bij ($44 \pm 0,5$) °C geïncubeerd. Voor de serie monsters van 19 augustus en 14 oktober werd eveneens het voorafgaande uitgevoerd. Daarnaast werden filters overgebracht op LSA, waarna voorincubatie plaatsvond gedurende (5 ± 1) uur bij (25 ± 2) °C, die echter werd gevolgd door een incubatie gedurende (14 ± 2) uur bij (36 ± 2) °C. Identificatie van de aangetroffen heldergele kolonies vond plaats middels MALDI-TOF.

Voor het bepalen van de concentratie enterococcen werden de membraanfilters overgebracht op Slanetz & Bartley Agar (SBA) en gedurende (44 ± 4) uur bij (36 ± 2) °C geïncubeerd. Ter bevestiging van het aantal enterococcen (roze tot donkerpaarse kolonies) werd het filter overgelegd op gal-esculine-azide-agar (GEAA) die tot ($44,0 \pm 0,5$) °C was voorverwarmd. De GEAA-platen werden vervolgens gedurende 2 uur bij ($44,0 \pm 0,5$) °C geïncubeerd, waarna het aantal typische bruinzwarte tot zwarte kolonies met daaromheen een zwarte neerslag werd geteld.

2.4.2 Beschrijving Kwantitatieve PCR methoden (q-PCR) door KWR

Met de PCR-techniek is het mogelijk om een kenmerkend fragment van het erfelijk materiaal (DNA-merker) van de te detecteren organismen in korte tijd tot grote hoeveelheden te vermenigvuldigen. Voor deze vermenigvuldiging worden korte synthetische DNA moleculen (primers) gebruikt, de samenstelling (DNA-sequentie) van deze primers is zodanig gekozen dat deze primers slechts binden aan het DNA van het te detecteren organisme. Na binding van de primers aan het DNA van het organisme, wordt een enzymatische kettingreactie in gang gezet die verloopt onder invloed van wisseling van temperatuur. De vorming van het vermenigvuldigde DNA fragment wordt al tijdens de PCR reactie gemeten (Real-Time) door gebruik te maken van lichtgevend synthetische DNA-moleculen (probes) die pas licht gaan geven indien het PCR fragment gevormd wordt. Doordat er een relatie is tussen het reactietijdstip waarop detectie van het gevormde fragment mogelijk is (CT-waarde) en de concentratie van het DNA fragment aan het begin van de reactie is met deze techniek ook kwantificatie mogelijk.

Voor het kwantificeren van de gedetecteerde DNA-merker is er gebruik gemaakt van *E. coli* plasmiden waarin de DNA-merkers van verschillende micro-organismen zijn gekloneerd. Deze plasmiden zijn vermeerderd in *E. coli* cellen en vervolgens gezuiverd. Het DNA van het gezuiverde plasmide is gekleurd met een fluorescente kleurstof en gekwantificeerd door toepassing van een fluorometer (QuBit). Op basis van deze kwantificaties zijn verdunningsreeksen samengesteld met hierin 10-voudige verdunningen van DNA-suspensies met bekende concentraties. Q-PCR reacties, uitgevoerd op deze verdunningsreeksen, zijn gebruikt voor het genereren van ijklijnen en deze ijklijnen zijn gebruikt voor kwantificatie (uitgedrukt in DNA-kopieën/g feces) van de merkers in fecesmonsters.

2.4.3 Detectie van *Cryptosporidium* met q-PCR

Voor detectie van *Cryptosporidium* is gebruik gemaakt van een q-PCR methode waarmee een specifiek fragment van het COWP-gen, van alleen de *Cryptosporidium* soorten die verantwoordelijk zijn voor de meeste ziektegevallen bij mensen (menspathogene *C. parvum* en *C. hominis*), wordt vermenigvuldigd. Deze methode is in eerder BTO onderzoek ontwikkeld (Heijnen, 2013) en is in dit onderzoek uitgevoerd zoals beschreven in het rapport.

2.4.4 Detectie van *Giardia* met q-PCR

Voor detectie van *Giardia* is gebruik gemaakt van een q-PCR methode waarmee een specifiek fragment van Tpi-gen van de menspathogene *Giardia* soorten (behorende tot assemblagegroep A en B) wordt vermenigvuldigd. Deze methode is in eerder BTO onderzoek ontwikkeld (Heijnen, 2013) en is in dit onderzoek uitgevoerd zoals beschreven in het rapport.

2.4.5 Detectie van *Campylobacter* met q-PCR

Voor detectie van *Campylobacter* is gebruik gemaakt van een q-PCR methode waarmee een fragment van het 16S ribosomaal RNA gen dat aanwezig is bij alle *Campylobacter* soorten wordt vermenigvuldigd. Deze methode is eerder toegepast bij onderzoek naar het voorkomen van pathogene micro-organismen in de feces van grazers in het duingebied (Heijnen, 2009).

2.4.6 Detectie van *E. coli* O157 met q-PCR

Voor specifieke detectie van de pathogene *E. coli* soort van het type O157 is gebruik gemaakt van een q-PCR methode waarmee een fragment van het rfbE gen wordt vermenigvuldigd. De primers en probe die bij deze methode worden toegepast zijn eerder beschreven (Heijnen and Medema, 2006).

2.4.7 Detectie van *E. coli*

Voor detectie van het DNA van *E. coli* bacteriën is gebruik gemaakt van een methode waarmee een kenmerkend fragment van het Hsp-70 gen wordt vermenigvuldigd. De basis

voor deze methode is gelegd in eerder onderzoek (Heijnen and Medema, 2009) waar specifieke primers zijn ontwikkeld voor detectie van het RNA van *E. coli*. Deze methode is in later onderzoek gemodificeerd tot een methode waarmee een kenmerkend DNA-fragment van *E. coli* specifiek kan worden vermeerderd (Heijnen *et al.* 2012). Deze gemodificeerde methode (Heijnen *et al.* 2012) is in dit onderzoek toegepast.

2.4.8 Detectie van enterococcen

Voor detectie van het DNA van enterococcen is een methode gebruikt waarmee een fragment van het 23S rRNA gen van enterococcen wordt vermenigvuldigd en gedetecteerd. De primers en probes die bij deze methode worden toegepast zijn oorspronkelijk ontworpen door Waterlaboratorium Noord (WLN). Met deze primers worden niet alle enterococcen gedetecteerd, maar detectie is beperkt tot een beperkt aantal enterococcen soorten (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum* en *E. hirae*) waaronder de soorten die van fecale herkomst zijn.

2.4.9 Extractie van DNA uit feces

Voor isolatie van DNA uit de fecesmonsters is de PowerBiofilm Kit van de firma MoBio gebruikt. Per fecesmonster is er ca. 50-100 mg feces afgewogen en toegevoegd aan reactiebuisjes met hierin keramische beads. Na toevoeging van Lysis buffer, met hierin een bekende hoeveelheid IC-DNA (Inhibitie- en rendementscontrole voor meten van eventuele remming van q-PCR reactie en de opbrengst van de DNA-isolatie) is een bead-bead stap uitgevoerd, waarbij de buisjes zeer krachtig worden geschud waardoor de keramische beads met grote snelheid door de vloeistof worden bewogen. Deze combinatie van mechanische kracht en de werking van de lysis buffer zorgt voor het openbreken van de cellen en het vrijkomen van (o.a.) het DNA. Na deze bead-bead stap wordt het DNA gezuiverd door gebruik te maken van een affiniteitszuivering met extractiekolommen van de PowerBiofilm Kit. Na een aantal "wasstappen" is het DNA uit elk monster geëluëerd in een volume van 100 µl, hiervan wordt 10 µl gebruikt voor analyse met q-PCR. De opbrengst van de isolatieprocedure is bepaald door meting van het IC-DNA.

2.4.10 Rendement van de DNA-extractie procedure

Het rendement van de DNA-isolatie en de eventuele aanwezigheid van remmende stoffen in het DNA van de monsters is bepaald door aan elk monster een inhibitie- en rendementscontrole (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. 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 wordt gebruikt om de meetwaarden voor elk individueel monster te corrigeren voor verlies van DNA t.g.v. de extractiemethode.

2.5 Bepaling virussen in humane feces

Op 14 oktober 2015 werd één humaan feces monster aangetroffen in het wingebied. Een deel van dit monster is op verzoek van Evides door Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie van het RIVM onderzocht op de aanwezigheid van verschillende virussen. De technische gegevens van de door hen gebruikte detectiemethoden zijn (naar Lodder, 2015):

- Viraal DNA en RNA is geëxtraheerd zoals is beschreven in SOP Z&O M702: Nuclisens Magnetische Bead DNA Extractie.

- Detectie van enterovirus RNA is gedaan zoals is beschreven door Beld *et al.* (2004) J Clin Microbiol 42: 3059, en Benschop (2008) J Clin Virol 41:69, met modificaties.
- Detectie van norovirus RNA van GGI en GGII, en adenovirus DNA is gedaan zoals is beschreven door Verhaelen *et al.* (2012) Int J Food Microbiol 160: 137.
- Detectie van rotavirus is gedaan zoals is beschreven door Pang *et al.* (2004) J Med Virol. 72:496, met modificaties.

3 Resultaten

3.1 Gewicht runderfecaliën en ganzenkeutels

Tijdens de inventarisatierondes zijn de gewichten bepaald van runderfecaliën en ganzenkeutels. De resultaten van deze metingen zijn vermeld in Tabel 3-1. Deze gemiddelde gewichten zijn gebruikt om een schatting te maken van de totale fecale belasting per drain (zie §3.4).

Het versgewicht van 10 ganzenkeutels varieerde tussen 23 en 29 g. Dit komt neer op een gemiddeld versgewicht per keutel van 2,3-2,9 g. Het drooggewicht per keutel was gemiddeld 1,2 g en daarmee vergelijkbaar met dat in ICAS werd gemeten (1,2-1,3 g, Dorland *et al.*, 2014).

Het versgewicht van de runderfecaliën varieerde sterk. Kleinere exemplaren wogen 500-600 g, terwijl grotere exemplaren ca. 1.4 kg wogen. Het gemiddelde versgewicht van de vijf metingen bedroeg iets meer dan 900 g.

Tabel 3-1. Resultaten van gewichtsbepalingen van ganzenkeutels en runderfecaliën.

Diersoort	Nr meting	Gemeten aantal	Totaal gewicht (g)	Gemiddeld gewicht (g)
Gans	1	10	23	2,3
	2	10	26	2,6
	3	10	29	2,9
Rund	1	1	1367	
	2	1	586	
	3	1	1432	
	4	1	672	
	5	1	491	910

3.2 Resultaten per drain

3.2.1 Drain 4

De belangrijkste bronnen van fecale belasting bij deze drain zijn rund, gans en konijn (Tabel 3-2). Aan het eind van de winter periode werden ruim 400 runderfecaliën geteld. Tijdens de 3^e ronde op 19 augustus 2015 (de runderen waren toen sinds juni weer in het gebied aanwezig) werden 32 verse runderfecaliën geteld. Twee maanden later, op 14 oktober, was dit aantal met 81 iets hoger. Ondanks dat via deze drain een groot aantal recreanten (al dan niet met hond) het terrein betreden, was het aantal feces van mens of hond zeer gering (hond) tot afwezig (mens).

Tabel 3-2. Aantal uitwerpselen per diersoort boven drain 4. Op 27 mei zijn alleen ganzenkeutels geïnventariseerd.

Drain 4	rund	gans	hond	ree	konijn	haas	mens
25-03-15	437	162	3	5	200	24	0
27-05-15		462					
19-08-15	32	0	0	0	0	10	0
14-10-15	81	0	2	0	10	0	0

3.2.2 Drain 6 - midden

Bij deze drain werden duidelijk minder fecaliën van runderen aangetroffen dan bij drain 4, terwijl het aantal getelde ganzenkeutels wel vele malen hoger was (Tabel 3-3). Ook werden hier veel keutels van reeën aangetroffen, maar alleen tijdens de 1^e inventarisatieronde. Daarnaast werden tijdens rondes 1, 3 en 4 hoge aantallen konijnenkeutels geteld. Fecaliën van honden werden nauwelijks gevonden. De enige humane vondst in het gebied betrof deze drain.

Tabel 3-3. Aantal uitwerpselen per diersoort boven drain 6-midden. Op 27 mei zijn alleen ganzenkeutels geïnterpreteerd.

Drain 6 - m	rund	gans	hond	ree	konijn	haas	mens
25-03-15	152	447	0	220	80	5	0
27-05-15		1230					
19-08-15	20	2	0	0	150	0	0
14-10-15	24	0	1	0	101	0	1

3.2.3 Drain 7

Deze drain werd veel bezocht door de runderen (Tabel 3-4). Tijdens alle drie de rondes waarbij de focus lag op runderen werden hoge aantallen feces geteld. Daarnaast werden hoge aantallen ganzen-, konijnen- en reeënkeutels geteld. De aanwezigheid van zowel duingraslanden (voedsel) als struweel op de duinflank (beschutting) maakt waarschijnlijk dat deze drain in hoge mate door konijn, ree (en haas) bezocht wordt.

Tabel 3-4. Aantal uitwerpselen per diersoort boven drain 7. Op 27 mei zijn alleen ganzenkeutels geïnterpreteerd.

Drain 7	rund	gans	hond	ree	konijn	haas	mens
25-03-15	413	1178	1	1164	780	10	0
27-05-15		2917					
19-08-15	216	25	0	0	2260	80	0
14-10-15	68	0	0	144	414	0	0

3.2.4 Drain 9 - west

Het aantal gevonden runderfecaliën was bij deze drain aanzienlijk lager dan boven drain 4 en 7 (Tabel 3-5). Wel werd op 27 mei 2015 een groot aantal ganzenkeutels geteld. Er werden bij deze drain geen fecaliën van hond, ree en mens aangetroffen.

Tabel 3-5. Aantal uitwerpselen per diersoort boven drain 9-west. Op 27 mei zijn alleen ganzenkeutels geïnterpreteerd.

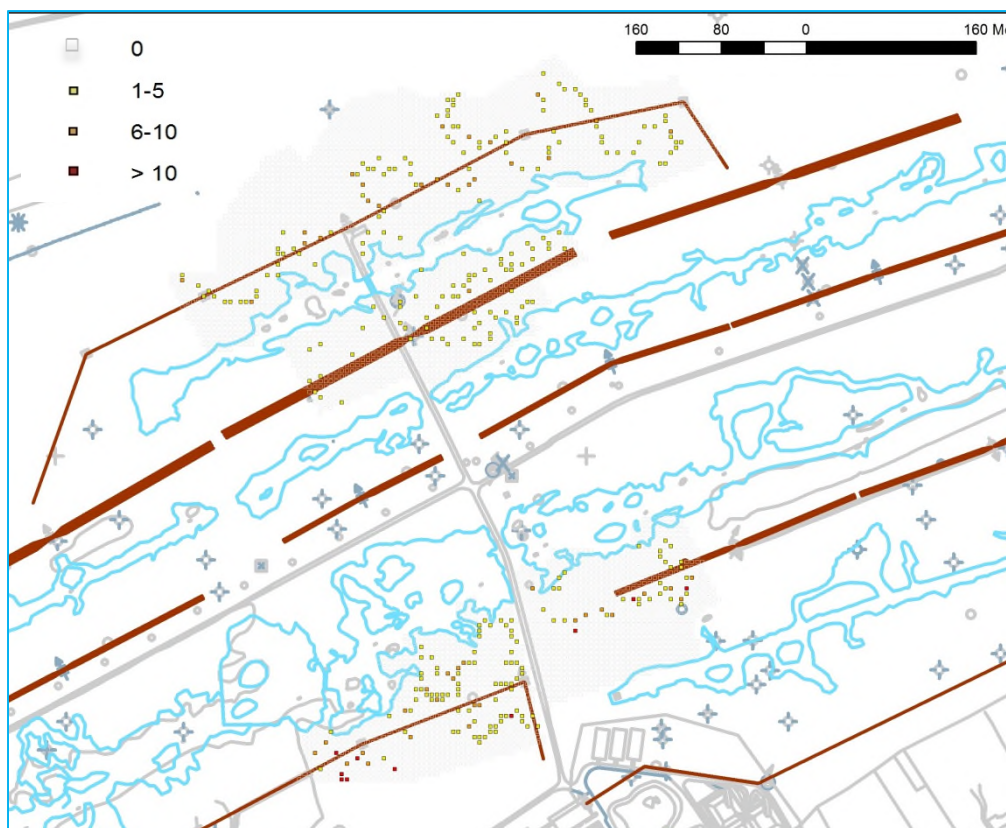
Drain 9 - w	rund	gans	hond	ree	konijn	haas	mens
25-03-15	180	91	0	0	30	0	0
27-05-15		1210					
19-08-15	6	2	0	0	250	15	0
14-10-15	100	0	0	0	0	0	0

3.3 Resultaten per diersoort

In onderstaande paragrafen wordt per diersoort een overzicht gegeven van de verspreiding van hun fecaliën tijdens de vier inventarisatie rondes in het gebied. In de bijlagen zijn grotere versies van deze figuren opgenomen.

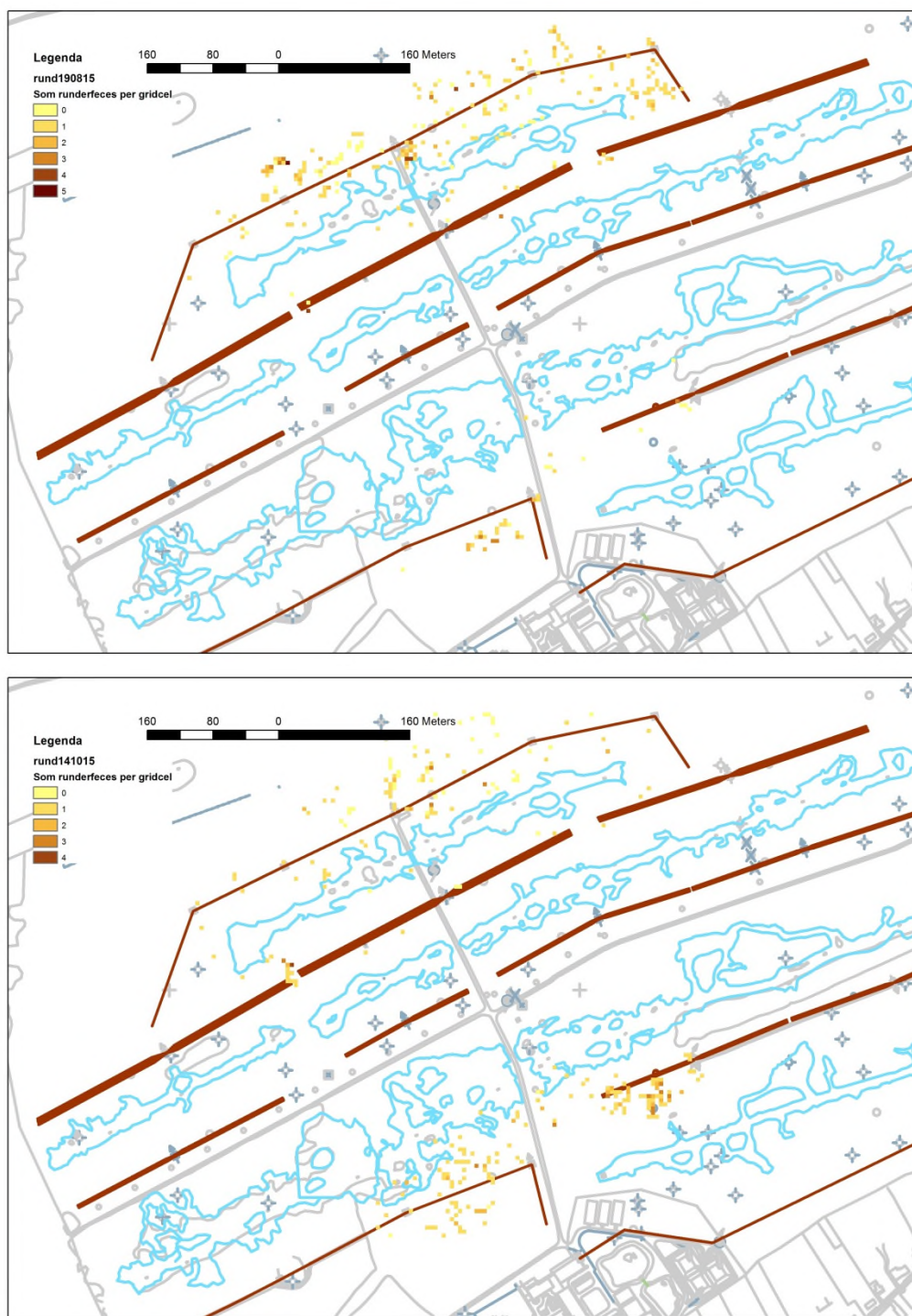
3.3.1 Rund

Tijdens de 1^e inventarisatieronde zijn in de onderzochte gebieden alle aanwezige runderfecaliën geteld. Deze getallen geven een beeld van de verspreiding van de runderen gedurende de periode juni 2014-maart 2015. In Figuur 3-1 is te zien dat de fecaliën niet homogeen over het onderzochte gebied verspreid liggen. Op sommige plekken liggen de fecaliën dicht bij elkaar (de rode gridcellen met meer dan 10 fecaliën), terwijl in de meeste gridcellen geen fecaliën aanwezig waren. De fecaliën zijn in de regel niet op korte afstand van de infiltratiepanden aanwezig, maar bevinden zich in het gebied boven en vlakbij de drains.



Figuur 3-1. Ruimtelijk beeld van de verspreiding van runderfecaliën op 25 maart 2015. Tijdens deze inventarisatieronde zijn alle runderfecaliën in het onderzoeksgebied geteld. De figuur geeft derhalve een beeld van de fecale belasting gedurende de periode juni 2014-maart 2015. Het aantal runderfecaliën is gesommeerd weergegeven in een gridcel van 5 x 5 m.

In de periode juni-augustus 2015 werden de meeste runderfecaliën geteld in het gebied rond drain 4 en 7 en minder bij drain 6-midden en 9-west (Figuur 3-2). In de periode augustus-oktober 2015 werden bij drain 9-west wel weer meer fecaliën geteld (Figuur 3-2 en Tabel 3-6).



Figuur 3-2. Ruimtelijk beeld van de verspreiding van runderfecaliën op 19 augustus (boven) en 14 oktober 2015 (onder). Het aantal runderfecaliën is gesommeerd weergegeven in een gridcel van 5 x 5 m.

Tabel 3-6. Totale aantal runderfecaliën per drain per inventarisatieronde.

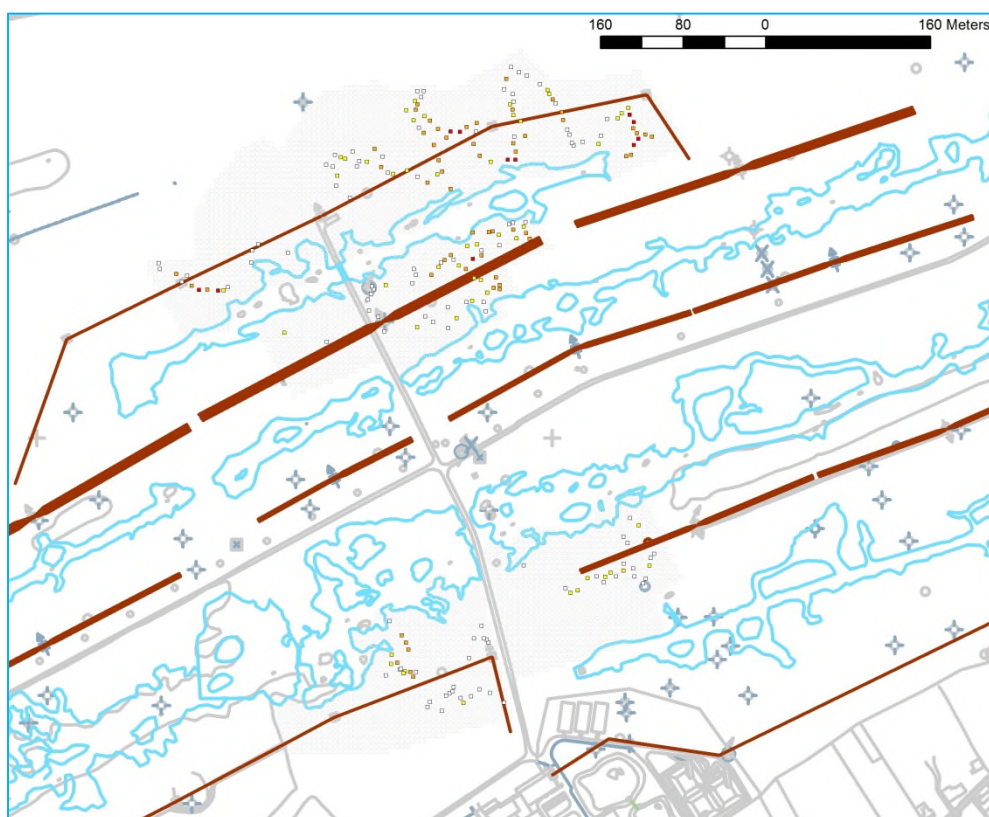
Drain	25-03-15 juni '14-mrt '15	27-05-15 mrt-mei '15	19-08-15 juni-aug '15	14-10-15 aug-okt
4	437	Niet aanwezig	32	81
6-midden	152	Niet aanwezig	20	24
7	413	Niet aanwezig	216	68
9-west	180	Niet aanwezig	6	100
Totaal ronde	1182	0	274	273

3.3.2 Gans

Tijdens de 1^e inventarisatieronde werden er bij elke drain ganzenkeutels aangetroffen, maar de aantallen wisselden sterk. Verreweg de meeste keutels werden geteld bij het oostelijk deel van drain 7 (Tabel 3-7 en Figuur 3-3), gevolgd door 6-midden, 4 en 9-west.

Tabel 3-7. Totale aantal ganzenkeutels per drain per inventarisatieronde.

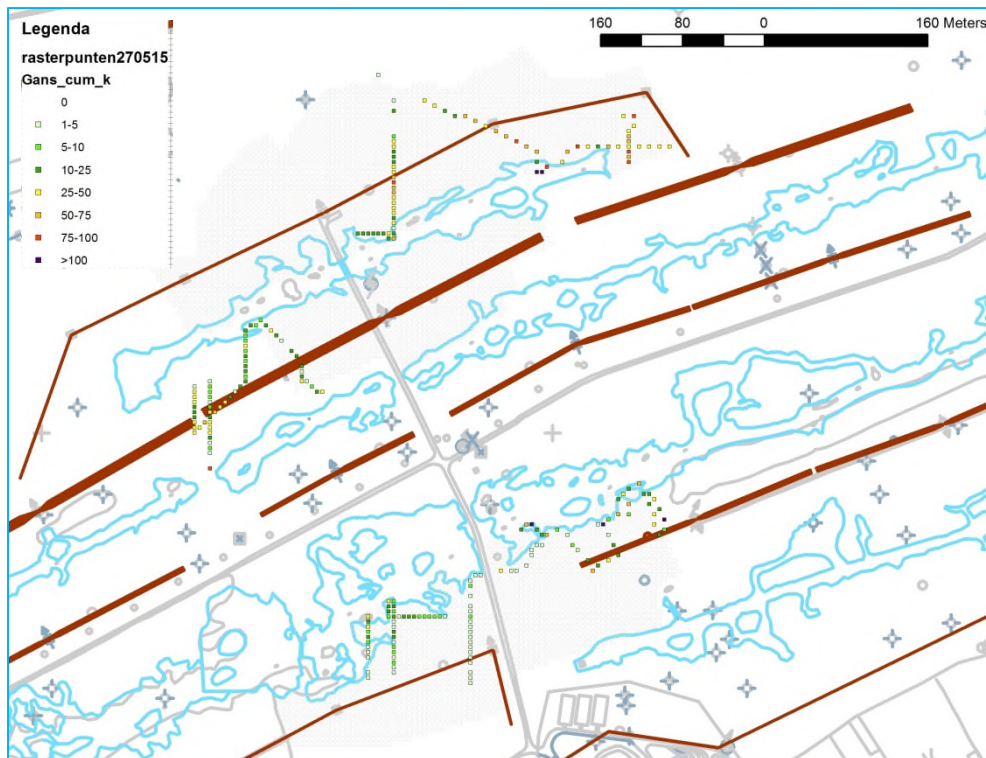
Drain	25-03-15 juni '14-mrt '15	27-05-15 mrt-mei '15	19-08-15 mei-aug '15	14-10-15 aug-okt
4	162	462	0	0
6-midden	447	1230	2	0
7	1178	2917	25	0
9-west	91	1210	2	0
Totaal ronde	1878	5819	29	0



Figuur 3-3. Ruimtelijk beeld van de verspreiding van ganzenkeutels op 25 maart 2015.

Legenda: wit = 1-5 keutels, geel = 6-10 keutels, oranje = 11-25 keutels en rood = 26-50 keutels.

Tijdens de 2^e inventarisatieronde op 27 mei 2015, het moment waarop de hoogste aantallen ganzen met hun jongen in het gebied aanwezig waren, werden zeer hoge aantallen ganzenkeutels in het onderzoeksgebied waargenomen (Tabel 3-7). De ganzen hielden zich dichtbij de infiltratiepanden op en vlak langs de oevers werden dan ook de meeste ganzenkeutels geteld, oplopend tot meer dan 100 per gridcel (Figuur 3-4). Vooral drains 7 en 6-midden waren erg in trek bij de ganzen, terwijl bij drain 4 de laagste aantallen werden geteld. Deze verdeling werd ook waargenomen op 25 maart en 19 augustus. Tijdens de laatste ronde in oktober werden geen verse ganzenkeutels meer geteld. De dieren waren niet meer in het gebied aanwezig.



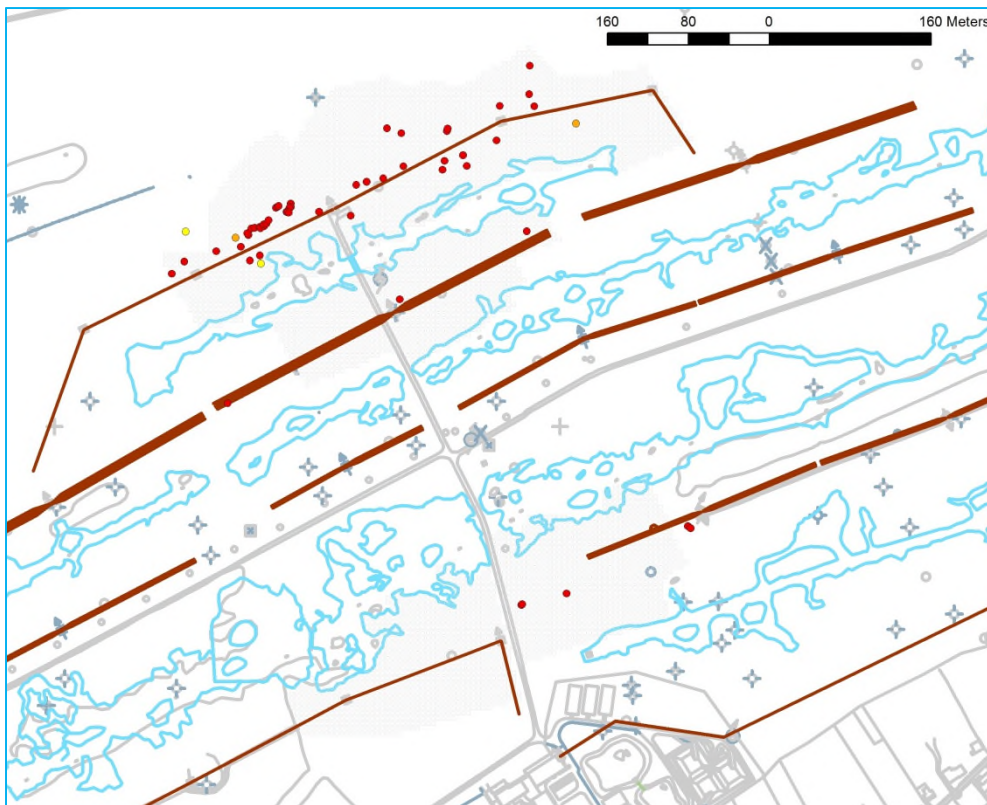
Figuur 3-4. Ruimtelijk beeld van de verspreiding van ganzenkeutels op de looproutes op 27 mei 2015.

3.3.3 Konijn

Konijnenkeutels werden verspreid door het gehele gebied aangetroffen, maar deze verdeling was erg heterogeen (Tabel 3-8). Konijnen gebruiken latrines, waardoor lokaal de aantallen keutels erg hoog kunnen zijn (Figuur 3-5). De hoogste aantallen werden geteld bij drain 7, met name gedurende de zomerronde in augustus.

Tabel 3-8. Totale aantal konijnenkeutels per drain per inventarisatieronde. (n.b.= niet bepaald)

Drain	25-03-15 juni '14-mrt '15	27-05-15 mrt-mei '15	19-08-15 mei-aug '15	14-10-15 aug-okt
4	200		0	10
6-midden	80		150	101
7	780		2260	414
9-west	30		250	0
Totaal ronde	1090	n.b.	2660	525



Figuur 3-5. Ruimtelijk beeld van de verspreiding van konijnenkeutels op 19 augustus 2015. Legenda: geel = ca. 10 keutels, oranje = ca. 20 keutels, rood = ca. 50 keutels.

3.3.4 Ree

Net als het konijn werden keutels van reeën met name aangetroffen rondom drain 7 en in mindere mate bij drain 6-midden (Tabel 3-9). Bij drain 9-west werden helemaal geen keutels van reeën gevonden. De aantallen keutels varieerden ook sterk tussen de meetrondes. Vooral tijdens de 1^e ronde in het voorjaar van 2015 werden veel keutels geteld, terwijl zij tijdens de zomerronde geheel ontbraken.

Tabel 3-9. Totale aantal reeënkeutels per drain per inventarisatieronde. (n.b.= niet bepaald)

Drain	25-03-15 juni '14-mrt '15	27-05-15 mrt-mei '15	19-08-15 mei-aug '15	14-10-15 aug-okt
4	5		0	0
6-midden	220		0	0
7	1164		0	144
9-west	0		0	0
Totaal ronde	1389	n.b.	0	144

3.3.5 Haas

Hazenkeutels kunnen in het veld niet altijd even gemakkelijk van konijnenkeutels worden onderscheiden. In de regel zijn hazenkeutels wat groter (Figuur 3-6) en liggen meer verspreid. Hazenkeutels werden bij elke drain geteld, maar in geringe aantallen en in wisselende hoeveelheden per ronde. Tijdens de ronde in oktober 2015 werden geen hazenkeutels geteld.



Figuur 3-6. Foto van konijnenkeutels (links) en hazenkeutels (rechts). Uit: Dorland et al., 2014.

Tabel 3-10. Totale aantal hazenkeutels per drain per inventarisatieronde. (n.b.= niet bepaald)

Drain	25-03-15 juni '14 - mrt '15	27-05-15 mrt - mei '15	19-08-15 mei - aug '15	14-10-15 aug - okt
4	24		10	0
6 - midden	5		0	0
7	10		80	0
9 - west	0		15	0
Totaal ronde	39	n.b.	105	0

3.3.6 Mens en hond

Hoewel het gebied toegankelijk is voor recreanten en aangelijnde honden, was het aantal fecaliën dat van deze groepen werd aangetroffen zeer gering. Bij drain 4, één van de toegangswegen, werden op 25 maart 2015 drie fecaliën van honden gevonden en opnieuw twee op 14 oktober 2015 (Tabel 3-11). Bij de overige drains werd een enkele keer wat gevonden (drains 6-midden en 7) of geheel niet (drain 9-west).

Tabel 3-11. Totale aantal fecaliën van honden per drain per inventarisatieronde. (n.b.= niet bepaald)

Drain	25-03-15 juni '14 - mrt '15	27-05-15 mrt - mei '15	19-08-15 mei - aug '15	14-10-15 aug - okt
4	3		0	2
6 - midden	0		0	1
7	1		0	0
9 - west	0		0	0
Totaal ronde	4	n.b.	0	3

De enige humane feces die tijdens dit onderzoek werd gevonden (op 14 oktober 2015) lag in de buurt van drain 6 (Figuur 3-7).



Figuur 3-7. Locatie vondst van enige humane fecesmonster in het gebied.

3.4 Fecale belasting per drain en afstand tot aan drain

De fecale belasting per drain is berekend door het aantal getelde fecaliën per diersoort te vermenigvuldigen met het versgewicht (Tabel 3-1). Voor reeën kon deze berekening niet worden uitgevoerd, omdat het versgewicht van reeënkeutels niet is bepaald. Voor hond en mens is deze berekening vanwege het geringe aantal fecaliën ook niet uitgevoerd.

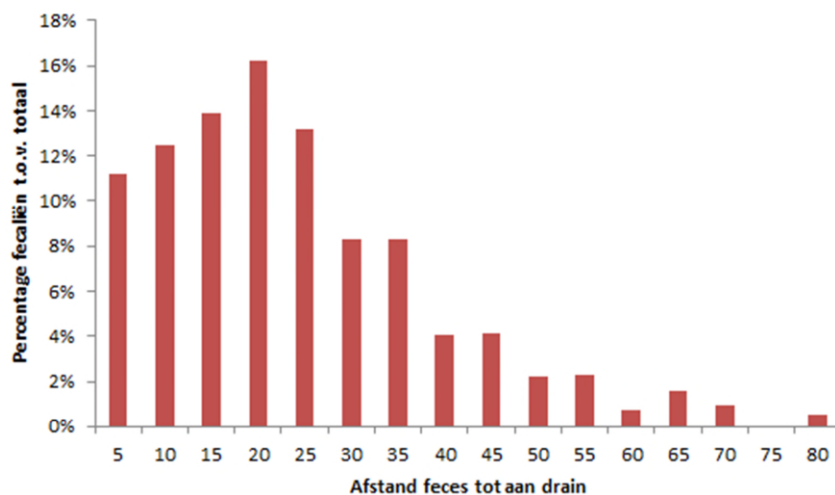
In de periode juni 2014-maart 2015, wat gezien kan worden als één begrazingsperiode, is ruim 1000 kg runderfecaliën in het onderzochte gebied gedeponerd (Tabel 3-12). In de perioden juni-augustus en augustus-oktober kwam daar nog eens ca. 250 kg bij. Drains 4 en 7 werden met ca. 400 kg het zwaarst belast. Behalve een hoge last aan runderfecaliën, kende drain 7 ook een totale fecale belasting van ruim 10 kg aan ganzenkeutels en ten minste 350 g konijnenkeutels.

Tabel 3-12. Schatting van de fecale belasting per drain per inventarisatieronde. Waarden zijn in gram, behalve voor rund en gans (kg).

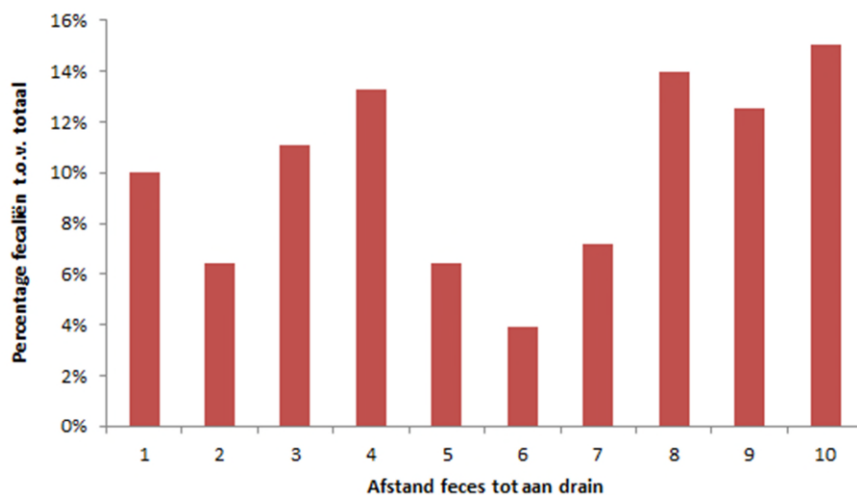
Drain	25-03-15 juni '14-mrt '15	27-05-15 mrt-mei '15	19-08-15 mei-aug '15	14-10-15 aug-okt	
Rund (kg)					
4	397		29	74	
6 - m	138		18	22	
7	376		196	62	
9 - w	164		5	91	
Totaal	1075		249	248	
Gans (kg)					
4	0,4	1,2	0,0	0,0	1,6
6 - m	1,2	3,2	0,0	0,0	4,4
7	3,1	7,6	0,1	0,0	10,7
9 - w	0,2	3,1	0,0	0,0	3,4
Totaal	4,9	15,1	0,1	0,0	20,1
Konijn (g)					
4	20		0	1	21
6 - m	8		15	10	33
7	78		226	41	345
9 - w	3		25	0	28
totaal	109		266	53	428
Haas (g)					
4	6		3	0	9
6 - m	1		0	0	1
7	3		22	0	24
9 - w	0		4	0	4
totaal	11		29	0	39

Op basis van de nauwkeurig ingemeten posities van runderfecaliën (1182 metingen tijdens de inventarisatieronde op 25 maart) is een frequentieverdeling gemaakt van de afstand van de feces tot aan de dichtstbijzijnde drain. *Hierbij leveren feces die op de eerste paar meters van een drain liggen, de grootste potentiële risico's op (Penders et al., 2015).* Uit Figuur 3-8 blijkt dat deze verdeling niet homogeen is. Ruim 23% van het aantal runderfecaliën bevindt zich op een afstand van maximaal 10 m van een drain. Het hoogste percentage (16%) van de fecaliën bevond zich tussen 15 en 20 m van een drain. Een kleine 25% van de feces bevond zich op meer dan 30 m van een drain.

De verspreiding van runderfecaliën binnen een afstand van maximaal 10 m van een drain is wel meer homogeen (Figuur 3-9). Het aantal fecaliën varieerde tussen 4 en 15% van het totale aantal fecaliën.



Figuur 3-8. Frequentieverdeling van de afstand van runderfecaliën tot aan de dichtstbijzijnde drain.



Figuur 3-9. Frequentieverdeling van de afstand van runderfecaliën in de range van 0 tot 10 m tot aan de dichtstbijzijnde drain.

3.5 Pathogenen en indicatororganismen in feces

De aanwezigheid en concentratie van fecale indicatororganismen (*E. coli* en enterococcen) en pathogenen (*E. coli* O157, *Campylobacter*, *Cryptosporidium* en *Giardia*) is bepaald in 25 fecesmonsters afkomstig van verschillende organismen (gans n=8, hond n=2, rund n=10, konijn n=2, ree n=2 en mens n=1), zie Tabel 2-4). Voor het bepalen van de concentratie pathogene micro-organismen zijn alleen q-PCR methoden toegepast, de concentratie indicatororganismen is bepaald met zowel kweek- als q-PCR-methoden. De resultaten van deze metingen zijn vermeld in Tabel 3-13 en samengevat in Tabel 3-14.

Bij 56-68% van de onderzochte monsters is het rendement van de DNA-extractie procedure vrij laag. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de aanwezigheid van specifieke componenten in de feces waardoor de extractieprocedure minder efficiënt verloopt. Het gevolg van deze lage rendementen is dat een minder betrouwbare kwantificatie van lage concentraties mogelijk is en deze lage rendementen zorgen ook voor een hogere detectiegrens in deze monsters. Heranalyse waarbij een kleinere hoeveelheid feces in bewerking wordt genomen, is in deze gevallen vaak een oplossing, maar was niet mogelijk

omdat het restant van de monsters was gebruikt voor de analyse van het droge stof gehalte. Op basis van metingen die KWR tot nu toe op feces heeft uitgevoerd, lijkt de aanwezigheid van een organisme meestal te betekenen dat de concentratie ook hoog is. Hierdoor is wellicht het belang van hogere rendementen iets minder groot dan voor drinkwatermonsters (waar vaak gemeten wordt rond de detectiegrens van de qPCR) en is de verwachting dat de gerapporteerde meetwaarden nog steeds wel relevant zullen zijn.

Tabel 3-13 Resultaten van analyses met kweek (Kolonie vormende eenheden/g feces (KVE/g) en q-PCR methoden (DNA kopieën/g feces) voor indicator organismen en q-PCR analyses voor pathogenen in feces van verschillende organismen. Zie toelichting onder de tabel voor betekenis kleurcodes. R% staat voor rendement extractie. De laatste twee fecesmonsters van rund betreffen een herhaalde bemonstering van feces met codes rund1 en rund2 op 19-08-2015.

Monsterdatum	organisme	Feces (mg)	Droogrest 105 °C (%)	Vocht-percentage (%)	R%	PCR resultaten - DNA kopieën/g							<i>E. coli</i> (incubatie 37 °C)	<i>E. coli</i> (incubatie 44 °C)	Enterococcen
						<i>Giardia A</i>	<i>Giardia B</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157	Enterococcen			
27-05-15	hond	75	34.6	65.4	32,3	<4,1E+03	<4,1E+03	<4,1E+03	9,4E+07	5,7E+08	<4,1E+03	1,9E+07		1,3E+08	7,2E+06
27-05-15	gans	55	24.7	75.3	9,5	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	2,9E+06		< 2,0E+02	1,5E+05
27-05-15	gans	53	30.3	69.7	4,4	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag		< 2,0E+02	< 2,0E+02
27-05-15	gans	58	39.4	60.6	5,0	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	1,2E+09	R te laag	5,9E+05		2,6E+07	9,8E+04
27-05-15	gans	56	32.2	67.8	11,3	<1,6E+04	<1,6E+04	<1,6E+04	<1,6E+04	7,0E+06	<1,6E+04	1,2E+06		6,0E+02	5,4E+06
27-05-15	gans	70	22.8	77.2	21,1	<6,8E+03	<6,8E+03	<6,8E+03	1,2E+05	<6,8E+03	<6,8E+03	2,6E+04		< 2,0E+02	2,0E+02
27-05-15	gans	101	20.2	79.8	5,9	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	3,6E+09	R te laag	3,5E+04		1,3E+08	< 2,0E+02
27-05-15	gans	68	25.9	74.1	3,4	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag		< 2,0E+02	< 2,0E+02
27-05-15	gans	62	30.5	69.5	33,6	<4,8E+03	<4,8E+03	<4,8E+03	<4,8E+03	<4,8E+03	<4,8E+03	<4,8E+03		< 2,0E+02	< 2,0E+02
19-08-15	rund1	102	16.8	83.2	3,9	R te laag	R te laag	R te laag	2,4E+09	2,0E+05	R te laag	6,6E+04	5,2E+04	3,0E+04	6,8E+05
19-08-15	rund2	107	13.9	86.1	8,5	R te laag	R te laag	R te laag	2,3E+08	2,0E+07	R te laag	5,8E+06	6,6E+04	2,6E+04	3,8E+06
19-08-15	rund	93	14.5	85.5	1,7	R te laag	R te laag	R te laag	4,9E+09	1,8E+05	R te laag	R te laag	2,4E+04	2,2E+04	4,0E+03
19-08-15	rund	66	15.3	84.7	0,7	R te laag	R te laag	R te laag	7,3E+06	2,9E+05	R te laag	R te laag	9,4E+03	1,1E+04	2,4E+03
14-10-15	hond	73	36.1	63.9	11,5	<1,2E+04	<1,2E+04	<1,2E+04	4,2E+06	<1,2E+04	<1,2E+04	4,8E+04	3,8E+06	4,4E+06	1,4E+06
14-10-15	konijn	73	30.2	69.8	0,9	R te laag	R te laag	R te laag	3,5E+06	R te laag	R te laag	R te laag	2,0E+03	2,6E+03	< 2,0E+02
14-10-15	konijn	64	42.9	57.1	1,5	R te laag	R te laag	R te laag	4,0E+05	R te laag	R te laag	R te laag	2,8E+03	5,2E+03	< 2,0E+02
14-10-15	mens	81	25.3	74.7	3,9	R te laag	R te laag	R te laag	6,2E+06	R te laag	R te laag	R te laag	< 2,0E+02	< 2,0E+02	2,0E+02
14-10-15	ree	96	57.5	42.5	3,5	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	1,5E+09	R te laag	9,4E+06	2,4E+07	2,8E+07	1,2E+05
14-10-15	ree	100	42.6	57.4	1,7	R te laag	R te laag	R te laag	R te laag	5,9E+05	R te laag	R te laag	4,0E+02	6,0E+02	1,6E+04
14-10-15	rund	110	13.8	86.2	10,7	<8,5E+03	<8,5E+03	<8,5E+03	2,5E+07	1,2E+07	<8,5E+03	1,5E+04	4,6E+05	5,6E+05	2,0E+02
14-10-15	rund	65	13	87	48,0	<3,2E+03	<3,2E+03	<3,2E+03	1,0E+09	1,2E+07	<3,2E+03	<3,2E+03	7,4E+03	7,8E+03	< 2,0E+02
14-10-15	rund	91	13	87	45,0	<2,4E+03	<2,4E+03	<2,4E+03	1,4E+10	3,2E+06	<2,4E+03	<2,4E+03	9,6E+04	1,3E+05	2,0E+02
14-10-15	rund	79	12.5	87.5	57,2	<2,2E+03	<2,2E+03	<2,2E+03	5,7E+10	2,5E+08	<2,2E+03	<2,2E+03	1,1E+07	1,2E+07	2,6E+03
14-10-15	rund1-herhaling	83	31.1	68.9	27,9	<4,3E+03	<4,3E+03	<4,3E+03	5,1E+05	4,7E+06	<4,3E+03	<4,3E+03	1,7E+06	2,8E+06	7,4E+03
14-10-15	rund2-herhaling	85	39.8	60.2	23,4	<5,0E+03	<5,0E+03	<5,0E+03	1,4E+06	6,5E+06	<5,0E+03	<5,0E+03	4,4E+05	5,0E+05	2,0E+02

Bij rendementen beneden de 10% is hier een getal gerapporteerd. Let wel op dat de waarden die hierbij staan een grotere onzekerheid hebben.

Doelorganisme aangetoond, rendement meer dan 10%	Doelorganisme niet aangetoond, rendement meer dan 10%
Doelorganisme aangetoond, rendement minder dan 10%	Doelorganisme niet aangetoond, rendement minder dan 10%

Tabel 3-14. Relatieve aanwezigheid van indicator organismen en pathogenen (als percentage van het aantal (n) verzamelde monsters) in de fecaliën van verschillende organismen.

Org.	n	q-PCR resultaten							Kweek	
		<i>Giardia</i> A	<i>Giardia</i> B	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157	Enterococci	<i>E. coli</i>	Enterococci
rund	8	0%	0%	0%	100%	100%	0%	38%	100%	88%
gans	8	0%	0%	0%	13%	38%	0%	63%	38%	50%
hond	2	0%	0%	0%	100%	50%	0%	100%	100%	100%
konijn	2	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	0%
ree	2	0%	0%	0%	0%	100%	0%	50%	100%	100%
mens	1	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	100%

3.5.1 Pathogenen: *E. coli* O157, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Campylobacter* in q-PCR-analyses

Van de onderzochte pathogene micro-organismen is met de q-PCR techniek alleen *Campylobacter* aangetoond in de verzamelde fecesmonsters. *E. coli* O157, *Cryptosporidium*, en *Giardia* A en B werden niet aangetoond. *Campylobacter* was aanwezig in alle verzamelde fecaliën van het rund en varieerde van 10^5 tot 10^9 DNA kopieën/g (Tabel 3-13). Daarnaast werd *Campylobacter* aangetroffen in de feces van mens (10^6 DNA kopieën/g, n=1), konijn (10^5 - 10^6 DNA kopieën/g, n=2), en hond (10^6 - 10^7 DNA kopieën/g, n=2). In de feces van ganzen werd in één van de acht monsters *Campylobacter* (10^5 DNA-kopieën/g) aangetoond (Tabel 3-14).

Opvallend is dat *Campylobacter* ook werd aangetoond in de bijna twee maanden oude feces van runderen (de herhaalmonsters in Tabel 3-13). Wel was het aantal aangetoonde DNA kopieën/g in oktober een factor 10^2 - 10^4 lager dan in augustus. In deze periode was het vochtgehalte van de feces afgenomen van ca. 85% naar ca. 65%.

3.5.2 Fecale indicatororganismen (*E. coli* en enterococci) in q-PCR-analyses

Het fecale indicatororganisme *E. coli* werd aangetroffen in alle verzamelde feces van rund (10^5 - 10^8 DNA kopieën/g) en van ree (10^5 - 10^9 DNA kopieën/g), maar niet in die van konijn en mens (Tabel 3-13). *E. coli* werd aangetoond in één van de twee fecesmonsters van hond (10^8 DNA kopieën/g) en in 3 van de 8 fecesmonsters van gans (10^6 - 10^9 DNA kopieën/g).

Enterococci werden aangetroffen in beide monsters van hond (10^4 - 10^7 DNA kopieën/g), maar niet in die van mens en konijn. Voor gans, ree en rund varieerden de resultaten sterk. In ganzen-feces werden in 5 van de 8 monsters enterococci aangetoond (10^4 - 10^6 DNA kopieën/g). Voor ree was dit het geval in één van beide monsters (10^6 DNA kopieën/g) en voor rund in 3 van de 10 monsters (10^4 - 10^6 DNA kopieën/g)..

In de twee herhaal bemonsteringen van rund werden na twee maanden geen enterococci meer aangetoond, maar wel nog altijd *E. coli* en zelfs in vergelijkbare aantallen (Tabel 3-13).

3.5.3 Fecale indicatororganismen (*E. coli* en enterococci) in kweek analyses

In de monsters van 27 mei waren *E. coli* en enterococci regelmatig afwezig in de feces van de gans (Tabel 3-13). Mogelijk is dit het gevolg van de snelle uitdroging van dit type fecaliën. Voor het overige varieerde de concentratie *E. coli* tussen 10^2 en 10^8 kve/g FW, terwijl de concentratie enterococci varieerde tussen 10^2 en 10^6 kve/g FW.

In fecaliën van het rund varieerde de concentratie *E. coli* (37 en 44 °C) tussen 10^3 en 10^7 kve/g FW en de concentratie enterococci tussen 10^2 en 10^6 kve/g FW. Voor de fecaliën van het ree varieerde de concentratie *E. coli* (37 en 44 °C) tussen 10^2 en 10^7 kve/g FW en de

concentratie enterococcon tussen 10^4 en 10^5 kve/g FW. In de fecaliën van het konijn was de concentratie *E. coli* (37 en 44 °C) 10^3 kve/g FW, terwijl de concentratie enterococcon $<10^2$ kve/g FW was. In de fecaliën van de hond varieerde de concentratie *E. coli* tussen 10^6 en 10^8 kve/g FW, terwijl de concentratie enterococcon 10^6 kve/g FW bedroeg. In de fecaliën van de mens werd geen *E. coli* aangetroffen ($<10^2$ kve/g FW) en was de concentratie enterococcon 10^2 kve /g FW.

Kort samengevat kan gesteld worden dat alleen voor het rund en (in mindere mate) voor de gans voldoende fecaliën zijn verzameld om een redelijk beeld te krijgen van de concentraties *E. coli* en enterococcon. Uit de resultaten blijkt dat de variatie in de aangetroffen concentraties relatief groot is, waarbij voor de gans wordt opgemerkt dat uitdroging van fecaliën een rol kan spelen bij het wel of niet aantonen van *E. coli* en enterococcon. Verder is het opmerkelijk dat in fecaliën van de mens geen *E. coli* werd aangetoond.

In de twee herhaal bemonsteringen van rund werden na twee maanden met de kweek methode zowel *E. coli* als enterococcon aangetoond. De concentratie was voor enterococcon wel met een factor 10^2 - 10^4 afgenomen. De concentraties *E. coli* waren echter zelfs nog wat hoger in vergelijking met twee maanden eerder (Tabel 3-13).

3.5.4 Virus bepalingen (RIVM)

Uit de qPCR-analyses voor de in Tabel 3-15 genoemde virussen, die door het RIVM zijn uitgevoerd op het humane feces monster, bleek dat geen van de onderzochte virussen is aangetroffen.

Tabel 3-15. Analyseresultaten van virus bepalingen aan humaan feces monster. ^a Genomisch materiaal – RNA of DNA. (Bron: Lodder, 2015).

Naam virus	Analyse resultaat
Enterovirus ^a	niet aangetoond
Norovirus GI	niet aangetoond
Norovirus GII	niet aangetoond
Adenovirus totaal	niet aangetoond
Adenovirus 40/41	niet aangetoond
Rotavirus	niet aangetoond

4 Discussie en conclusies

4.1 Verspreiding van fecaliën en totale fecale belasting

De totale fecale belasting door mens of dier en de daarmee samenhangende theoretische infectierisico's worden bepaald door de hoeveelheid en verspreiding van de fecaliën en de besmettingsgraad van de feces met indicatororganismen en pathogenen. Uit dit onderzoek bleek, net als bij het pilotproject in ICAS (Dorland *et al.*, 2014), de verspreiding van fecaliën, en dus ook van de dieren), sterk afhankelijk te zijn van voedselaanbod en terreincondities.

De runderen worden jaarlijks in juni in het gebied gelaten met als doel om via deze seizoensbegrazing de biomassaproductie van de vegetatie te beperken en het duingrasland kort de winter in te laten gaan. Aangezien runderen niet noodzakelijkerwijs ontlasten op dezelfde plek waar zij grazen (vaak zijn deze locaties van elkaar gescheiden), kunnen op basis van de getelde fecaliën geen harde uitspraken worden gedaan over preferent voorkomen van runderen in het gebied. Op basis van inventarisatie van Marten Annema (Evides) komt de dichtheid van de locaties met runderfeces wel goed overeen met de intensiteit van begrazing. Voor het volgen van runderen door een gebied zijn andere methoden, zoals GPS-kragen of Remote Sensing, geschikter.

In het stochastische verspreidingsmodel dat in kader van DPWE is ontwikkeld (Penders *et al.*, 2015), dat weer een vereenvoudiging is van het BTO model uit 2012 (Hijnen *et al.*, 2012), wordt uitgegaan van een random verdeling van de fecaliën over een terrein. Uit dit onderzoek blijkt dat deze random verdeling wel opgaat voor de directe invloeds-afstand van de put of drain (0-10 m). Op een afstand van meer dan 10 m van een drain of winput neemt de kans op aanwezigheid van runderfecaliën sterk af. Deze data kunnen derhalve aanleiding zijn het stochastische verspreidingsmodel te verfijnen.

Afgaande op de verspreiding van fecaliën in augustus, is de fecale belasting in deze periode hoger in de wat drogere duingraslanden bij drains 4 en 7, terwijl de fecale belasting in de vochtige duinvalleien 6-midden en 9-west minder hoog is. Enkele maanden later, tijdens de meting in oktober, was de fecale belasting in drain 6-midden nog altijd beperkt. Er werden daar nagenoeg geen fecaliën geteld. Bij drain 9-west werden daarentegen op dat moment wel fecaliën aangetroffen. De feces van runderen bevatten hoge concentraties *Campylobacter*, *E. coli* en – in sommige gevallen – enterococcen. Gezien de hoge totale fecale belasting (tot wel meer dan 375 kg per drain per begrazingsperiode), vormen de runderfecaliën een duidelijk potentieel infectierisico. De totale fecale belasting van runderfecaliën is bij de onderzochte drains die een ondiepe onverzadigde zone hebben (drains 6-midden en 9-west) aanzienlijk kleiner (respectievelijk 138 en 164 kg). Echter, ook hier kan het besmettingsrisico groot zijn vanwege het grotere risico op kortsluitstroming door de ondiepe onverzadigde zone. De mate van afsterving van pathogeen en de indicatororganismen bleek in het veld ook lager dan gedacht. In beide runderfecaliën die na 2 maanden opnieuw waren bemonsterd, bleken de concentraties van deze organismen onverminderd hoog. Een verklaring voor deze overleving is vermoedelijk het feit dat alleen de buitenkant van deze fecaliën sterk uitdroogt, terwijl aan de binnenkant nog steeds vochtige omstandigheden aanwezig zijn. Het vochtpercentage van de 2-maanden oude feces was binnenin nog altijd 65%, slechts 20% minder dan in verse staat. Beschermd door deze korst zijn de omstandigheden binnenin kennelijk dermate dat overleving ook op langere termijn mogelijk is. Bij (hevige) regenval kunnen deze organismen alsnog in de bodem terecht komen.



Figuur 4-1. Foto van twee-maanden oude runderfeces. Vooral de buitenkant is sterk uitgedroogd, terwijl de binnenzijde nog een vochtigheidspercentage van 65% had.

Na de runderen, vormen ganzen de tweede belangrijke potentiële besmettingsbron in dit gebied. Hoewel ganzenkeutels bij alle drains werden aangetroffen, werden de hoogste aantallen gevonden in het noordoostelijke deel van het gebied, rechts van het doorgaande fietspad naar zee. Deze gedeelten worden nauwelijks door recreanten bezocht en de ganzen vinden daar rust en beschutting (infiltratiepanden met hun rietkragen) en hebben voldoende voedsel ter beschikking. Zowel met de kweekmethode als met q-PCR werden *E. coli* en enterococci in de ganzenkeutels aangetoond. De hoogte van de concentraties varieerde echter sterk tussen de keutels onderling en deze organismen waren ook niet in alle keutels aanwezig. Medewerkers van Aqualab Zuid veronderstelden dat wisselende vochtgehalten van de keutels de oorzaak van deze grote variatie zouden kunnen zijn. Analyse van de vochtgehalten van de verzamelde keutels liet echter geen duidelijk verband zien, want ook bij de monsters met de laagste vochtgehalten werden deze organismen aangetoond. *Campylobacter* werd slechts in één ganzenkeutel aangetoond en lijkt een minder belangrijk risico te vormen. Onderzoek aan *Campylobacter* populaties in feces van wilde ganzen in Oxfordshire (Verenigd koninkrijk) toonde echter aan dat een groot aantal ganzen wel degelijk dragers waren van *Campylobacter* (Colles et al., 2008). De auteurs concludeerden overigens ook dat ganzen in beperkte mate een risico vormen voor infectie van mensen, maar deden dat op basis van het feit dat de geïsoleerde genotypen van *Campylobacter* (vooral *C. jejuni*) sterk soortspecifiek bleken te zijn.

Ook konijnen zijn in dit gebied een potentiële bron van besmetting. Met name bij drain 7, waar zij net als ganzen in de grootste aantallen voorkomen, was de fecale belasting hoog. Uitgedrukt in grammen fecaliën was de totale fecale belasting door konijn wel aanzienlijk lager dan die van ganzen en runderen. In dit onderzoek zijn slechts twee monsters van konijnenkeutels op pathogenen en indicatororganismen onderzocht en duidelijke conclusies over het potentiële infectierisico kunnen derhalve niet worden getrokken. Echter, net als bij het eerdere onderzoek in ICAS (Dorland et al., 2014) werden in beide monsters *Campylobacter* en *E. coli* aangetoond. Het is daarom mogelijk dat konijnen ook bijdragen aan de belasting van het ruwwater met *Campylobacter*. Bij de huidige omvang van de

konijnenpopulatie in dit gebied valt deze bijdrage echter volkomen in het niet bij die t.g.v. de runderfeces. Anders dan bij de metingen in ICAS werden enterococci bij de feces van konijnen afkomstig van dit gebied noch met kweekmethode, noch met q-PCR aangetoond.

Vooraf was de verwachting dat ook honden voor een fecale belasting in het gebied zouden kunnen zorgen. Het aantal fecaliën van honden bij de onderzochte drains bleek echter zeer gering. Hoewel in de feces van honden wel *Campylobacter*, *E. coli* en enterococci werden aangetroffen, vormden honden in het wingebied van productielocatie Ouddorp tijdens dit onderzoek een zeer laag besmettingsrisico. Ditzelfde geldt voor mens, haas en ree waarvan feces in (zeer) geringe mate in het gebied werd waargenomen. Een kanttekening hierbij is dat voor konijn, haas en ree de berekende fecale belasting een onderschatting van de werkelijkheid zal zijn vanwege de kleinere trefkans van hun fecaliën.

4.2 Gebruikte methode

In dit onderzoek is gedurende meerdere inventarisatieronden de positie van fecaliën nauwkeurig bepaald met behulp van een GPS-RTK. Dit is arbeidsintensief werk, waardoor bij een groot onderzoeksgebied als hier bij productielocatie Ouddorp, de focus is komen te liggen op feces van runderen en ganzen. Alternatieve methoden voor het in kaart brengen van de verspreiding van fecaliën in drinkwaterwingebieden kunnen daarom interessant zijn. Een mogelijkheid die het verdient om onderzocht te worden, is de inzet van drones. Vermoedelijk zijn fecaliën van runderen en andere grote grazers groot genoeg en van voldoende contrast met hun omgeving om middels patroonherkenning door drones in kaart gebracht te kunnen worden. Anders zal dit liggen voor de veel kleinere feces van ganzen, konijnen, reeën en hazen.

4.3 Conclusies en aanbevelingen

- In het wingebied van productielocatie Ouddorp werden fecaliën van mens, hond, ree, konijn, haas, gans en rund aangetroffen. Daarmee wordt voldaan aan de wens om het inventarisatieprotocol, dat was opgesteld in het onderzoek in ICAS (Dorland *et al.*, 2014), toe te passen in een gebied met bovengenoemde potentiële besmettingsbronnen.
- Op basis van de geschatte totale fecale belasting per diersoort wordt geconcludeerd dat runderen het grootste potentiële risico vormen, gevolgd door ganzen en (op grote afstand) konijnen.
- Reeën, hazen, honden en mensen vormen een geringer potentieel risico. De fecale belasting van deze bronnen is beperkt.
- Runderen kunnen zich vrijelijk door het gebied begeven, maar lijken zich in de maanden na inscharing (in juni) voornamelijk te bevinden in de omgeving van drains 4 en 7. Daar werden de hoogste aantallen fecaliën geteld, terwijl in de vochtige duinvalleien bij drains 6-midden en 9-west lagere aantallen werden aangetroffen. Desondanks kan ook in laatstgenoemde drains het potentiële infectierisico groot zijn, omdat daar de onverzadigde zone boven de drain gering is en bij natte omstandigheden kortsluitstromen mogelijk zijn.
- De verspreiding van ganzen en konijnen in het gebied lijkt in sterke mate te worden bepaald door de factoren rust, beschutting en voedselaanbod. Zij vinden deze het meest bij drain 7.
- Afsterving van *Campylobacter*, *E. coli* en enterococci in twee runderfeces monsters over de periode 19 augustus-14 oktober was beperkt. Runderfecaliën (of andere grote fecaliën aan massa, waarbij door korstvorming een situatie gecreëerd wordt

waarbij de binnenkant vochtig blijft) kunnen derhalve voor langere tijd een potentiële besmettingsbron zijn.

- De resultaten van dit onderzoek kunnen worden gebruikt als input voor het stochastische model voor de voorspelling van infectierisico's van Hijnen et al. (2012) en Penders et al. (2015). Daarnaast zijn de uitkomsten van belang voor mogelijke nieuwe ontwikkelingen binnen het voorspellingsmodel voor vegetatie (PROBE; begrazingsmodule) en lopend BTO onderzoek naar transport van pathogenen door de onverzadigde zone.
- Het verdient aanbeveling om te onderzoeken of drones kunnen worden ingezet bij het in kaart brengen van ruimtelijke verspreidingspatronen van feces van grote grazers in de duinwaterwingebieden.

4.4 Dankwoord

De auteurs bedanken Marten Annema van Evides voor zijn assistentie tijdens de inventarisatierondes. Goffe Elsinga, Alex Zoontjes, en Nanda Berg worden bedankt voor het uitvoeren van de q-PCR analyses en vochtgehalte bepalingen. Tenslotte danken wij de DPW-Begeleidingsgroep Waterkwaliteit voor haar input t.a.v. de proefopzet.

5 Literatuur

Aggenbach, C.J.S., Annema, M., en Doomen, A. (2007). Effecten van herinrichting Oost- en Middelduinen op natuur. Tussenrapportage 1999-2005. KWR06.007.

Dorland, E., Hijnen, W.A.M., en Heijnen, L. (2014). Verspreiding van fecaliën in de waterwingebieden van de DPW bedrijven. KWR 2014.013.

Heijnen, L. (2009) Pathogenen in de mest van grazers. KWR Rapport i.o.v. Waternet.

Heijnen, L. (2013) Kwantitatieve PCR methode voor detectie van menspathogene *Cryptosporidium* en *Giardia*. BTO rapport 2013.218(S).

Heijnen, L. en Medema, G. (2006) Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *J Water Health* 4 (4), 487-498.

Heijnen, L. en Medema, G. (2009) Method for rapid detection of viable *Escherichia coli* in water using real-time NASBA. *Water Res* 43(12), 3124-3132.

Heijnen, L. (2012a) Pathogenen in mest. In Gezondheidsrisico's van fecale verontreiniging in waterwingebieden door begrazing en recreatie: Literatuuronderzoek en ontwikkeling van een stochastisch model. BTO rapport 2012.015.

Hijnen, W., Blokker, M., Heijnen, L. en Vink, K. (2012) Gezondheidsrisico's van fecale verontreiniging in waterwingebieden door begrazing en recreatie: Ontwikkeling van een stochastisch model. BTO rapport 2012.015.

Hijnen, W.A.M., Brouwer-Hanzens, A.J., Smit, H., Oorthuizen, W.A., Dullemond, Y.J. en Hoogenboezem, W. (2013). Uitspoeling van pathogene micro-organismen uit Galloway mest en menselijke diarree tijdens regenval. KWR 2013.024.

Hoogenboezem, W., Ketelaars, H.A.M., Medema, G.J., Rijs, G.B.J. en Schijven, J.F. (2001). *Cryptosporidium* and *Giardia*: occurrence in sewage, manure and surface water. Report for the Association of River Waterworks - RIWA.

Lodder, W., 2015. Eindrapportage virus resultaten humaan feces monster. 158/15 Z&O WL/sr, RIVM.

Nobel, P.J. en Schrama, E.J. (2003). Effecten van begrazing Solleveld op de microbiologische waterkwaliteit. KWR 03.038.

Penders, E.J.M., Van Lieverloo, J.H.M., Hijnen, W.A.M., en Blokker E.J.M. (2015) Microbiologische risico's bij de winning van drinkwater na duininfiltratie. DPW rapport 2015.021.

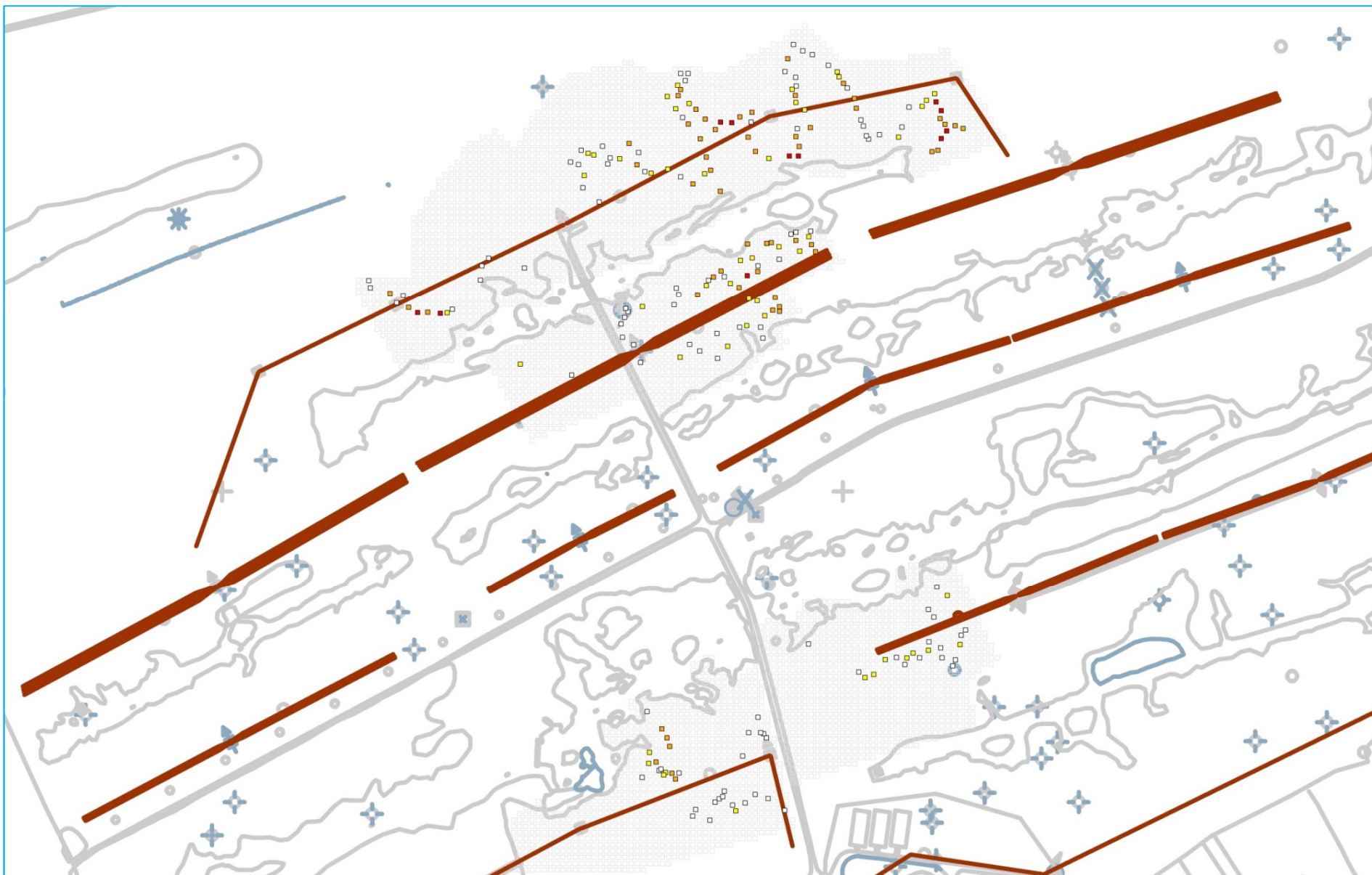
Schijven, J.F. (2001). Virus removal from groundwater by soil passage. Technische Universiteit Delft, Delft, the Netherlands.

Van der Goes en Groot, 2015. Vegetatiekartering waterwingebied de Middel- en Oostduinen 2014. G&G rapport 2015-13.

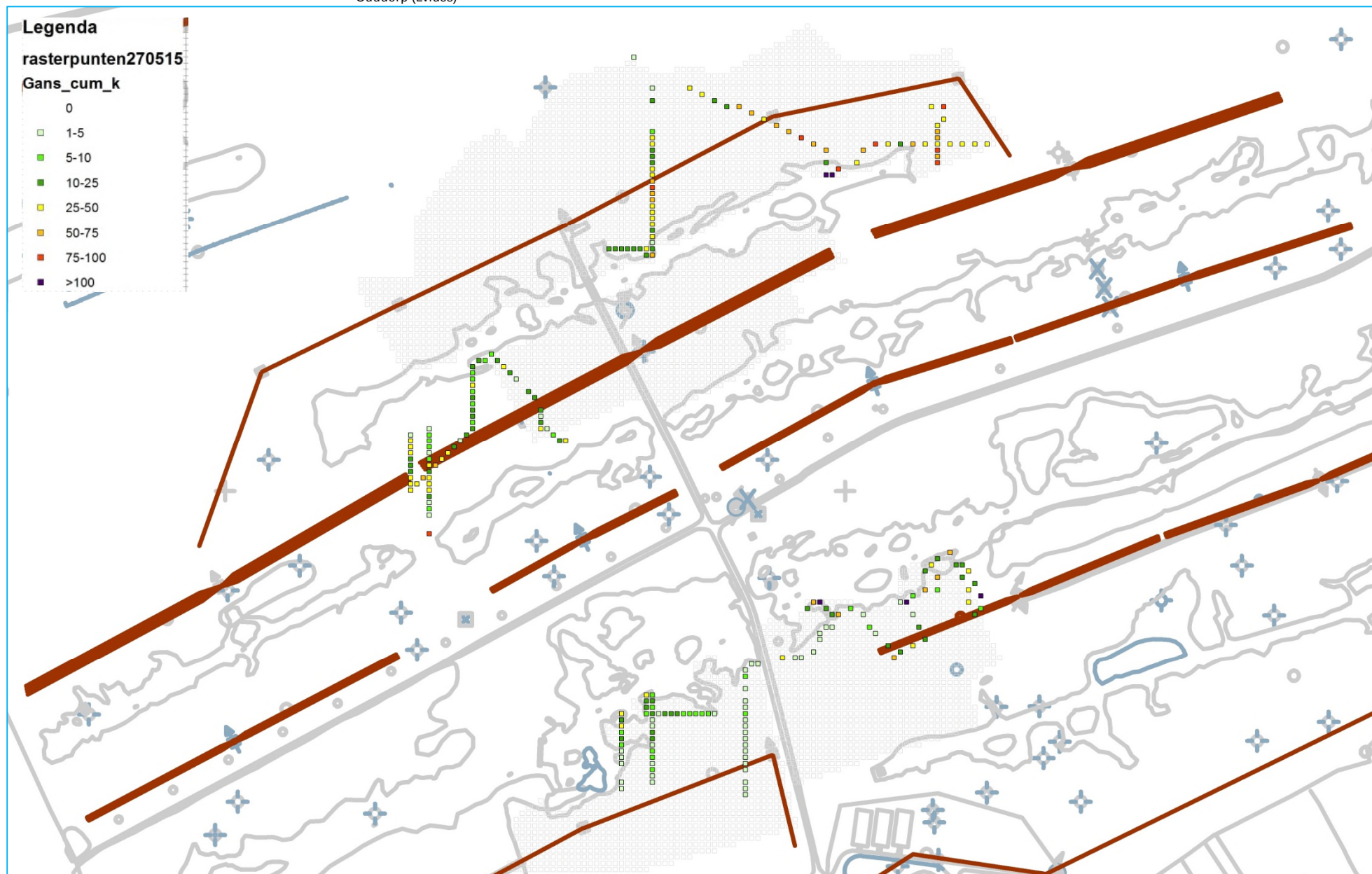
6 Bijlage

- 6.1 [Verspreidingskaarten fecaliën](#)
- 6.2 [Vereenvoudigde vegetatiekaart](#)

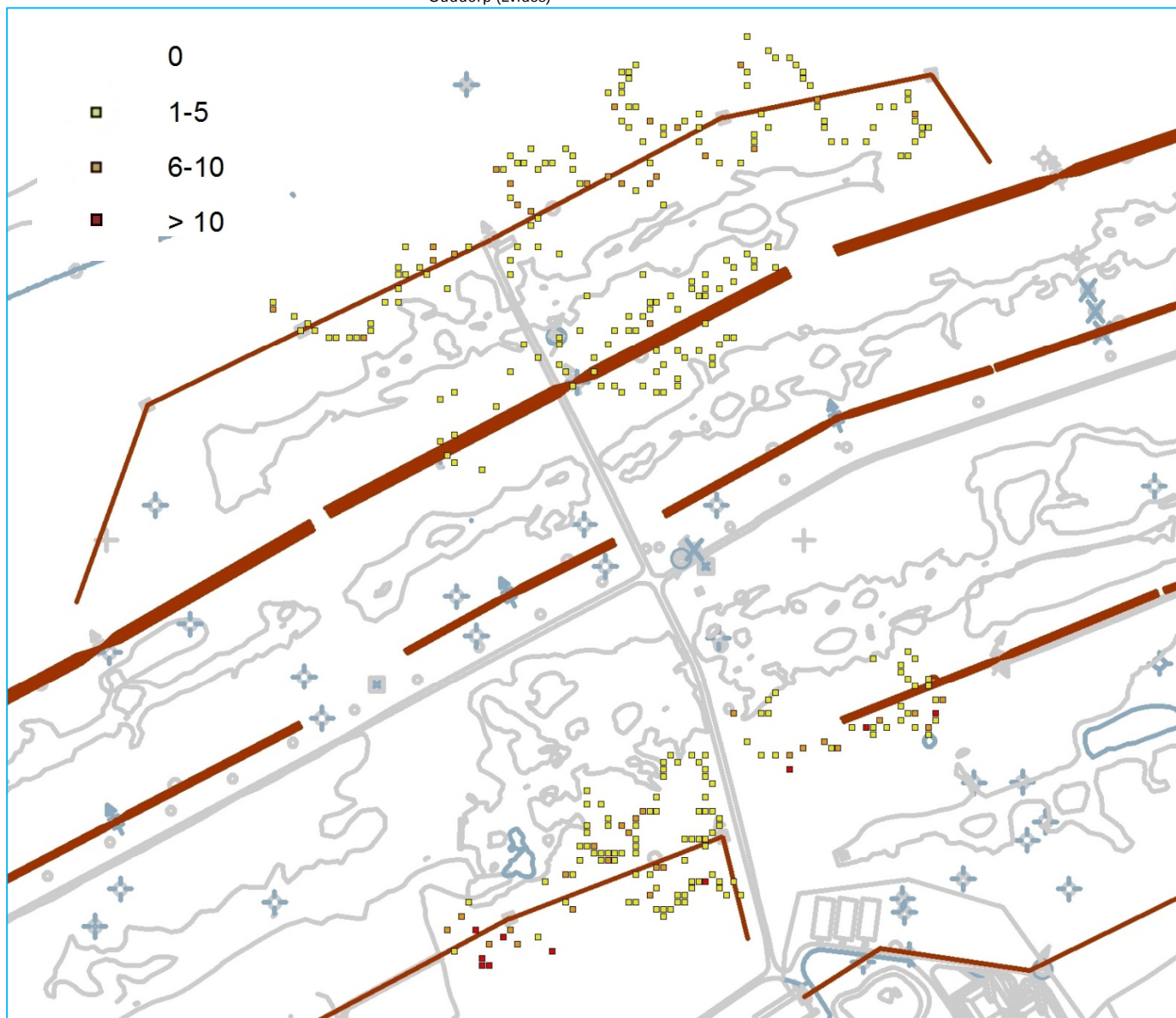
Bijlage 6.1 Onderstaande figuren zijn een grotere weergave van de in tekst van hoofdstuk 3 opgenomen figuren.



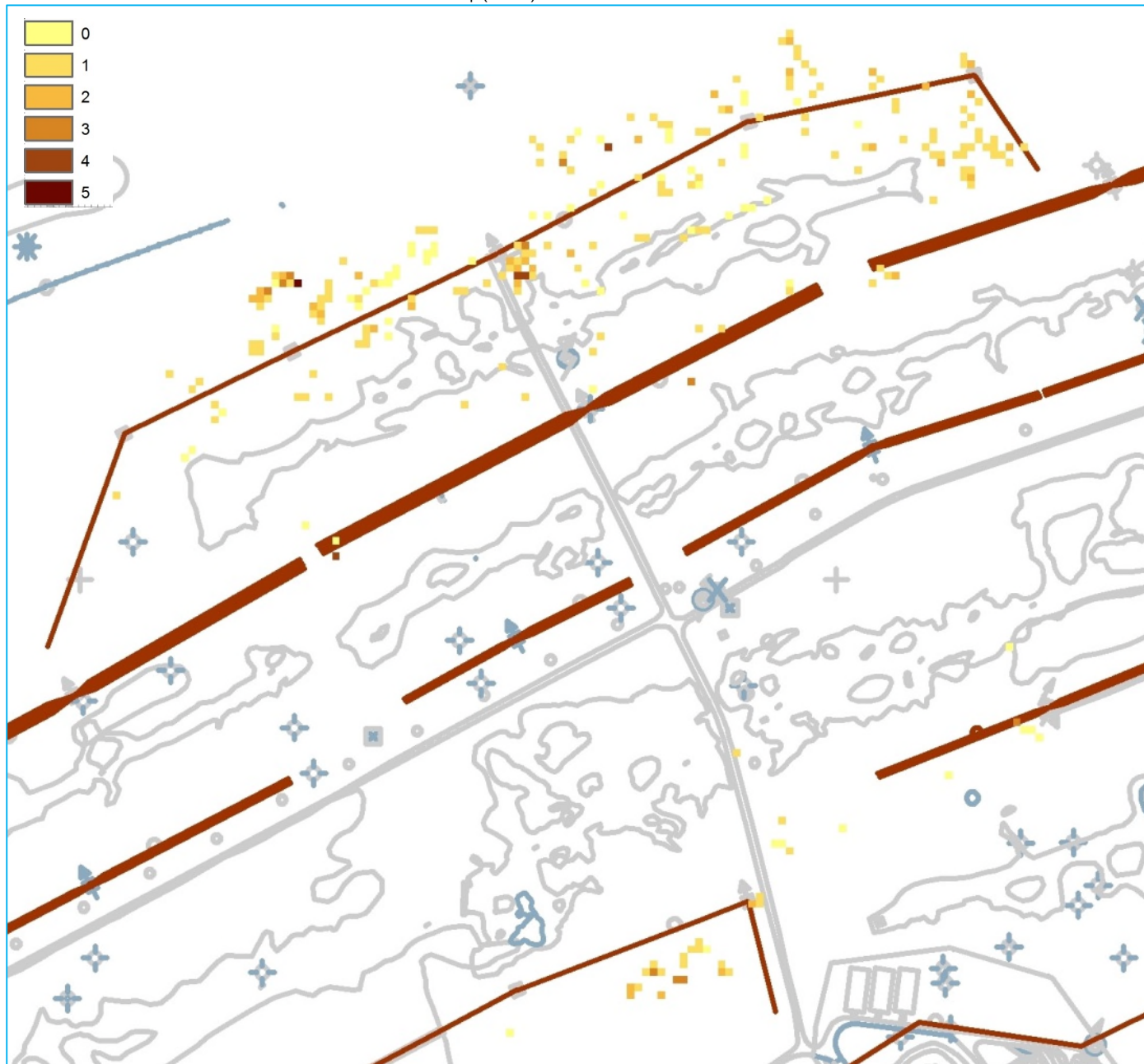
Figuur B1. Verspreiding fecaliën van ganzen in maart 2015.



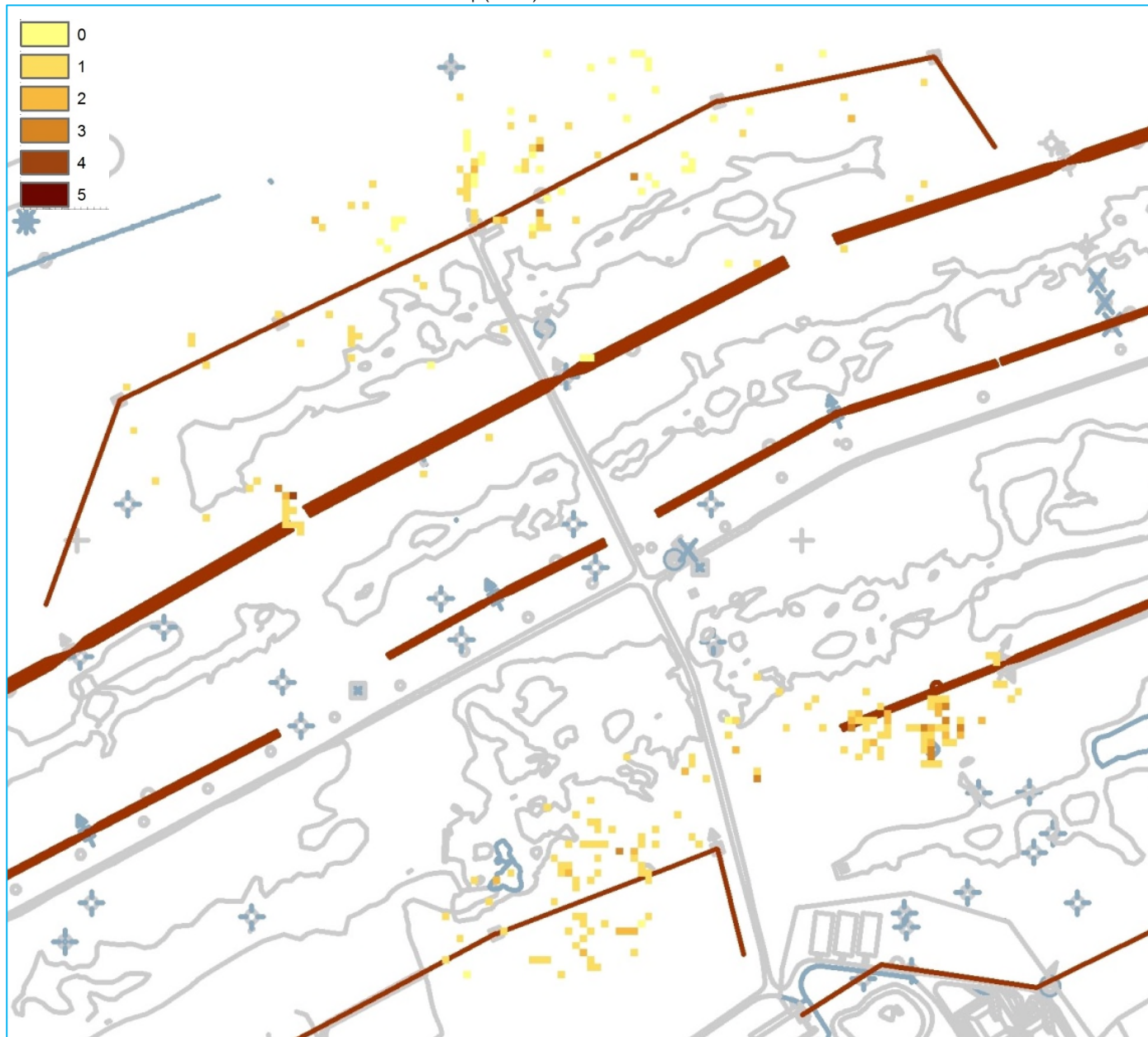
Figuur B2. Verspreiding fecaliën van ganzen in mei 2015.



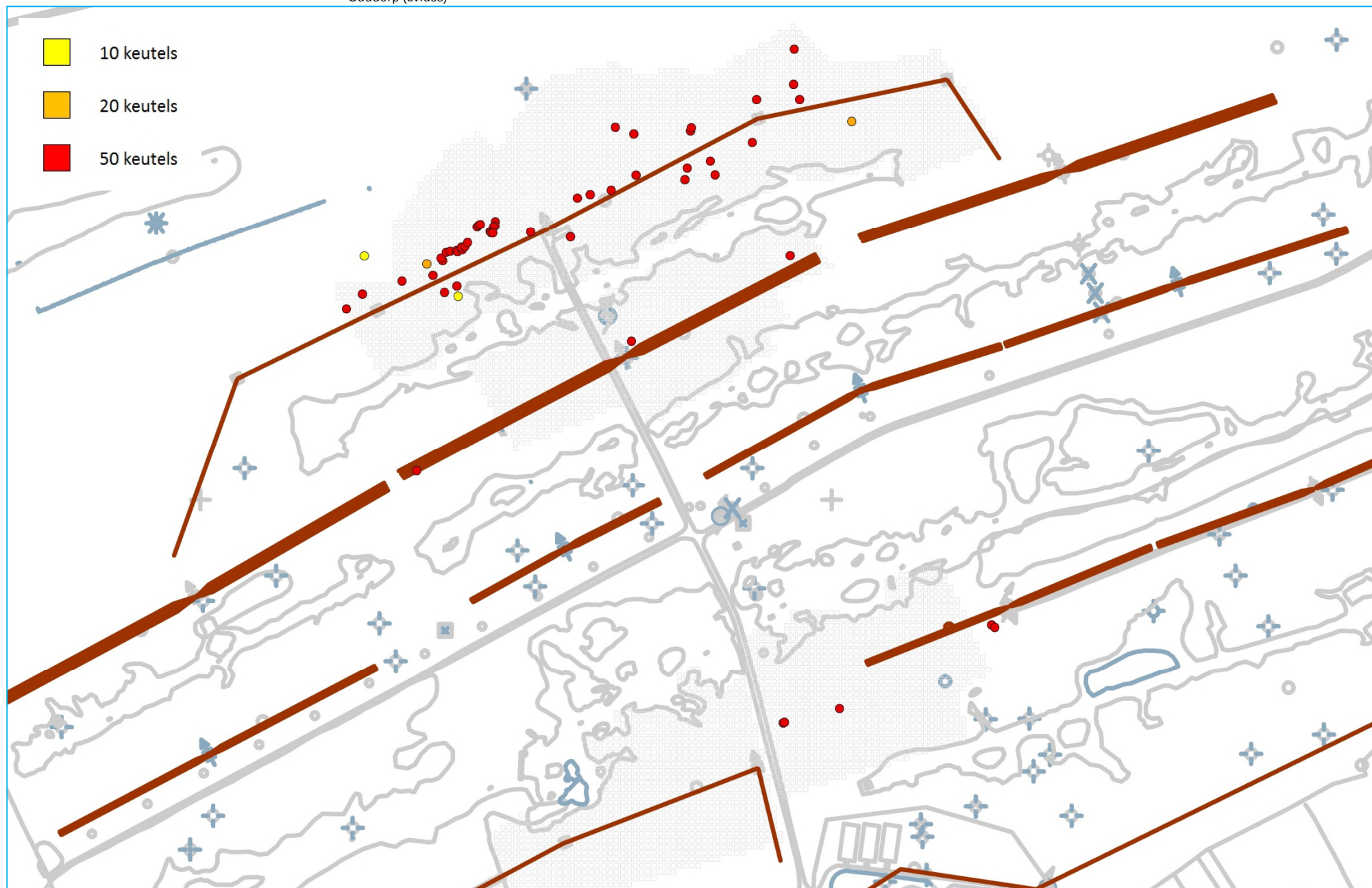
Figuur B3. Verspreiding fecaliën van runderen in periode juni 2014-maart 2015.



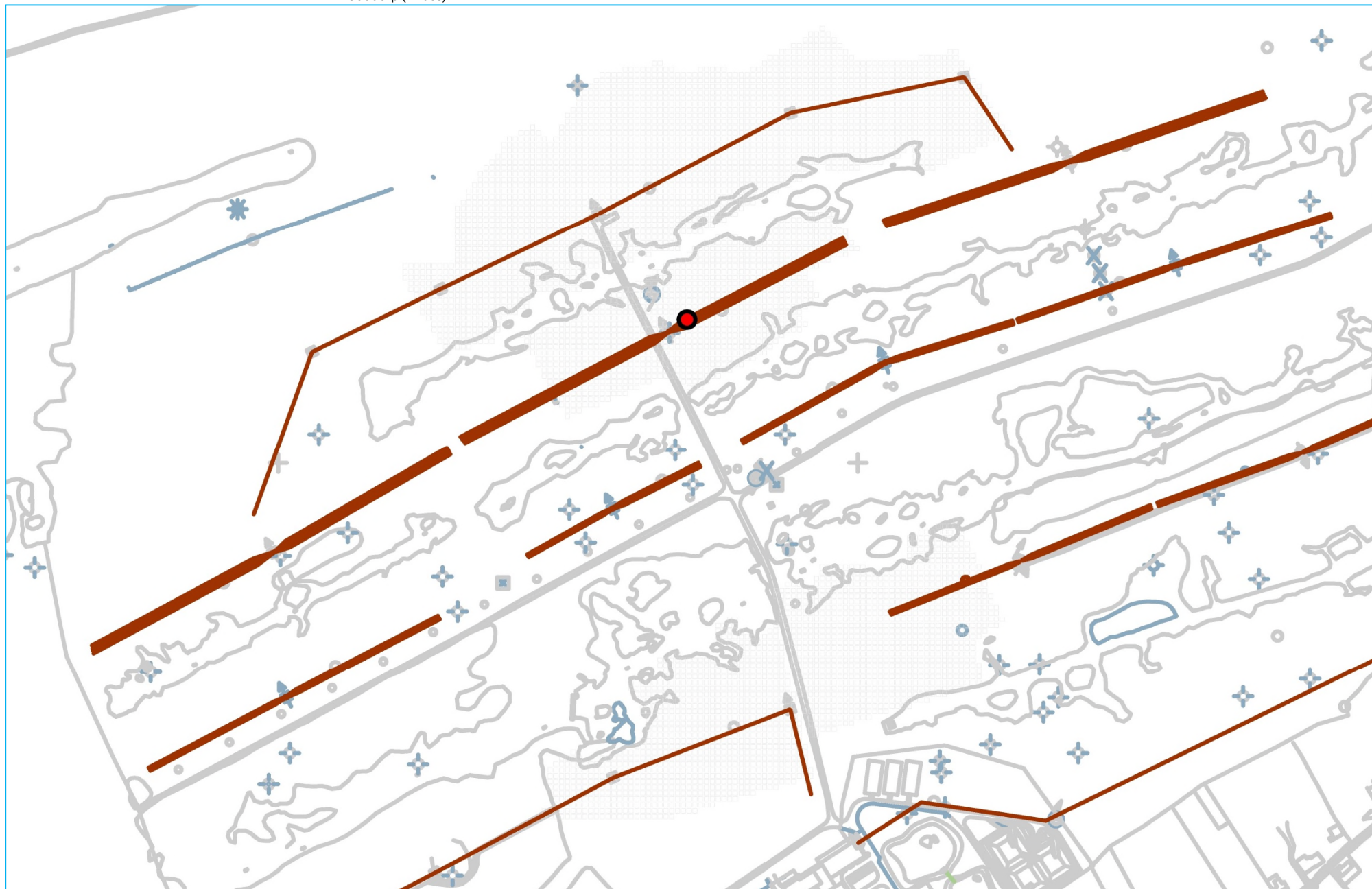
Figuur B4. Verspreiding fecaliën van runderen in augustus 2015.



Figuur B5. Verspreiding fecaliën van runderen in oktober 2015.

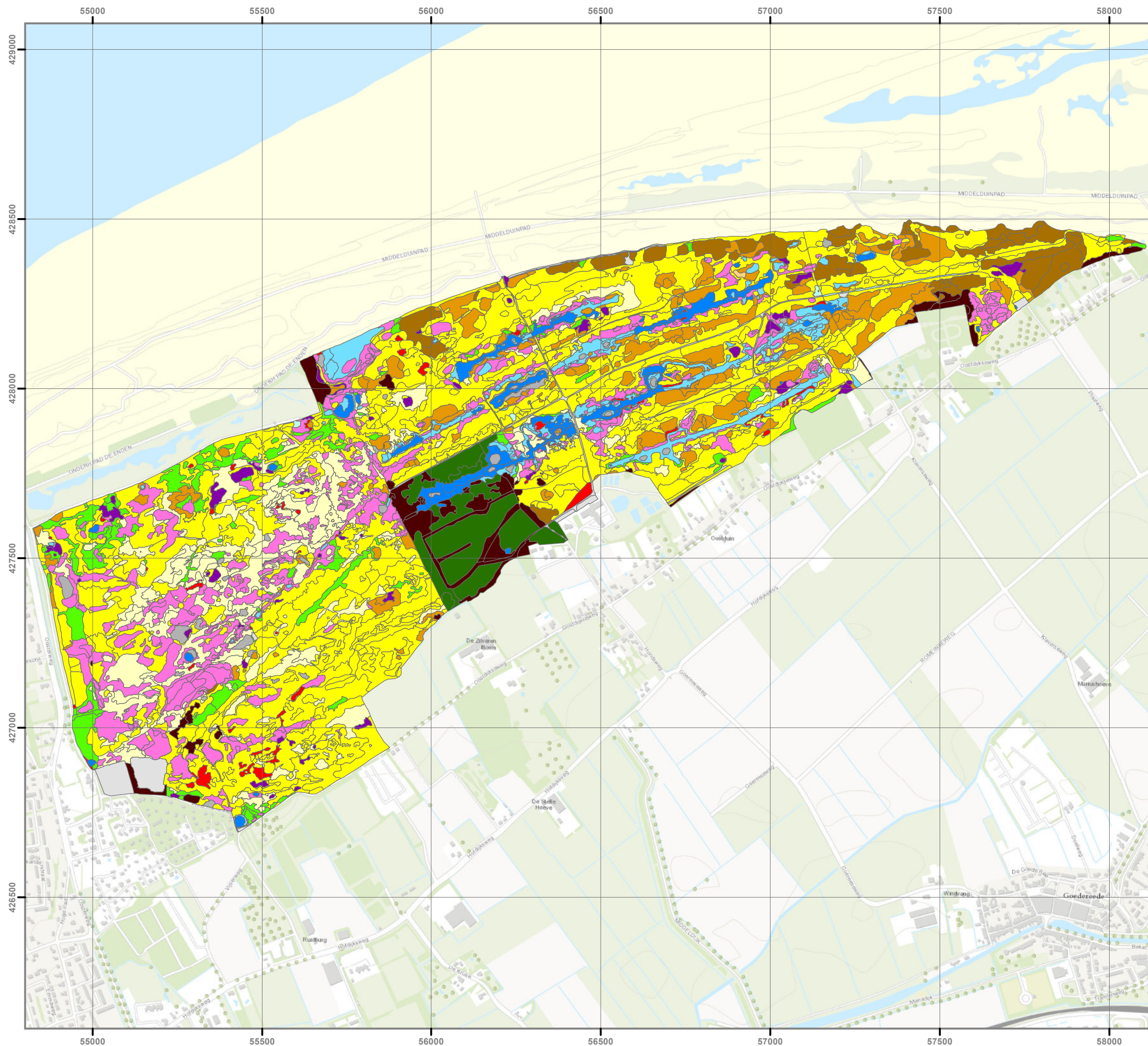


Figuur B6. Verspreiding fecaliën van konijnen in augustus 2015.



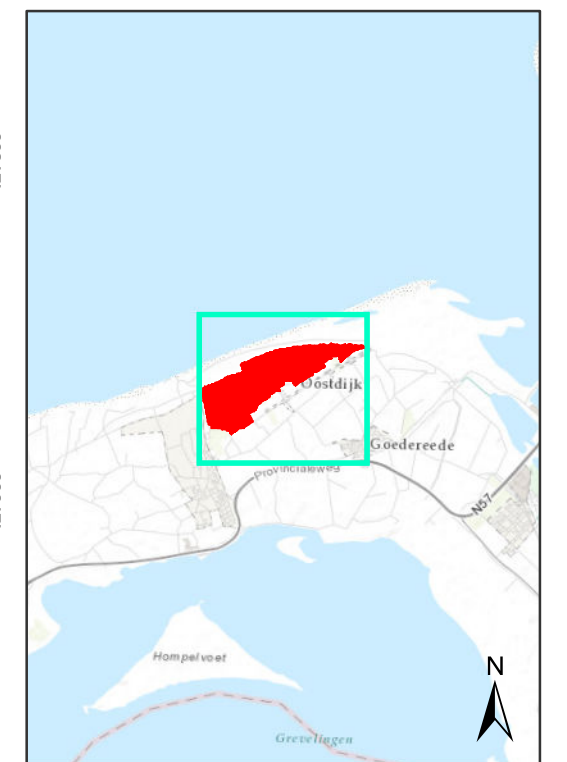
Figuur B7. Locatie vondst humane feces op 14 oktober 2015.

Bijlage 6.2 Vereenvoudigde vegetatiekaart 1:11.000, uit Van der Goes en Groot (2015).



Middel- en Oostduinen

- WATERVEGETATIE
- MOERASVEGETATIE
- DUINVALLEIVEGETATIE
- MATIG VOEDSELRIJK, VOCHTIG GRASLAND
- HEISCHRAAL GRASLAND
- DROOG GRASLAND
- PIONIERVEGETATIE VAN DROGE GROND
- RUIGTE
- ZOOM EN KAPVLAKTE VAN BOS EN STRUWEEL
- WILGENSTRUWEEL
- BRAAMSTRUWEEL
- DUINDOORNSTRUWEEL
- WEGEDOORN- EN MEIDOORNSTRUWEEL
- NAALDBOS
- LOOFBOS
- OVERIG



Bijlage 5

Vereenvoudigde vegetatiekaart 2014



© Topografische Dienst Kadaster

0 0,45 km