

Vrijlevende protozoa in het reine water en in het distributiesysteem van twee grondwaterpompstations

BTO 2010.019

mei 2010

Vrijlevende protozoa in het reine water en in het distributiesysteem van twee grondwaterpompstations

BTO 2010.019
mei 2010

© 2010 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.

Colofon

Titel

Vrijlevende protozoa in het reine water en in het distributiesysteem van twee grondwaterpompstations

Projectnummer

111.546.100.004

Onderzoeksprogramma

BTO

Projectmanager

Ir. Wiel J. M. K. Senden (tot november 2007)

Dr. ir. Patrick W. M. H. Smeets

Opdrachtgever

College van Opdrachtgevers CVO

Kwaliteitsborger

Dr. ir. Dick van der Kooij

Auteurs

Ir. Rinske M. Valster, ir. Bart A. Wullings, Geo L. Bakker en dr. ir. Dick van der Kooij

Verzonden aan

Dit rapport is selectief verspreid onder medewerkers van BTO-participanten en is verder niet openbaar.

Voorwoord

Het onderzoek naar de identiteit van vrijlevende protozoa in het drinkwater en in biofilms in het leidingnet maakte deel uit van het BTO-project gericht op het bepalen van de invloed van de watersamenstelling op de groei van legionellabacteriën in leidingwaterinstallaties. Dit project omvatte onder meer een onderlinge vergelijking van het water afkomstig van de productiebedrijven Amersfoortseweg en Spannenburg (Vitens N.V.). Bij deze vergelijking werd de aanwezigheid en identiteit van legionellabacteriën, heterotrofe bacteriën en vrijlevende protozoa in het reine water en in de biofilms in het distributiesysteem bepaald. Dit onderzoek werd uitgevoerd in samenwerking met medewerkers van waterbedrijf Vitens N.V. De samenstelling van de begeleidingsgroep is hieronder weergegeven.

Samenstelling begeleidingsgroep "Vergelijking Amersfoortseweg-Spannenburg"

Deelnemer (alfabetisch)	Organisatie
Geo Bakker (voorzitter)	Vitens Watertechnologie
Simon Bakker	Vitens Watertechnologie
Jan Barten	Vitens Gelderland
Willem Bootsma	Vitens Overijssel
Jaap van Dalen	Vitens Friesland
Ir. John Groen	Vitens Friesland
Jan Holtermann	Vitens Gelderland
Paul Keijzer	Vitens Watertechnologie
Dr. ir. Dick van der Kooij	KWR Watercycle Research Institute
Ir. Wiel Senden (tot november 2007)	KWR Watercycle Research Institute

Bij KWR waren tevens de volgende personen betrokken bij het onderzoek naar de vergelijking Amersfoortseweg – Spannenburg:

- Ir. Bart Wullings (detectie en identificatie van legionellabacteriën);
- Ing. Leo Heijnen (detectie en identificatie van bacteriën)
- Ir. Rinske Valster (detectie en identificatie van vrijlevende protozoa)
- Carola Blokker, Ton Braat, Anke Brouwer, Meindert de Graaf, Anita Lugtenberg, Marijan Uytewaal-Aarts, Harm Veenendaal, Remko Voogt en Stefan Voost (planning, monsterneming en het uitvoeren van de microbiologische analyses)

Het onderzoek van de vrijlevende protozoa werd gesubsidieerd door Delft Cluster (projectnummer CT 06.10) en vormde een onderdeel van het promotie-onderzoek dat door ir. Rinske Valster (KWR en Wageningen Universiteit) werd uitgevoerd. Dit onderzoek werd begeleid door de WUR-begeleidingsgroep "Protozoa in drinkwater", bestaande uit dr. Johannes Hackstein (Radboud Universiteit, Nijmegen), dr. ir. Wim Hoogenboezem (Het Waterlaboratorium, Haarlem), dr. Hauke Smidt (Wageningen Universiteit and Research Centrum), ir. Bart Wullings (KWR) en dr. ir. Dick van der Kooij (KWR). In voorliggend rapport zijn de resultaten van het onderzoek vastgelegd. Dit onderzoek is tevens beschreven in de publicatie "Free-living protozoa in two unchlorinated drinking water supplies identified by phylogenetic analysis of 18S rRNA gene sequences"; Applied and Environmental Microbiology, jaargang 75: 4736-4746.

Samenvatting

Legionella pneumophila groeit in natuurlijke en door de mens gemaakte watersystemen uitsluitend in bepaalde vrijlevende protozoa die dienst doen als gastheer. Vrijlevende protozoa zijn eencellige eukaryotische dierlijke organismen, die zich voeden met (prooi)bacteriën, algen, andere protozoa en kleine deeltjes biomassa aanwezig in water, in biofilms en in sediment. Sommige vrijlevende protozoa bezitten ziekteverwekkende eigenschappen. Zo staan enkele soorten van de geslachten *Naegleria* en *Acanthamoeba* bekend als menspathogeen, maar ook als gastheer van *L. pneumophila*.

Informatie over het voorkomen van vrijlevende protozoa in het Nederlandse drinkwater is zeer beperkt en voornamelijk gebaseerd op uiterlijke kenmerken van deze organismen, verkregen met behulp van microscopisch onderzoek. Met behulp van moleculaire technieken zijn de gemeenschappen van protozoa geïdentificeerd in twee verschillende drinkwatertypen. Het drinkwater van productiebedrijf (pb) Amersfoortseweg heeft een zeer laag gehalte (ca. 0,3 mg koolstof/l) aan natuurlijk organisch materiaal (NOM) en het door pb Spannenburg afgeleverde water heeft een relatief hoog NOM-gehalte (ca. 8 mg koolstof/l). Onderzocht is welke typen vrijlevende protozoa aanwezig zijn in het reine water, in de biofilm in de distributiesystemen en in het gedistribueerde water van beide productiebedrijven. Hierbij is bepaald of gastheerprotozoa van *L. pneumophila* en/of pathogene protozoa aanwezig zijn. Verder is bepaald of er een relatie is tussen de watersamenstelling en de aanwezigheid van bepaalde protozoa.

Bij beide productiebedrijven zijn op verschillende data, verdeeld over een periode van een jaar, monsters genomen van het reine water. In het najaar zijn monsters genomen van de biofilm in beide distributiesystemen. Twee jaar later zijn in de zomer en in de herfst monsters van het gedistribueerde water genomen op dezelfde locaties als waar de biofilmmonsters zijn genomen. Met behulp van kwantitatieve PCR (Q-PCR) is bepaald of *Hartmannella vermiformis* en *Acanthamoeba*-soorten, twee beschreven gastheren van *L. pneumophila*, aanwezig zijn in de monsters. Om een indruk te krijgen van de eukaryotische diversiteit in het reine water en in de biofilms zijn fingerprints gemaakt van het DNA geïsoleerd uit de aanwezige eukaryotische organismen. Bovendien zijn de gemeenschappen van eukaryoten geïdentificeerd met behulp van sequentieanalyses van klonen verkregen uit het reine water van de beide productiebedrijven en uit de biofilm in de betreffende distributiesystemen. Bij de sequentieanalyse is een deel van het 18S rRNA-gen vergeleken met sequenties in een database.

In de reinwatermonsters en in de biofilmmonsters is een grote verscheidenheid aan eukaryoten aangetroffen en 46% van de klonen vertoonde de meeste overeenkomst met vrijlevende protozoa. Naast protozoa zijn in beide distributiesystemen ook schimmels, meercellige dierlijke organismen (metazoa), protophyta en meercellige planten aangetroffen. In het reine water van pb Amersfoortseweg zijn 25 onderling verschillende DNA-sequenties van protozoa aangetroffen en in het reine water van pb Spannenburg zijn 43 onderling verschillende DNA-sequenties van protozoa waargenomen. De diversiteit aan protozoa in het reine water van pb Amersfoortseweg lijkt dus kleiner dan in het reine water van pb Spannenburg.

Het onderzoek richtte zich op de dominante typen en daarom kan geen uitspraak worden gedaan over de diversiteit van de protozoa in de beide watertypen. De gemeenschappen van dominante protozoa in beide reinwatertypen verschilden onderling sterk.

De gemeenschappen van protozoa in het reine water verschilden bovendien van de gemeenschappen van protozoa in de biofilms in de distributiesystemen. Per productiebedrijf zijn 30 onderling verschillende DNA-sequenties van protozoa aangetroffen in de biofilms. De gemeenschappen van protozoa in de biofilms op verschillende locaties per distributiesysteem waren onderling verschillend. Dit betekent dat in ieder monster specifieke omstandigheden heersten, waardoor andere organismen domineren. Ondanks dat er één type reinwater door het distributiesysteem gepompt wordt, ontstaan verschillende biotopen, waar andere protozotypen domineerden. Ook de gemeenschappen van dominante protozoa in de biofilms per distributiesysteem verschilden onderling sterk.

Veel van de waargenomen soorten van protozoa zijn niet eerder beschreven waardoor identificatie lastig was. In de kloonbibliotheek van het reine water van pb Amersfoortseweg zijn meer DNA-sequenties van protozoa aangetroffen die clusteren met Euglenozoa-typen dan in het reine water van pb Spannenburg. In de kloonbibliotheek van het reine water van pb Spannenburg zijn meer DNA-sequenties aangetroffen die clusteren met Choanozoa-typen dan in de kloonbibliotheek van pb Amersfoortseweg. In beide watertypen domineerden DNA-sequenties die clusteren met Cercozoa-typen en in beide watertypen zijn DNA-sequenties aangetroffen met de meeste overeenkomst met soorten binnen het *Cercomonas*-geslacht. Maar geen van deze DNA-sequenties is aangetroffen in beide watertypen.

In de biofilms van pb Amersfoortseweg domineerden voornamelijk DNA-sequenties die clusteren met Cercozoa- en Choanozoa-typen. Ook in de biofilms van pb Spannenburg domineren Choanozoa-typen. Verder domineren in deze biofilms Ciliophora-typen. In beide distributiesystemen zijn DNA-sequenties aangetroffen die de meeste overeenkomst hebben met de Choanozoa-geslachten *Monosiga*, *Ichthyophonus*, *Diaphanoeca* en *Stephanoeca*. De DNA-sequenties in de biofilm van pb Amersfoortseweg zijn niet aangetroffen in de biofilms van pb Spannenburg.

Ongeveer 2% van de DNA-sequenties van de protozoa bij pb Amersfoortseweg en ongeveer 7% bij pb Spannenburg bleken verwant aan gastheerprotozoa van *L. pneumophila*. Deze protozoa vertoonden de meeste overeenkomst met de geslachten *Acanthamoeba*, *Echinamoeba* en *Hartmannella*. Ongeveer 2% van de geanalyseerde DNA-sequenties die clusteren met protozoa, vertoonden de meeste overeenkomst met *Acanthamoeba*-soorten, waarvan enkele ziekteverwekkende eigenschappen bezitten. *H. vermiformis* is aangetoond met de Q-PCR methode in het reine water en in de biofilm van beide productiebedrijven, maar is geen dominante protozo in deze monsters. In het gedistribueerde water van pb Spannenburg is *H. vermiformis* aangetroffen in concentraties variërend tussen 2 tot 815 cellen per liter. In de zomer (watertemperatuur 12-17°C), waren de concentraties van *H. vermiformis* hoger dan in de herfst (10-14°C). *Acanthamoeba*-soorten zijn alleen aangetroffen in het reine water en in de biofilm van pb Amersfoortseweg in lage concentraties. In het gedistribueerde water zijn *Acanthamoeba*-soorten niet aangetoond. De temperatuur van het onderzochte water was beneden 18,5°C, waardoor groei van *L. pneumophila* in gastheerprotozoa zeer waarschijnlijk niet optrad.

Met behulp van beschreven indicatororganismen (19 van de aangetroffen geslachten van protozoa), die kenmerkend zijn voor de saprobiegraad van water, werden beide watertypen, met een onderling sterk verschillend NOM-gehalte, ingedeeld in het mesosaprobie niveau, d.w.z. water met een gemiddeld gehalte organische stof. Op basis van deze aanpak zijn de twee watertypen dus niet van elkaar te onderscheiden. Wel kon onderscheid worden gemaakt op basis van de concentraties van *H. vermiformis* die met Q-PCR zijn gedetecteerd. *H. vermiformis* vormt echter een fractie van het totale aantal vrijlevende protozoa in het reine water en in de biofilm. Over de aantallen van de aangetroffen vrijlevende protozoa is met de toegepaste werkwijzen geen informatie verkregen. Ook is het niet mogelijk om een uitspraak te doen over de relatie tussen de watersamenstelling en de aanwezigheid van bepaalde soorten protozoa omdat nog onvoldoende bekend is over de eigenschappen van protozoa.

De verkregen collectie van DNA-sequenties van vrijlevende protozoa die zijn aangetroffen in de beide drinkwatertypen (en biofilms) vormt een basis voor verder onderzoek naar de identiteit en het gedrag van deze organismen, waaronder gastheerprotozoa van *L. pneumophila* en pathogene protozoa, in drinkwater en in warmtapwaterinstallaties met een temperatuur boven 25°C.

Verklarende woordenlijst

<i>18S rRNA-gen</i>	Erfelijk materiaal dat een belangrijke rol speelt bij de productie van eiwitten. Is aanwezig in iedere eukaryotische cel.
<i>Aantoonbaarheidsgrens</i>	In dit onderzoek de minimale concentratie (aantal) van het te detecteren organisme dat aanwezig moet zijn om het monster als positief te beoordelen
<i>Biofilm</i>	Organismen vastgehecht aan een oppervlak en omgeven door slijm en anorganische componenten
<i>Dendogram</i>	Structuur waarmee de overeenkomst tussen verschillende organismen wordt weergegeven
<i>Diversiteit</i>	Verscheidenheid aan soorten of genen in een ecosysteem
<i>DNA</i>	Desoxyribonucleïne zuur (acid); drager van erfelijke informatie
<i>Eukaryoot</i>	Organisme waarbij het genetische materiaal aanwezig is in een celkern
<i>Fylum</i>	Ook wel afdeling genaamd. Rangorde in de biologie, meerdere fyla vormen een rijk, b.v. het dierenrijk
<i>Gedistribueerd water</i>	Drinkwater afkomstig uit het distributiesysteem
<i>Gemeenschap van eukaryoten</i>	De verschillende soorten eukaryoten die samenleven in een ecosysteem
<i>Fingerprint</i>	Een (uniek) bandenpatroon op basis van de DNA-sequentie van een organisme of groep organismen (genetische 'vingerafdruk')
<i>Gen</i>	Een DNA-segment dat de informatie draagt voor een specifieke erfelijke eigenschap
<i>Genoom</i>	Al het erfelijke materiaal (DNA) in de kern van een eukaryoot
<i>Geslacht</i>	Rangorde in de biologie; verschillende soorten vallen samen in één geslacht
<i>Metazo</i>	Meercellig dierlijk organisme

<i>PCR</i>	Polymerase kettingreactie: techniek voor vermeerdering (amplificatie) van een DNA-fragment met een specifieke sequentie
<i>PCR-remming</i>	Belemmering of inhibitie van de vermeerdering (amplificatie) van een DNA-sequentie door stoffen uit het monster
<i>Productiebedrijf (pb)</i>	Locatie waar drinkwater wordt bereid uit ruw water door toepassing van behandelingsprocessen ('zuivering')
<i>Protozo</i>	Eencellige eukaryoot
<i>Primer</i>	Kort synthetisch DNA-molecuul, dat gebruikt wordt als startpunt van de vermeerdering van een specifieke DNA-sequentie
<i>OTU</i>	Operational Taxonomic Unit. In dit rapport vormen DNA-sequenties die onderling 99% of meer overeenkomen één OTU.
<i>Q-PCR</i>	Kwantitatieve PCR, waarmee informatie wordt verkregen over het aantal cellen of kopieën met een specifieke DNA-sequentie die door de betreffende PCR wordt gedetecteerd.
<i>T-RFLP</i>	Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism. Gelabelde PCR-producten worden geknipt, waardoor PCR-producten met verschillende lengtes ontstaan.
<i>Reinwater</i>	Drinkwater direct afkomstig van productiebedrijf na eventuele zuiveringsstappen
<i>Sequentie</i>	Nucleotide-volgorde van een DNA-molecuul
<i>Sequensen</i>	Het bepalen van de nucleotide-volgorde van een DNA-molecuul
<i>Soort</i>	Taxonomisch concept in de biologie waarmee een groep organismen wordt aangeduid die in een aantal belangrijke kenmerken op elkaar lijken. Bij geslachtelijke voortplanting krijgen organisme die tot de zelfde soort behoren vruchtbare nakomelingen.

Taxonomische indeling

Rang	Voorbeeld
Rijk	Protista
Fylum	Amoebozoa
Klasse	Lobosea
Orde	Euamoebida
Familie	Hartmannellidae
Geslacht	<i>Hartmannella</i>
Soort	<i>H. vermiformis</i>

Inhoud

Voorwoord	1
Samenvatting	3
Verklarende woordenlijst	7
Inhoud	11
1 Inleiding	15
1.1 Achtergrond onderzoek	15
1.2 Indeling en ecologie van protozoa die vrijleven in zoetwater	16
1.3 Genetische diversiteit van eukaryoten	18
1.4 Probleemstelling en doelen onderzoek	19
2 Opzet van het onderzoek	21
2.1 Selectie van drinkwatertypen	21
2.2 Beschrijving onderzoeksgebieden	21
2.3 Methoden	21
2.3.1 Opwerking monsters voor bepaling van de biomassa in het reine water en in de biofilm	21
2.3.2 Opwerking monsters voor moleculaire analyses	22
2.3.3 Kwantificering van <i>Hartmannella vermiformis</i> en <i>Acanthamoeba</i> -soorten met de kwantitatieve PCR methode	22
2.3.4 Bepaling eukaryotische diversiteit	23
2.3.5 Identificatie van de eukaryoten in het reine water en in de biofilm	23
3 Identificatie van protozoa in het reine water en in het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg	27
3.1 Doel en aanpak	27
3.2 <i>Hartmannella vermiformis</i> en <i>Acanthamoeba</i> -soorten in het reine water, in het gedistribueerde water en in de biofilm in het distributiesysteem	29
3.3 Herhaalbaarheid van fingerprint van T-RFLP-patronen	29
3.4 Eukaryotische diversiteit in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem	30
3.5 Protozoa in de kloonbibliotheken van het reine water en de biofilm in het distributiesysteem	33
4 Identificatie van protozoa in het reine water en in het distributiesysteem van pb Spannenburg	35
4.1 Doel en aanpak	35
4.2 <i>Hartmannella vermiformis</i> en <i>Acanthamoeba</i> -soorten in het reine water, in het gedistribueerde water en in de biofilm in het distributiesysteem	37
4.3 Eukaryotische diversiteit in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem	37

4.4	Protozoa in de kloombibliotheken van het reine water en van de biofilm in het distributiesysteem	40
5	Vergelijking van de twee drinkwatertypen m.b.t. aanwezigheid van protozoa	43
5.1	Samenstelling van gemeenschappen van eukaryoten in het reine water	43
5.2	Samenstelling van gemeenschappen van eukaryoten in de biofilms in het distributiesysteem	44
5.3	Samenstelling van gemeenschappen van protozoa in het reine water van de productiebedrijven	45
5.4	Samenstelling van gemeenschappen van protozoa in de biofilm in het distributiesysteem	46
6	Gastheerprotozoa van <i>Legionella pneumophila</i> en pathogene vrijlevende protozoa	49
6.1	Beschreven gastheerprotozoa en pathogene vrijlevende protozoa	49
6.2	Aangetroffen gastheerprotozoa	49
6.3	Pathogene vrijlevende protozoa	50
7	Schimmels, metazoa en planten	51
7.1	Schimmels	51
7.1.1	Chytridiomycota	51
7.1.2	Zygomycota	51
7.1.3	Ascomycota	52
7.1.4	Basidiomycota	52
7.2	Metazoa	52
7.2.1	OTU's	52
7.2.2	Sponzen	53
7.2.3	Neteldieren	53
7.2.4	Platwormen	53
7.2.5	Raderdieren	54
7.2.6	Buikharigen	55
7.2.7	Rondwormen	55
7.2.8	Ringwormen	55
7.2.9	Geleedpotigen	55
7.3	Protophyta en meercellige planten	56
8	Discussie	57
8.1	Universele eukaryotenprimerset	57
8.2	Identificatie van eukaryoten	57
8.3	Eukaryoten in het reine water en in de biofilm	59
8.4	Gastheerprotozoa van <i>Legionella pneumophila</i> en pathogene protozoa	60
8.5	Betekenis van de schimmels, metazoa en planten in het drinkwater	61
8.6	Relatie tussen de watersamenstelling en het voorkomen van protozoa in de beide drinkwatertypen	62
8.6.1	Relatie tussen de watersamenstelling en aantallen en aard van de aanwezige vrijlevende protozoa	62

8.6.2	Relatie tussen de watersamenstelling en het voorkomen van morfologische groepen van protozoa	63
8.6.3	Saprobie-index	64
9	Conclusies en aanbevelingen	67
9.1	Conclusies	67
9.2	Aanbevelingen voor verder onderzoek	68
10	Literatuur	71
Bijlagen		75
I	Chemische en fysische parameters van het ruwe en het reine water van pb Amersfoortseweg en pb Spannenburg	77
II	Identificatie van sequenties van Amoebozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem	79
III	Identificatie van sequenties van Cercozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem	81
IV	Identificatie van sequenties van Choanozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem	83
V	Identificatie van sequenties van Ciliophora in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem	85
VI	Identificatie van sequenties van Euglenozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem	87
VII	Identificatie van sequenties van Myzozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem	89
VIII	Identificatie van sequenties van Stramenopiles in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem	91
IX	Identificatie van schimmels in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem	93
X	Identificatie van metazoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem	95

1 Inleiding

1.1 Achtergrond onderzoek

De aanwezigheid en groei *Legionella pneumophila* in leidingwaterinstallaties vormt een potentiële bedreiging voor de volksgezondheid. *L. pneumophila* vermeerderd zich in bepaalde vrijlevende protozoa die dienst doen als gastheer. Deze vrijlevende protozoa zijn eencellige eukaryotische dierlijke organismen die zich voornamelijk voeden met bacteriën en kleine biomassa-deeltjes aanwezig in het drinkwater, in de biofilm en in het sediment in de leidingen. Tijdens het grazen kan de protozo ook *L. pneumophila* opnemen. *L. pneumophila* vermeerderd zich vervolgens in een vacuole in de protozo. Hierbij maakt deze bacterie gebruik van de voedingsstoffen in de biomassa van de protozo, die uiteindelijk gedood wordt. Per protozo komen 500 à 1000 cellen van *L. pneumophila* vrij (31). Geslachten van protozoa die bekend staan als gastheer van *Legionella pneumophila* zijn: *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria*, *Tetrahymena* en *Vahlkampfia* (18, 30, 36, 42, 43). *Dictyostelium*, een slijmzwam, kan ook dienst doen als gastheer van *L. pneumophila* (52). Een ander belangrijk aspect van de aanwezigheid van protozoa in drinkwater is dat sommige vrijlevende protozoa ziekteverwekkende eigenschappen bezitten (56). Zo kunnen enkele *Acanthamoeba*-soorten bij gebruik van contactlenzen infecties van het hoornvlies veroorzaken (35). *Acanthamoeba*-soorten (28), *Balamuthia mandrillaris* (59) en *Naegleria fowleri* (62) kunnen ontsteking aan het hersenvlies of de hersenen veroorzaken. De optimale groeitemperatuur voor *N. fowleri* is 37°C en bij een temperatuur tussen 20°C à 25°C is de groei zeer traag (24).

Informatie over het voorkomen van vrijlevende protozoa in het Nederlandse drinkwater is zeer beperkt. Onbekend is welke gastheren van *L. pneumophila* aanwezig zijn en of pathogene soorten aanwezig zijn. Onduidelijk is dus ook of, en zo ja welk, verband bestaat tussen de samenstelling van het drinkwater en de identiteit en de aantallen van de protozoa in leidingwaterinstallaties. Gebleken is dat het percentage van de leidingwaterinstallaties (collectieve systemen) waarin legionellabacteriën zijn aangetroffen, verschilt per voorzieningsgebied. Daarom zijn de gemeenschappen van protozoa in het reine water en in de biofilm in de distributiesystemen van twee verschillende productiebedrijven (pb) onderzocht, namelijk van pb Amersfoortseweg en van pb Spannenburg. Het door pb Amersfoortseweg afgeleverde drinkwater heeft een zeer laag gehalte aan organische stof (ca. 0,3 mg koolstof/l). Het door pb Spannenburg afgeleverde drinkwater heeft het hoogste gehalte organische stof (ca. 8 mg koolstof/l) in Nederland.

Dit onderzoek is onderdeel van het onderzoek naar de invloed van de watersamenstelling op de groei van legionellabacteriën in leidingwaterinstallaties. Het identificeren van de vrijlevende protozoa levert informatie op over het voorkomen en het gedrag van gastheren van legionellabacteriën in het Nederlandse drinkwater en deze kennis kan bijdragen aan het nemen van maatregelen gericht op het voorkómen of beperken van de groei van legionellabacteriën in leidingwaterinstallaties. Daarnaast is bepaald of de aangetroffen vrijlevende protozoa verwantschap vertonen met pathogene soorten.

1.2 Indeling en ecologie van protozoa die vrijleven in zoetwater

Protozoa, afgeleid van het Griekse: *prootos* is eerste, *zoo-on* is dier; "oerdiertjes", zijn eencellige eukaryotische micro-organismen. Eukaryoten zijn organismen met een membraan om het genetisch materiaal, ook wel kernmembraan genoemd. Dit in tegenstelling tot de prokaryoten (bacteriën en archaea) waarbij het genomisch DNA zich los in de cel bevindt. De naam eukaryoot is afgeleid van de Griekse woorden 'karyon' dat kern en 'eu' dat goed betekent. Tot de eukaryoten behoren de schimmels, de planten, de metazoa (meercellige dieren) en de protisten.

Protozoa behoren samen met de protophyta en de slijmzwammen tot de protisten. Protozoa hebben een lengte variërend tussen 5 en 1000 µm. Alle protozoa planten zich voort door celdeling waarbij een individu zich splitst in twee nieuwe individuen. De meeste protozoa kunnen zich ook geslachtelijk voortplanten; hierbij ontstaan geen embryo's. Veel protozoa komen vrij voor in het milieu, maar protozoa die tot de Sporozoa behoren leven parasitair. Protozoa zijn alom aanwezig in uiteenlopende aquatische milieus, zoals in rivieren, vijvers en drinkwatersystemen.

Natuurlijke gemeenschappen van protozoa zijn dynamisch en bestaan vaak uit veel verschillende soorten (39). Een gemeenschap van protozoa reageert snel op veranderingen in de leefomgeving. Zo kunnen protozoa, in een niet actieve overlevingsfase (cyste), zich beschermen tegen ongunstige milieuomstandigheden. Ondanks dat protozoa kleine organismen zijn, spelen ze een grote rol in een ecosysteem. Protozoa voeden zich met bacteriën, algen, andere protisten en kleine deeltjes biomassa uit het water en uit de biofilm. Hierdoor beïnvloeden de verschillende gemeenschappen van bacteriën en protozoa elkaar en het ecosysteem (12, 48, 49, 65). Protozoa worden vaak ingedeeld in amoeben, ciliaten, flagellaten en sporozoa op basis van hun manier van voortbewegen (38).

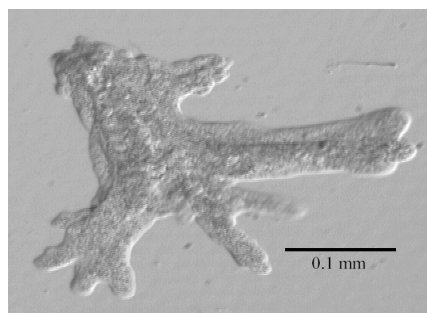


Fig 1.1 Amoebe
Bron: Biomedical sciences (1)

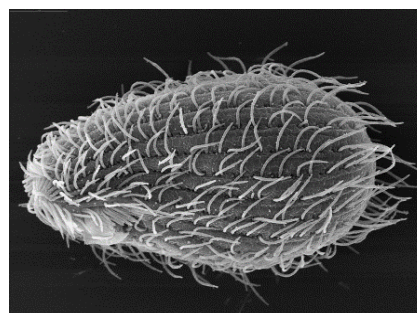


Fig 1.2 Ciliaat
Bron: Worldpress (8)

Amoeben

Amoeben hebben geen vaste vorm en hebben pseudopodia (schijnvoetjes) (Figuur 1.1). Met deze schijnvoetjes kunnen ze zich voortbewegen en voeden. De naam amoebe komt van het Griekse *amoibe*, dat verandering betekent en betrekking heeft op de steeds veranderende vorm van het diertje door het uitsteken van een schijnvoetje. Soorten van de geslachten *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria* en *Vahlkampfia* zijn amoeben die beschreven staan als gastheer van *L. pneumophila* (36, 42, 43).

Ciliaten

Ciliaten of wimperdieren worden zo genoemd omdat de cel bedekt is met cilia (trilharen) in tenminste één stadium van de levensloop (Figuur 1.2). Hiermee kan het organisme zich voortbewegen en/of voeden. Een veel beschreven ciliaat is het pantoffeldiertje. *Tetrahymena*-soorten zijn beschreven als gastheer van *L. pneumophila* (20, 30).

Flagellaten

Flagellaten of geseldieren zijn de kleinste protozoa en gebruiken zweepdraden (flagellen) om zich te verplaatsen (Figuur 1.3). Flagellaten die chlorofyl bezitten kunnen door middel van fotosynthese suiker maken. Geen van de flagellaten staat bekend als gastheer van *L. pneumophila*.

Sporozoa

Sporozoa worden ook wel sporendiertjes genoemd. Het zijn ingewikkelde eencellige eukaryoten die vooral parasitair leven (Figuur 1.4). Zo wordt malaria veroorzaakt door de sporozoa van het geslacht *Plasmodium*. Geen van de sporozoa staat bekend als gastheer van *L. pneumophila*. Sporozoa **behoren niet** tot de groep van de vrijlevende protozoa.



Fig 1.3 Flagellaat
Bron: *Universität in the Wilderness* (3)

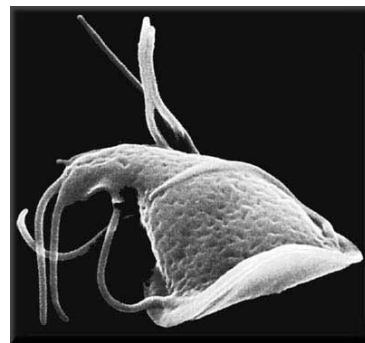


Fig 1.4 Sporozoa
Bron: *Giardia Stuttgart* (7)

Met behulp van moleculaire technieken wordt gewerkt aan een nieuwe indeling gebaseerd op genetische verwantschap. De huidige indeling van het protistenrijk is nog niet compleet en wordt steeds aangepast aan de nieuwste onderzoeksresultaten. Een uitgebreide indeling van het protistenrijk gebaseerd op moleculaire technieken bestaat momenteel uit 17 fyla (12). Hierin kunnen 13 fyla worden onderscheiden waartoe de protozoa behoren (Tabel 1.1) (2, 14, 23). Deze indeling zal gebruikt worden bij het beschrijven van vrijlevende protozoa in het reine water en in de biofilm in de distributiesystemen van pb Amersfoortseweg en pb Spannenburg. In dit onderzoek zullen de sporozoa verder buiten beschouwing gelaten worden, omdat dit geheel ander type organismen zijn dan de vrijlevende protozoa. In het vervolg zullen vrijlevende protozoa worden aangeduid met protozoa.

Tabel 1.1. Indeling van de vrijlevende protozoa in 13 fyyla op basis van moleculaire technieken

Fylum	Morfologische Groep(en)	Beschreven leefgebieden	Geslachten beschreven als gastheer van <i>L. pneumophila</i>
Amoebozoa	Amoeben	Soms vrij in het water en voornamelijk in de biofilm	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Balamuthia</i> , <i>Echinamoeba</i> en <i>Hartmannella</i>
Apusozoa	Flagellaten	Biofilm	-
Cercozoa	Amoeben en Flagellaten	Vrij in het water en in de biofilm	-
Choanozoa	Flagellaten	Vrij in het water en in de biofilm	-
Ciliophora	Ciliaten	Vrij in het water en in de biofilm	<i>Tetrahymena</i>
Euglenozoa	Flagellaten	Biofilm	-
Heliozoa	Amoeben	Vrij in het water en in de biofilm	-
Loukozoa	Flagellaten	Onbekend	-
Metamonada	Flagellaten	Biofilm	-
Myxozoa	Flagellaten en Sporozoa	Soms vrij in het water en voornamelijk in de biofilm	-
Percolozoa	Amoeben en Flagellaten	Biofilm	<i>Naegleria</i> , <i>Vahlkampfia</i>
Retaria	Onbekend	Onbekend	-
Stramenopiles	Flagellaten	Vrij in het water	-

1.3 Genetische diversiteit van eukaryoten

Moleculaire technieken zijn gebruikt om de samenstelling van de gemeenschap van protozoa in het reine water en in de biofilm in de distributiesystemen van pb Amersfoortseweg en pb Spannenburg te bepalen. Met deze moleculaire technieken kan een grotere verscheidenheid aan protozoa worden geïdentificeerd dan met de kweekmethode. Daarnaast vereist het kweken en het vervolgens identificeren van protozoa veel ervaring en tijd. Er zijn geen moleculaire technieken beschikbaar die de detectie en identificatie van alle protozosoorten mogelijk maken. Het is wel mogelijk om een groot deel van de gemeenschap van eukaryoten in één keer te detecteren en te identificeren. Daarom is in dit onderzoek de totale eukaryotische diversiteit onderzocht, waarbij de nadruk ligt op de diversiteit van protozoa. Specifieke aandacht is uitgegaan naar gastheerprotozoa van *L. pneumophila* en pathogene soorten. Voor het fylogenetisch onderzoek van de eukaryoten is het 18S rRNA-gen gebruikt. Verschillende aspecten van het 18S rRNA-gen maken dat dit gen uitermate geschikt is om als marker te dienen voor fylogenetisch onderzoek:

1. aanwezig in elke eukaryotische cel;
2. geconserveerde DNA-sequentie;
3. relatief eenvoudig om de DNA-sequentie te analyseren;
4. veel informatie in de 1900 basenparen.

Het 18S rRNA-gen speelt een belangrijke rol bij de productie van eiwitten in eukaryotische cellen. Veranderingen (mutaties) in de DNA-sequentie van dit gen hebben dan ook veelal direct invloed op het functioneren van de cel. De sequentieovereenkomst en/of verschillen tussen 18S rRNA-genen van verschillende organismen kunnen dan ook als maat dienen voor het bepalen van de genetische verwantschap.

Het is niet mogelijk om met deze techniek iets te zeggen over de aantallen en onderlinge verhoudingen waarin deze organismen voorkomen in het reine water en in de biofilm, omdat van dit gen in één cel meerdere kopieën aanwezig kunnen zijn. Zo is bekend dat in één cel van *Hartmannella vermiformis* ongeveer 1300 kopieën (31) aanwezig zijn en in *Acanthamoeba*-soorten ongeveer 600 kopieën (11). Door gebruik te maken van universele eukaryotische primers zullen ook meercellige eukaryoten gedetecteerd worden. De verhouding tussen het aantal meercellige organismen ten opzichte van het aantal eencellige eukaryoten komt dan in de kloonbibliotheken scheef te liggen. Als in een monster één meercellig organisme en één eencellig organisme aanwezig zijn, zal in de kloonbibliotheek het meercellige organismen domineren ten opzichte van het eencellige organisme.

1.4 Probleemstelling en doelen onderzoek

Informatie over de samenstelling van gemeenschappen van protozoa in het Nederlandse drinkwater is zeer beperkt. Ook is onbekend of er binnen deze gemeenschappen van protozoa gastheren van *L. pneumophila* en of pathogene soorten aanwezig zijn. Dit onderzoek richt zich op de samenstelling van gemeenschappen van protozoa in twee sterk verschillende drinkwatertypen bereid uit grondwater in Nederland. Hiermee komt meer informatie beschikbaar over de groeiomstandigheden van protozoa. Deze informatie kan worden gebruikt voor het definiëren van maatregelen gericht op het voorkómen van de groei van *L. pneumophila* in drinkwater en leidingwaterinstallaties. Daarnaast kunnen door klimaatsveranderingen nieuwe problemen ontstaan in de drinkwatervoorziening, waarbij kennis van de eukaryotische diversiteit in het drinkwater kan bijdragen aan oplossingen. De doelen van het onderzoek zijn:

- Detectie en identificatie van protozoa in het reine water en in de biofilm het distributiesysteem in relatie met de watersamenstelling (gehalte organische stof);
- Kwantitatieve detectie van *Hartmannella vermiformis* en *Acanthamoeba*-soorten in het reine water, in de biofilm in de distributiesystemen en in het gedistribueerde water bij beide productiebedrijven;
- Nagaan of, en zo ja, welke van de aanwezige protozoa verwant zijn aan protozoa waarvan bekend is dat ze kunnen dienen als gastheer van *L. pneumophila*;
- Nagaan of protozoa die aanwezig zijn in het reine water en in de biofilm verwant zijn aan pathogene soorten.

2 Opzet van het onderzoek

2.1 Selectie van drinkwatertypen

Tweederde van het drinkwater in Nederland wordt bereid uit grondwater. De samenstelling van het drinkwater bereid uit grondwater kan echter sterk verschillen per productiebedrijf (pb), onder meer voor het gehalte natuurlijke organisch materiaal (NOM). Bij de selectie is gekozen voor drinkwater bereid uit zuurstofhoudend grondwater met een laag NOM-gehalte en drinkwater bereid uit zuurstofloos grondwater met een hoog NOM-gehalte.

2.2 Beschrijving onderzoeksgebieden

Het door pb Amersfoortseweg afgeleverde reine water heeft een zeer laag gehalte aan organische stof, namelijk ca. 0,3 mg koolstof/l (Bijlage I)). Het door pb Spannenburg afgeleverde water heeft een NPOC-gehalte (ca. 8 mg koolstof/l) dat tot de hoogste van Nederland behoort. Dit verschil in NPOC-gehalte hangt samen met de herkomst van beide watertypen. Pb Amersfoortseweg te Apeldoorn wint aëroob grondwater uit zandgrond (Veluwe) en bij pb Spannenburg in Friesland wordt anaëroob grondwater uit een veenhoudende bodem gezuiverd tot drinkwater. Het ruwe water van pb Amersfoortseweg wordt belucht/ontgast en gefiltreerd over een marmerfilter, waardoor de pH van het water wordt verhoogd en het water wordt opgehard. Per jaar wordt $5,6 \times 10^6$ m³ drinkwater geproduceerd bij pb Amersfoortseweg. Het grondwater bij pb Spannenburg wordt gewonnen in Spannenburg en Oudega en ondergaat de volgende processen: plaatbeluchting, voorfiltratie, ontzuring, ontharding en na-filtratie. Pb Spannenburg produceert $2,5 \times 10^7$ m³ drinkwater per jaar. Het voorzieningsgebied van pb Amersfoortseweg omvat voornamelijk Apeldoorn; het voorzieningsgebied van pb Spannenburg omvat een groot deel van de provincie Friesland. Van pb Amersfoortseweg en pb Spannenburg zijn monsters genomen van het reine water, van het gedistribueerde water en van de biofilm in leidingsegmenten uit het distributiesysteem. Van deze monsters is het DNA geïsoleerd en met moleculaire technieken zijn de dominante protozoa geïdentificeerd

2.3 Methoden

2.3.1 *Opwerking monsters voor bepaling van de biomassa in het reine water en in de biofilm*

De reinwatermonsters zijn op vijf verschillende data in 2005 genomen en de leidingsegmenten zijn in het najaar bemonsterd. Twee jaar later zijn in de zomer en in de herfst monsters van het gedistribueerde water genomen op dezelfde locaties als waar de biofilmmonsters zijn genomen. Naast monsters van het gedistribueerde water zijn ook reinwatermonsters geanalyseerd. De monsters zijn vervoerd onder gekoelde condities en na opslag bij 4°C binnen 24 uur in behandeling genomen. Uit het distributiesysteem van beide voorzieningsgebieden zijn verschillende segmenten genomen. Van deze segmenten is de biomassa verzameld. Voor dit doel zijn oppervlakken van 10-25 cm² in behandeling genomen door driemaal met een steriele swab de biofilm te verwijderen. De biomassa is van de swab verwijderd door deze vier keer ultrasoon te trillen in 10 ml PBS-oplossing in een waterbad. De PBS-oplossing is

een fysiologische zoutoplossing en door toevoeging hiervan blijven de cellen intact tijdens de ultrasone behandeling. Per leidingsegment zijn meerdere vlakken in behandeling genomen, om zo voldoende materiaal te krijgen voor de verschillende analyses. De monsters afkomstig van hetzelfde leidingsegment zijn samengevoegd. Hiervan is het adenosinetrifosfaat-gehalte (ATP), representatief voor de actieve biomassa, bepaald. Ook van het reine water en het gedistribueerde water is het ATP-gehalte bepaald. De totale ATP-concentratie is bepaald met de commercieel beschikbare ATP-kit behorende bij de Celsis Advance™ (Celsis Internation B.V en Promega, Nederland). De uitvoering is gedaan volgens KWR-huisvoorschrift LMB-002 of LMB-055, afhankelijk van de totale ATP-concentraties in de monsters.

2.3.2 Opwerking monsters voor moleculaire analyses

De gemeenschappen van protozoa in de monsters van beide productiebedrijven zijn geïdentificeerd met behulp van moleculaire technieken. De cellen zijn geconcentreerd door 1,25 tot 3 liter van het reine water, 0,5 liter van het gedistribueerde water en 25 tot 30 ml van de biofilmmonsters te filtreren. Hierbij is gebruik gemaakt van een filter met een poriegrootte van 1,2 µm. Het filtreren vond plaats onder een maximaal vacuüm van 300 mbar. Door een laag vacuüm te gebruiken bleven de cellen intact. Vervolgens is het DNA uit de cellen geïsoleerd met de FastDNA® SPIN kit for Soil (BIO, 101, Carlsbad, Cal). De procedure was als volgt. Het filter met de cellen is overgebracht in een buisje met glaskorrels en een buffer. Dit buisje is vervolgens tweemaal een halve minuut geschud in een machine behorende bij de DNA-isolatie methode, waardoor de cellen kapot gingen en het DNA vrijkwam. Vervolgens is de vloeistof, inclusief het DNA, overgebracht in een nieuwe buffer dat de eiwitten precipiteert. De overgebleven vloeistof, inclusief het DNA, is toegevoegd aan een DNA-bindende buffer met glaswol. Hieraan bindt het DNA, waarna het DNA is opgehoopt en schoongespoeld. Daarna is het DNA geëluëerd in DNase-vrij water. Aan een aantal monsters is een bekende hoeveelheid *Hartmannella vermiformis* cellen (ATCC 50237) toegevoegd. Zo kon bepaald worden of de DNA-amplificatie geremd was en hoe de resultaten geïnterpreteerd moesten worden. De monsters met toegevoegde *H. vermiformis* cellen zijn op dezelfde wijze behandeld als de andere monsters. Op iedere monsterdag is een negatieve controle in behandeling genomen bestaand uit DNase-vrij water, dat tijdens de gehele DNA-isolatie op dezelfde wijze als de monsters is behandeld. Bij de opwerking van de biofilmmonsters is ook steriel leidingwater, waarin de swabs de ultrasone behandeling hebben gekregen, in behandeling genomen. Hiermee is gecontroleerd of er in dit water een "besmetting" van eukaryoten aanwezig was.

2.3.3 Kwantificering van *Hartmannella vermiformis* en *Acanthamoeba*-soorten met de kwantitatieve PCR methode

Met de kwantitatieve polymerase kettingreactie (Q-PCR) methode is het mogelijk om de DNA-amplificatie "on-line" te volgen door het meten van fluorescentie. Voor de kwantificatie van *H. vermiformis* (31) en *Acanthamoeba*-soorten (40) is het fluorescerende molecuul Sybr-Green gebruikt. Dit molecuul fluoresceert alleen na binding aan dubbelstrengs DNA. Bij de vorming van het PCR-product is een toename van de fluorescentie gemeten. Deze toename is vergeleken met fluorescentie-toename in PCR-reacties met een bekende hoeveelheid DNA van *H. vermiformis* en *Acanthamoeba*-soorten, de ijklijnen. Hiermee is de concentratie van beide typen organismen in het monster berekend. Voor de kwantificatie van *H. vermiformis* en *Acanthamoeba*-soorten zijn celiijklijnen gebruikt. Hierbij is DNA geïsoleerd van de getelde celsuspensies en verdund in stappen van tien.

De ijklijn voor de kwantificatie van *H. vermiformis* is gemaakt van een celsuspensie van *H. vermiformis* ATCC 50237 met een concentratie van $1,08 \times 10^5$ cellen/ml. Voor de kwantificatie van *Acanthamoeba*-soorten is een suspensie van $5,0 \times 10^4$ *A. castellanii* CCAP 1501 cellen/ml gebruikt om de ijklijn te maken.

Het DNA van deze suspensies is op een gelijke wijze geïsoleerd als van de monsters. Van de ijklijn voor *H. vermiformis* is een verdunningsreeks gemaakt die overeenkomt met $1,08 \times 10^4$ tot en met $1,08 \times 10^{-1}$ cellen per PCR-reactie. Van de suspensie van *A. castellanii* is een verdunningsreeks gemaakt die overeen komt met $5,0 \times 10^3$ tot en met $5,0 \times 10^{-2}$ cellen per PCR-reactie. Het is mogelijk om minder dan één cel te detecteren omdat er meerdere kopieën van het 18S rRNA-gen aanwezig zijn in één cel. De PCR-reactie is uitgevoerd met 18S rRNA-gen primers specifiek voor *H. vermiformis* (31) en *Acanthamoeba*-soorten (40). Van ieder monster is in duplo 10 µl DNA-template toegevoegd aan de reactiemix (50 µl). Ter controle op remming van de PCR-reactie is het monster ook 10 maal verdund.

2.3.4 Bepaling eukaryotische diversiteit

De eukaryotische diversiteit in de monsters is bepaald met de fingerprinttechniek Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) (13, 14). Hierbij zijn gelabelde PCR-producten van de gemeenschap van eukaryoten geknipt met een enzym, waarbij PCR-producten met verschillende lengtes ontstaan (54). De verschillende lengtes zijn van elkaar te onderscheiden en staan hoogstwaarschijnlijk voor verschillende eukaryotische groepen. Verschillende groepen kunnen in enkele gevallen een bandje geven op dezelfde plaats. Met deze techniek is het mogelijk om de gemeenschappen van eukaryoten in de verschillende monsters te vergelijken en is een beeld gekregen van de eukaryotische diversiteit. Deze T-RFLP-techniek is beschreven in informatiebox 1.

2.3.5 Identificatie van de eukaryoten in het reine water en in de biofilm

De genetische verscheidenheid en identiteit van protozoa in beide voorzieningsgebieden is bepaald door het kloneren en het bepalen van de sequentievolvergader van fragmenten van het 18S rRNA-gen (54). Het PCR-product is een mengsel van DNA-fragmenten die zijn vermenigvuldigd uit het oorspronkelijke eukaryotisch DNA. Voor identificatie van de aanwezige eukaryotensequenties is het noodzakelijk de DNA-volgorde van elk PCR-fragment afzonderlijk te bepalen. De isolatie van één DNA-fragment uit de pool van DNA-fragmenten is uitgevoerd door middel van kloneren, een recombinanttechniek (Zie informatiebox 2).

De verkregen sequenties (550 bp van het 1900 bp lange 18S rRNA-gen) zijn eerst vergeleken met sequenties in de NCBI-database om te bepalen welke organismen aanwezig zijn in de monsters (5). Vervolgens zijn de DNA-sequenties ingedeeld in Operational Taxonomic Units (OTU's). Iedere OTU bevat DNA-sequenties die onderling tenminste 99% overeenkomen. Sequenties die binnen één OTU vallen, worden beschouwd als identiek en het aantal OTU's per monster geeft een indicatie van de eukaryotische diversiteit. Één procent verschil tussen DNA-sequenties kan zijn ontstaan tijdens de amplificatie of bij de sequentieanalyse. Het aantal OTU's per monster is bepaald met het programma Dotur (45). Daarnaast zijn met dit programma Rarefaction curves berekend. Hierbij is het aantal geanalyseerde klonen uitgezet tegen het aantal verschillende OTU's in één monster. De curve stijgt eerst, maar uiteindelijk zal een horizontale lijn ontstaan. Een horizontale lijn duidt er op dat nog meer klonen geen extra informatie geven en de optimale monstergrootte bereikt is.

Met deze Rarefaction curves is bepaald of er genoeg klonen geanalyseerd zijn om een goed beeld te krijgen van de eukaryotische diversiteit in ieder monster. Naast een Rarefaction curve is de Coverage-index van ieder monster of een deel van een monster bepaald (23). Deze index geeft net zoals een Rarefaction curve de verhouding weer tussen het aantal geanalyseerde klonen en het aantal verschillende OTU's. De Coverage index geeft waarden tussen 0 en 100% en hoe hoger het getal hoe meer OTU's uit het monster zijn aangetroffen in de kloonbibliotheek. De Coverage-index is als volgt berekend: $Coverage\ index = (1 - n/N) \times 100$ (n = aantal OTU's en N = totaal aantal klonen).

Van iedere OTU is één sequentie toegevoegd aan de boom in de ARB-database waarin 26.000 sequenties van eukaryoten staan (41). Tijdens het toevoegen van de sequenties is een eukaryotenfilter gebruikt waardoor de karakteristieke stukken van een sequentie zijn gebruikt. Hiermee is bepaald met welke groep van organismen de OTU clustert. Delen van deze boom zijn gebruikt om de verwantschap met beschreven gastheren van *L. pneumophila* en pathogene soorten te tonen. Ook zijn de DNA-sequenties vergeleken met relevante gehele 18S rRNA-gen sequenties in de ARB-database. Deze identificatietechniek is beschreven in informatiebox 2.

Informatiebox 1: Fingerprinttechniek van de gemeenschap van eukaryoten

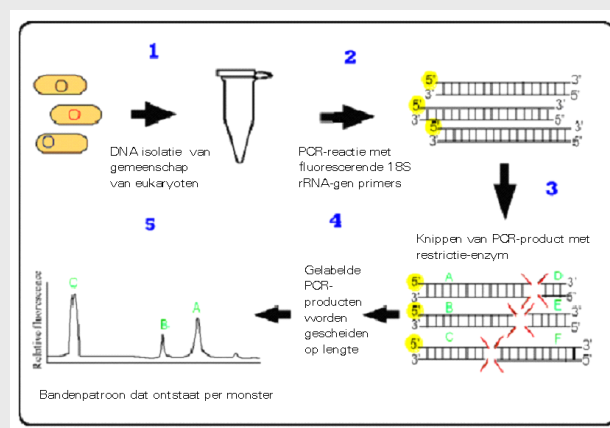
Een PCR wordt uitgevoerd met universele 18S rRNA-gen primers, waarmee een DNA-fragment vermenigvuldigd wordt dat aanwezig is in bijna de gehele gemeenschap van eukaryoten. Bij deze PCR is één van de twee primers fluorescerend gelabeld. Hierdoor wordt één kant van de PCR-fragmenten fluorescerend gelabeld. Vervolgens wordt het mengsel van PCR-fragmenten geknipt met een restrictie-enzym. Dit enzym veroorzaakt een breuk op verschillende plaatsen in de PCR-fragmenten afhankelijk van de DNA-sequentie. Het restrictie-enzym gebruikt in dit onderzoek is *HhaI*. Dit enzym herkent de sequentie GCGC. Deze sequentie komt vaak voor op het 18S rRNA-gen. Van de DNA-stukjes wordt het fragment dat de fluorescente groep bevat zichtbaar gemaakt d.m.v. een automatische sequencer. De plaats van de herkenningssequentie van het restrictie-enzym is afhankelijk van de DNA-sequentie van het PCR-fragment. De PCR-fragmenten zijn afkomstig van verschillende typen eukaryoten en zullen verschillende lengtes hebben. De fragmenten worden door de automatische sequencer gescheiden op basis van lengte en de fluorescerende fragmenten worden zichtbaar gemaakt als een piekenpatroon. Met deze techniek is het mogelijk om snel verschillen tussen gemeenschappen van eukaryoten zichtbaar te maken op basis van dominante typen.

De analyse bestaat per monster uit de volgende stappen:

1. DNA isoleren met de FastDNA® spin kit for Soil.
2. Uitvoeren van een PCR-reactie met universele 18S rRNA-gen primers; één van de primers is fluorescerend gelabeld, waardoor een deel van het PCR-product ook fluorescerend gelabeld zal zijn. Na de PCR-reactie wordt het PCR-product gezuiverd en wordt de PCR-mix verwijderd.
3. Het gezuiverde PCR-product wordt geknipt met het restrictie-enzym *HhaI*. Dit enzym herkent de sequentie $GCG\downarrow C$
 $C\uparrow GCG$

en knipt het DNA op de plaats van de pijlen. Er ontstaan gelabelde PCR-fragmenten van verschillende lengtes. Na de digestie met het restrictie-enzym wordt het DNA gezuiverd.

4. De fragmenten worden door de automatische sequencer gescheiden op basis van lengte, de fluorescerende fragmenten worden zichtbaar gemaakt als een piekenpatroon.
5. Iedere DNA-fragment met een andere lengte zal gezien worden als een nieuw bandje of piek. Het banden/piekenpatroon van het monster kan onderling met het patroon van andere monsters worden vergeleken waarbij een dendrogram gemaakt kan worden.



Bron: Improved Protocol for T-RFLP by Capillary Electrophoresis (4)

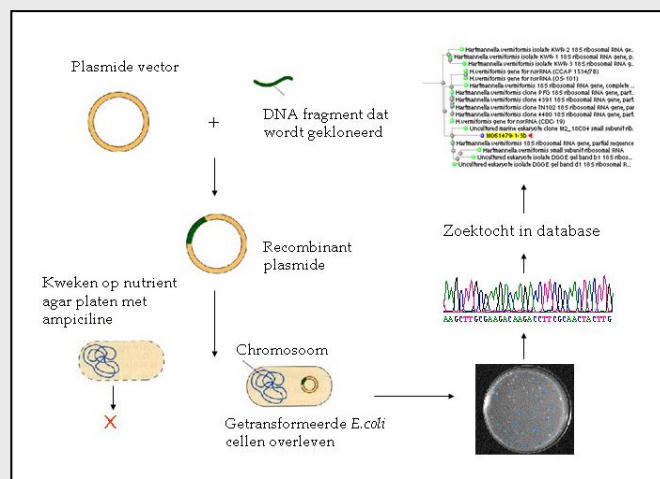
Informatiebox 2: Identificatietechniek van de gemeenschap van eukaryoten

De isolatie van één 18S rRNA gen-fragment uit de pool van DNA-fragmenten is uitgevoerd door middel van kloneren, een recombinantentechniek. Het PCR-product wordt toegevoegd aan een suspensie van opengeknijpte plasmiden. Plasmiden zijn korte circulaire DNA-moleculen die als extra DNA voorkomen in bacteriën. Bacteriën zijn in staat deze plasmiden onderling uit te wisselen. Ieder DNA-fragment afzonderlijk kan ligeren (aan elkaar binden tot een DNA-streng) aan één opengeknijpt plasmide, zodat iedere plasmide één DNA-fragment bevat.

Vervolgens wordt elke recombinante plasmide naar een speciaal voor dit doel ontwikkelde *E.coli* cel getransformeerd. Met behulp van antibiotica is het mogelijk deze recombinante *E.coli* cellen met een 'vreemd' 18S rRNA-fragment selectief te laten groeien op agarmedium. Elke *E.coli* kolonie bestaat uit klonen van bacteriën die allemaal dit ene identieke DNA-fragment bevatten uit de pool van oorspronkelijk vele genetisch verschillende fragmenten. Van een aantal van de klonen is vervolgens de basenpaarvolgorde van de DNA-sequentie bepaald. Door deze DNA-sequenties te vergelijken met bekende DNA-sequenties is de identiteit van het oorspronkelijk uit het monster afkomstige organisme te bepalen. Door klonen afkomstig van verschillende monsters te analyseren wordt informatie verkregen over de genetische identiteit en diversiteit van de gemeenschap van eukaryoten.

De analyse bestaat per monster uit de volgende stappen:

1. DNA isoleren met de FastDNA® spin kit for Soil.
2. Uitvoeren van een PCR-reactie met universele 18S rRNA-gen primers.
3. Ligeren van PCR-fragmenten in plasmidevectoren.
4. Transformeren van het recombinante plasmide in een *E.coli* gastheer.
5. Uitspatelen en laten groeien van de genetisch gemodificeerde *E.coli* op selectief medium.
6. Elke individuele kolonie analyseren op de aanwezigheid van een extra DNA-fragment met behulp van PCR.
7. In het geval een extra DNA-fragment aanwezig is, het plasmide opsturen naar een gespecialiseerd bedrijf voor het bepalen van de DNA-sequentie.
8. Controleren van de nucleotide-volgorde en verwijderen van de primersequenties.
9. De sequenties toevoegen aan een database en vergelijken met de eerder beschreven sequenties.
10. Berekenen van een dendrogram op basis van de verschillende DNA-sequenties.
11. Identificatie van het DNA-fragment op basis van de dendrogram.



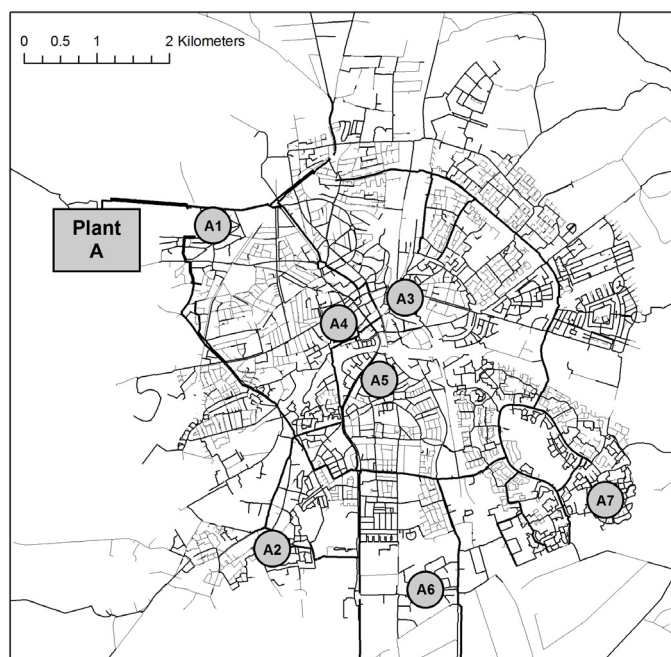
Bron: Molecular cell biologie (32)

3 Identificatie van protozoa in het reine water en in het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg

3.1 Doel en aanpak

Bij pb Amersfoortseweg wordt drinkwater bereid uit zuurstofhoudend grondwater met een laag NOM-gehalte. Het onderzoek heeft tot doel om te bepalen welke protozoa voorkomen in het reine water, in de biofilm in het distributiesysteem en in het water uit het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg. Hierbij kunnen de volgende subdoelen worden onderscheiden:

- Bepalen van de concentraties van *Hartmannella vermiformis* en *Acanthamoeba*-soorten in het reine water, in de biofilm in het distributiesysteem en in het gedistribueerde water van pb Amersfoortseweg;
- Bepalen van de stabiliteit van de gemeenschap van eukaryoten in het reine water van pb Amersfoortseweg op verschillende data in één jaar;
- Vergelijken van de eukaryotische diversiteit in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg;
- Detectie en identificatie van protozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg;
- Identificatie van mogelijke gastheerprotozoa van *Legionella pneumophila* en pathogene protozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg.



Figuur 3.1. Monsterlocaties van leidingsegmenten en het gedistribueerde water in het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg

Op zeven verschillende data zijn reinwatermonsters genomen van pb Amersfoortseweg (Tabel 3.1) (Zie bijlage I voor de chemische en fysische parameters

van het ruwe en reine water). De reinwatermonsters afkomstig van pb Amersfoortseweg worden aangeduid met RW-A1 t/m RW-A7. Voor de bepaling van de eukaryotische diversiteit en de identificatie van de protozoa is 1,25 tot 3 liter water in behandeling genomen. In het najaar van 2005 zijn uit het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg leidingsegmenten genomen (Figuur 3.1 en Tabel 3.2). De leidingsegmenten van pb Amersfoortseweg zijn afkomstig uit Apeldoorn. De monsters van de biofilm van de leidingsegmenten uit het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg worden aangeduid met BF-A1 t/m BF-A7. Op dezelfde locaties als waar de biofilmmonsters zijn genomen, zijn in de zomer en in het najaar van 2007 monsters van gedistribueerde water genomen. Deze monsters zijn aangeduid met DW-A1 t/m DW-A7 (Tabel 3.3).

Tabel 3.1: Beschrijving van de reinwatermonsters van pb Amersfoortseweg

Reinwater	Productiebedrijf	Datum	T (°C)	ATP (ng/l)
RW-A1	Amersfoortseweg	24-02-05	11,0	1,1
RW-A2	Amersfoortseweg	28-04-05	10,3	< 1
RW-A3	Amersfoortseweg	14-08-05	10,4	0,5
RW-A4	Amersfoortseweg	19-09-05	12,4	0,3
RW-A5	Amersfoortseweg	12-10-05	10,1	0,3
RW-A6	Amersfoortseweg	31-07-07	10,1	< 1
RW-A7	Amersfoortseweg	14-11-07	9,9	< 1

Tabel 3.2: Beschrijving biofilmmonsters uit het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg

Biofilm	Plaats	Straat	Datum	T (°C)	ATP (pg/cm ²)
BF-A1	Apeldoorn	Dennenlaan	29-09-05	15-18,5	133,0
BF-A2	Apeldoorn	Kruisvoorde	29-09-05	15-18,5	74,5
BF-A3	Apeldoorn	Zuiderlaan	29-09-05	16,6	311,3
BF-A4	Apeldoorn	Mathilde Wibastraat	29-09-05	15-18,5	63,2
BF-A5	Apeldoorn	1e Johannastraat	6-10-05	12,5-15,5	78,5
BF-A6	Apeldoorn	Malkenschoten	6-10-05	12,5-15,5	131,3
BF-A7	Apeldoorn	Bakershoeve	6-10-05	12,5-15,5	72,0

Tabel 3.3: Beschrijving het gedistribueerde water van pb Amersfoortseweg

Gedistribueerd water	Plaats	Straat	T (°C)		ATP (ng/l)	
			12-7-07	14-11-07	12-7-07	14-11-07
DW-A1	Apeldoorn	Dennenlaan	13,6	10,5	< 1	0,42
DW-A2	Apeldoorn	Kruisvoorde	16,1	10,5	< 1	0,26
DW-A3	Apeldoorn	Zuiderlaan	16,8	11,5	< 1	0,4
DW-A4	Apeldoorn	M. Wibastraat	17,3	11,5	1,7	1,18
DW-A5	Apeldoorn	1e Johannastraat	13,8	11,5	< 1	0,37
DW-A6	Apeldoorn	Malkenschoten	14,5	11,5	1,3	5,22
DW-A7	Apeldoorn	Bakershoeve	16,1	11,5	< 1	0,31

Voor de bepaling van de eukaryotische diversiteit en identificatie van de gemeenschap van protozoa is 10-25 cm² biofilm in behandeling genomen. Van alle monsters zijn de concentraties van *H. vermiformis* en *Acanthamoeba*-soorten bepaald met de Q-PCR methode. Daarnaast is van de reinwater- en biofilmmonsters een fingerprint gemaakt van de gemeenschap van eukaryoten met behulp van de T-RFLP-methode. Van de monsters RW-A1, BF-A1, BF-A4 en BF-7A zijn ook kloonbibliotheken gemaakt om de

dominante protozoa in het reine water en in de biofilm te identificeren. De biofilmmonsters zijn uitgekozen op basis van ATP-concentraties en de afstand die het reine water moet afleggen vanaf het productiebedrijf tot de monsterplaats in het distributiesysteem.

3.2 Hartmannella vermiformis en Acanthamoeba-soorten in het reine water, in het gedistribueerde water en in de biofilm in het distributiesysteem

In twee van de vijf reinwatermonsters uit 2005 is *H. vermiformis* gedetecteerd met de Q-PCR-methode; RW-A3 bevatte een concentratie van 0,9 cellen/l en RW-A5 een concentratie van 0,5 cellen/l. In geen van de monsters van het gedistribueerde water en in geen van de biofilmmonsters uit het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg is *H. vermiformis* aangetoond. In de reinwatermonsters tegelijk genomen met de monsters van het gedistribueerde water is *H. vermiformis* aangetroffen in concentraties van 14 cellen/l in juli en 29 cellen/l in november. In geen van de negatieve controles is DNA van *H. vermiformis* aangetoond, met uitzondering van de negatieve controle bij het monster RW-A1. Het is daarom niet mogelijk om van RW-A1 de concentratie van *H. vermiformis* te bepalen.

Acanthamoeba-soorten zijn in twee van de éénentwintig monsters gedetecteerd met de Q-PCR. De concentratie van *Acanthamoeba*-soorten in RW-A1 is 2,8 cellen/l en in BF-A4 1,5 cellen/10 cm². In geen van de negatieve controles is DNA van *Acanthamoeba*-soorten aangetroffen. In geen van deze monsters is remming van de PCR-reacties waargenomen.

3.3 Herhaalbaarheid van fingerprint van T-RFLP-patronen

Van alle reinwatermonsters en biofilmmonsters is een T-RFLP-patroon gemaakt om een indruk te krijgen van de eukaryotische diversiteit en om te bepalen of de gemeenschappen van eukaryoten per monster verschillen. De monsters zijn op verschillende data in behandeling genomen. De herhaalbaarheid van de fingerprintmethode is bepaald om vast te stellen of de monsters geanalyseerd op verschillende data vergeleken kunnen worden.

De herhaalbaarheid van de T-RFLP-methode is op twee wijzen bepaald:

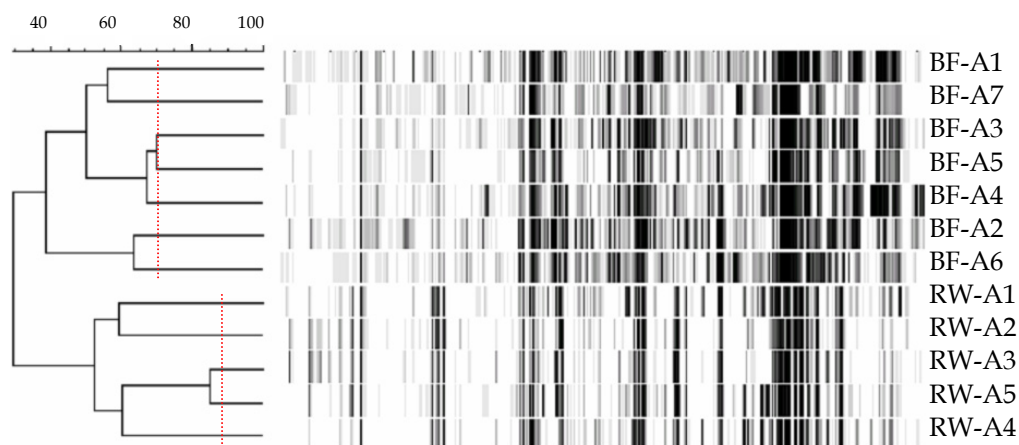
- Het monster is in tweevoud (duplo) opgewerkt en op één dag geanalyseerd met de T-RFLP-methode. Van twee reinwatermonsters en van alle zeven biofilmmonsters is DNA in duplo geïsoleerd en de T-RFLP-analyse van de duplo's is op dezelfde datum uitgevoerd. Hieruit blijkt dat de duplo's van het reine water tussen 90 en 97% overeenkomen. De duplo's van de biofilmmonsters komen voor 75 tot 93% overeen.
- DNA is in duplo geïsoleerd van twee reinwatermonsters. Van de duplo's is op twee verschillende dagen een T-RFLP-analyse uitgevoerd, om na te gaan of de methode ook herhaalbaar is op verschillende data. Hieruit blijkt dat de T-RFLP-fingerprints van de reinwatermonsters uitgevoerd op twee verschillende data tussen 88 en 89% overeenkomen. Van de biofilmmonsters zijn deze gegevens niet beschikbaar omdat de T-RFLP-analyse van deze monsters op één datum is uitgevoerd.

Alle reinwatermonsters van pb Amersfoortseweg zijn op dezelfde datum geanalyseerd met de T-RFLP-methode; dit geldt ook voor alle biofilmmonsters van pb Amersfoortseweg. Dus als de reinwatermonsters voor 90% of meer overeenkomen

worden de fingerprints als niet verschillend beschouwd. Bij de biofilmmonsters ligt dit percentage lager, namelijk bij minimaal 75% overeenkomst worden de monsters als niet verschillend beschouwd. Van de biofilmmonsters is van een kleiner volume DNA geïsoleerd dan van de reinwatermonsters. Door een kleiner volume te analyseren, kan de steekproef minder representatief zijn, waardoor een lager percentage van overeenkomst wordt aangetroffen.

3.4 Eukaryotische diversiteit in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem

In het reine water en in alle biofilms is een grote eukaryotische diversiteit aanwezig (Figuur 3.2). Iedere band in Figuur 3.2 staat waarschijnlijk voor een andere groep organismen. De fingerprints van het reine water clusteren samen en de fingerprints van de biofilmmonsters clusteren samen. Dit laat zien dat de gemeenschap van eukaryoten in het reine water verschilt van de gemeenschap van eukaryoten in de biofilm. Op de verschillende monsterdata vertonen de gemeenschappen van eukaryoten in het reine water een minimale overeenkomst van 53%. De samenstelling van de gemeenschap van de eukaryoten van alle vijf de reinwatermonsters varieert per monsterdatum. De gemeenschappen van eukaryoten in de biofilmmonsters vertonen een overeenkomst van minimaal 39%. Op verschillende plaatsen in het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg domineren verschillende typen eukaryoten in de biofilm.



Figuur 3.2. T-RFLP-patronen van de gemeenschappen van eukaryoten voorkomend in het reine water en in de biofilm van pb Amersfoortseweg. Gestippelde verticale lijnen geven de minimale overeenkomst tussen de monsters waarbij de monsters als niet verschillend worden beschouwd. Reinwatermonsters: RW-A1 t/m RW-A5, biofilmmonsters: BF-A1 t/m BF-A7.

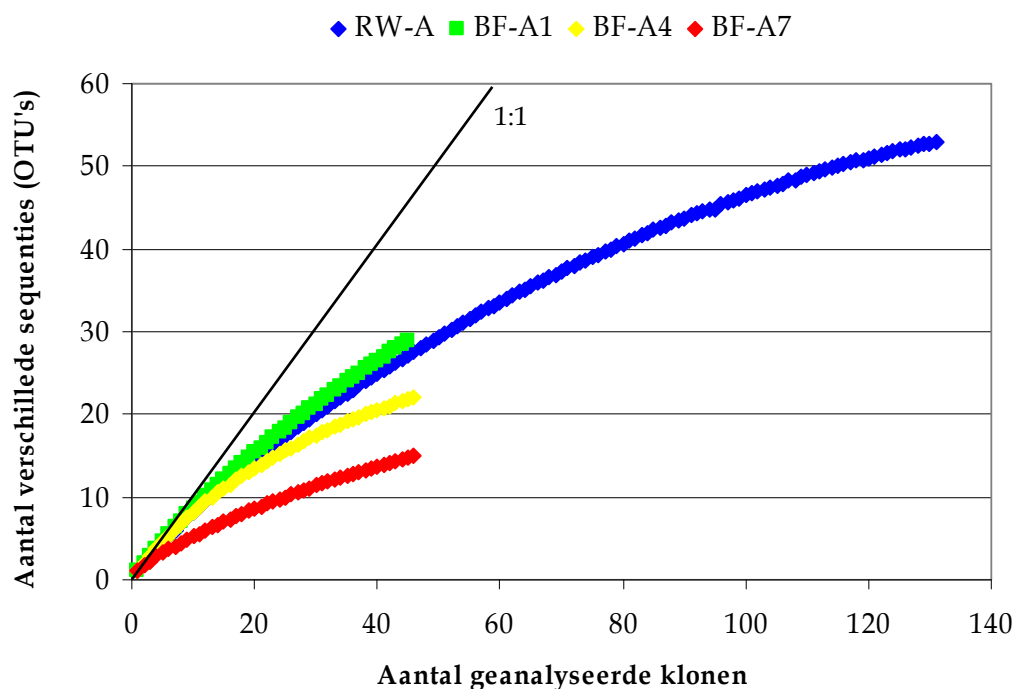
De eukaryotische diversiteit van één reinwatermonster en drie biofilmmonsters van pb Amersfoortseweg is in detail geanalyseerd door kloonbibliotheken te maken. Van 1,5 liter reinwater is DNA geïsoleerd en hiervan is 1/20 deel geanalyseerd met een kloonbibliotheek. Van 10-25 cm² biofilm uit de leidingsegmenten is DNA geïsoleerd, hiervan is 1/15 deel geanalyseerd met een kloonbibliotheek. De klonen zijn per monster verdeeld in Operational Taxonomic Units (OTU's) op basis van 99% overeenkomst (Tabel 3.4). In totaal zijn in het reine water en in de biofilm van pb Amersfoortseweg 108 onderling verschillende OTU's aangetroffen.

Tabel 3.4. OTU's per kloonbibliotheek van het reine water en in de biofilm van pb Amersfoortseweg

Monstertype	Code	Aantal geanalyseerde klonen	Aantal OTU's	Aantal OTU's die clusteren met een protozo
Reinwater	RW-A1	136	52	25
Biofilm	BF-A1	45	29	16
	BF-A4	46	21	13
	BF-A7	46	16	6
	BF-Totaal	137	56*	30*
Totaal	-	273	108*	54*

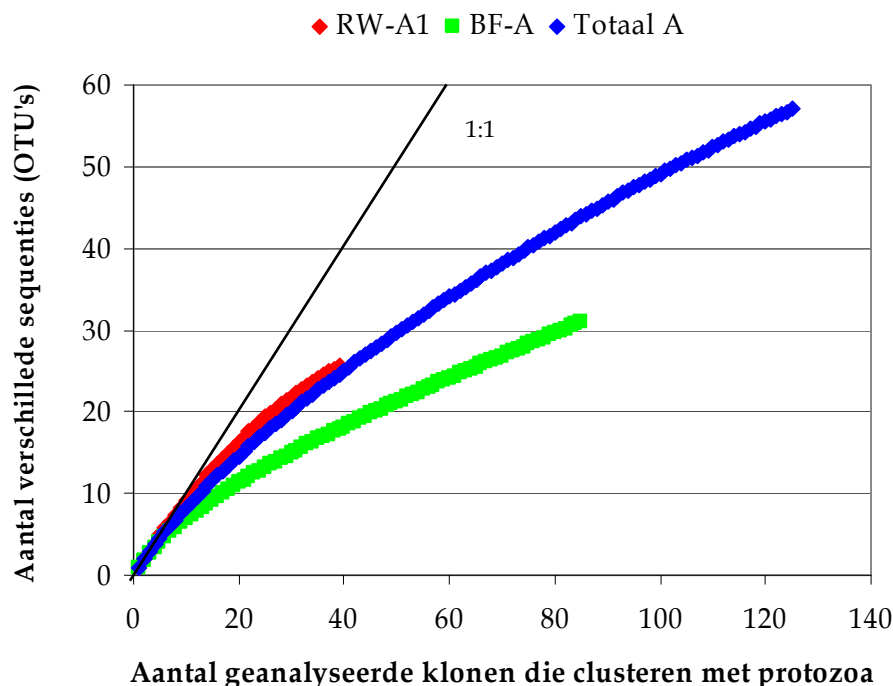
* Alleen onderling verschillende OTU's

Bij een Rarefaction curve wordt het aantal OTU's uitgezet tegen het aantal geanalyseerde klonen. Het verloop van de curve laat een toename zien van het aantal geanalyseerde OTU's ten opzichte van een toename van het aantal geanalyseerde klonen. Door de grafiek te extrapoleren kan worden voorspeld of het aantal geanalyseerde klonen een volledig beeld geeft van de aanwezige eukaryotensequenties.



Figuur 3.3. Rarefactioncurves van de kloonbibliotheek van de eukaryoten in het reine water en in de biofilms in het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg. Het aantal geanalyseerde klonen is uitgezet tegen het aantal OTU's per monster.

Bij deze Rarefactionbepaling is onderscheid gemaakt tussen alle verkregen sequenties (Figuur 3.3) en de sequenties met de meeste overeenkomst met een protozo (Figuur 3.4). De lijnen lopen nog niet horizontaal bij het aantal geanalyseerde klonen. De dominante OTU's zijn geanalyseerd (doel onderzoek), maar om alle OTU's in elk monster te identificeren zijn meer klonen nodig.



Figuur 3.4 Rarefactioncurves van de kloombibliotheken van de protozoa in het reine water en in de biofilms in het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg. Het aantal geanalyseerde klonen die clusteren met protozoa is uitgezet tegen het aantal OTU's per monster.

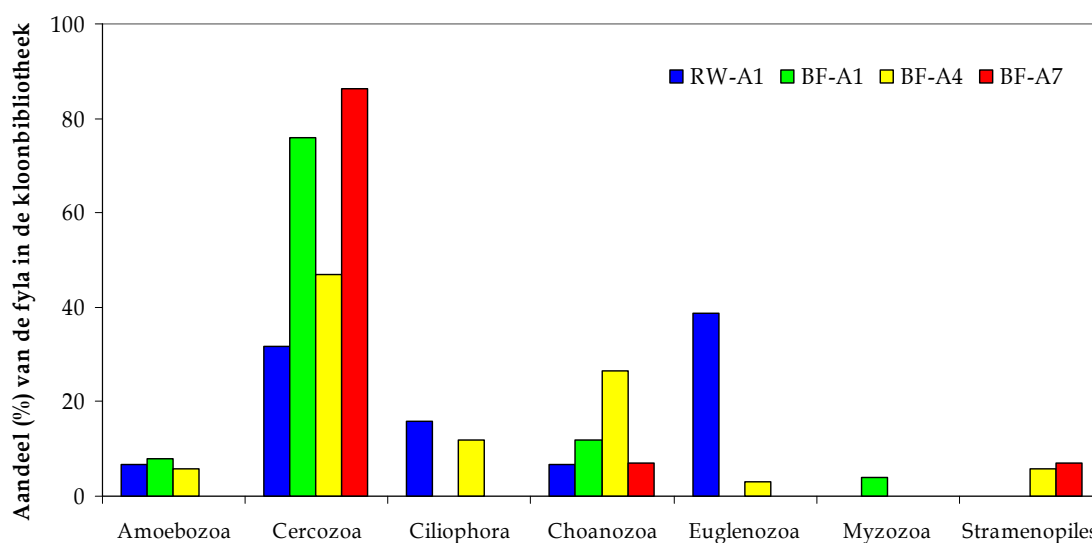
In de kloombibliotheken van het reine water en van de biofilm van pb Amersfoortseweg zijn sequenties aangetroffen die verwant zijn aan protozoa. In de kloombibliotheek van het reine water heeft 33% van de klonen de meeste overeenkomst met protozoa en in de biofilm heeft minimaal 55% van de sequenties de meeste overeenkomst met protozoa (Tabel 3.5). In de kloombibliotheken van het reine water en van de biofilm zijn ook sequenties aangetroffen die de meeste overeenkomst hebben met schimmels of metazoa. In drie van de vier kloombibliotheken worden ook sequenties aangetroffen die meest overeenkomen met protophyta en planten. Metazoa, planten en veel schimmels, bestaan uit meerdere cellen, afhankelijk van de soort en de levensfase. Hierdoor kan de verhouding tussen meercellige organismen t.o.v. protozoa in het oorspronkelijke monster niet worden bepaald. De metazoa, protophyta, planten en schimmels zullen nader worden toegelicht in hoofdstuk 7. Ongeveer 20% van de sequenties van pb Amersfoortseweg heeft een overeenkomst lager dan 75% met beschreven soorten en is niet te identificeren. Deze sequenties zijn aangeduid met onbekend.

Tabel 3.5. Samenstelling van de kloombibliotheken van eukaryoten in het reine water en in de biofilms van pb Amersfoortseweg

Groep	RW-A1 (%)	BF-A1 (%)	BF-A4 (%)	BF-A7 (%)	Totaal (%)
Protozoa	33,3	56,5	74,0	63,0	49,1
Schimmels	8,9	19,6	17,4	23,9	14,7
Metazoa	24,4	6,5	4,3	2,2	14,3
Protophyta en planten	5,8	2,2	0,0	2,2	2,9
Onbekend	28,9	15,2	4,3	8,7	19,0
Totaal	100	100	100	100	100

3.5 Protozoa in de kloonbibliotheken van het reine water en de biofilm in het distributiesysteem

In de kloonbibliotheken van het reine water en van de biofilm zijn vertegenwoordigers van de volgende fyta aangetoond: Amoebozoa, Cercozoa, Choanozoa, Ciliophora en Euglenozoa (Figuur 3.5). In de kloonbibliotheken van de biofilm zijn ook nog de fyta Myzozoa en de niet gedefinieerde groep Stramenopiles aangetroffen. Van de organismen behorende tot de fyta Amoebozoa, Cercozoa, Choanozoa, Ciliophora en Myzozoa is bekend dat ze zowel vrij in het water als in de biofilm leven. Organismen behorende tot het fyllum van de Euglenozoa staan bekend als biofilmbewoners. Bijna 40% van de klonen die clusteren met een protozo in het reine water behoren tot het fyllum van de Euglenozoa. Deze organismen zijn waarschijnlijk afkomstig van het marmerfilter en zijn uitgespoeld in het reine water.



Figuur 3.5 Samenstelling van de protozoa in de kloonbibliotheken van het reine water en in de biofilms van pb Amersfoortseweg

De meest dominante OTU binnen de Amoebozoa in de kloonbibliotheek van het reinwater van pb Amersfoortseweg heeft 86% overeenkomst met een *Acanthamoeba*-soort (Tabel 3.6). Ook met de Q-PCR zijn *Acanthamoeba*-soorten gedetecteerd in dit monster. Het *Acanthamoeba*-geslacht wordt verder beschreven in hoofdstuk 5, omdat verschillende soorten binnen dit geslacht bekend staan als gastheer van *L. pneumophila* en als pathogeen voor de mens. Drieënveertig procent van de OTU's binnen het fyllum van de Cercozoa uit het reine water heeft de meeste overeenkomst (94-97%) met *Cercomonas metabolicus*. Het *Cercomonas*-geslacht bestaat uit organismen met twee flagellen. Deze groep vormt schijnvoetjes (pseudopodia) om zich te voeden, maar niet om zich mee voort te bewegen. Ongeveer 40% van de klonen van de biofilm die binnen het Cercozoa-fyllum clusteren heeft de meeste overeenkomst (99%) met *Dodomorpha*-soort.

In de kloonbibliotheek van de biofilm hebben alle sequenties (100%) binnen de Ciliophora de meeste overeenkomst met *Tokophrya quadripartita* (88%) (Tabel 3.7). Dit organisme zit vast met een steeltje aan het substraat. Het heeft meerdere armen waarmee het zich kan vastzuigen aan organismen, zoals protozoa. De *Tokophrya* zuigt

met de arm cytoplasma van de prooi naar binnen om zo aan voedsel te komen. De prooi overleeft dit (39). Het Euglenozoa-fylum is dominant aanwezig in de kloonbibliotheek van het reine water. Hierbij is de soort *Neobodo designis* (88-97%) dominant. Dit is een flagellaat met twee flagellen en de cel is 4 tot 7 µm lang. Het is een echt zoetwaterorganisme. De fyla Amoebozoa en Ciliophora zullen nader worden besproken in hoofdstuk 5, omdat beschreven gastheren van *L. pneumophila* binnen deze groepen vallen. Zie bijlage II t/m VIII voor een compleet overzicht voor de aangetroffen protozotypen per fylum.

Tabel 3.6 Dominante protozosoort per fylum in de kloonbibliotheek van het reine water van pb Amersfoortseweg (1 monster)

Fylum	Aantal OTU's	Meest dominante soort	Overeenkomst (%)	Aandeel in fylum (%)
Amoebozoa	2	Eimeriidae milieu-kloon/ <i>Acanthamoeba</i> sp.	97/86	67
Cercozoa	8	<i>Cercomonas metabolicus</i>	94 - 97	29
Choanozoa	2	<i>Diaphanoeca grandis</i>	87	67
Ciliophora	3	Ongekweekte marine eukaryote/ Ongekweekte ciliaat	77/76	43
Euglenozoa	10	<i>Neobodo designis</i>	88 - 97	76
Myzozoa	0	-	-	-
Stramenopiles	0	-	-	-

Tabel 3.7: Dominante protozosoort per fylum in de kloonbibliotheeken van de biofilm in het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg (combinatie van drie monsters)

Fylum	Aantal OTU's*	Meest dominante soort	Overeenkomst (%)	Aandeel in fylum (%)
Amoebozoa	4	<i>Raineriophrys erinaceoides</i>	94-95	50
Cercozoa	12	<i>Dodomorpha</i> sp.	99	40
Choanozoa	8	Eimeriidae milieu-kloon/ <i>Stephanoeca diplocostata</i>	94/93	47
Ciliophora	1	<i>Tokophrya lemnaeum</i>	88	100
Euglenozoa	1	<i>Petalomonas cantuscygni</i>	86	100
Myzozoa	1	<i>Pseudoperkinsus tapetis</i>	87	100
Stramenopiles	3	<i>Aphanomyces invadans</i>	98-99	75

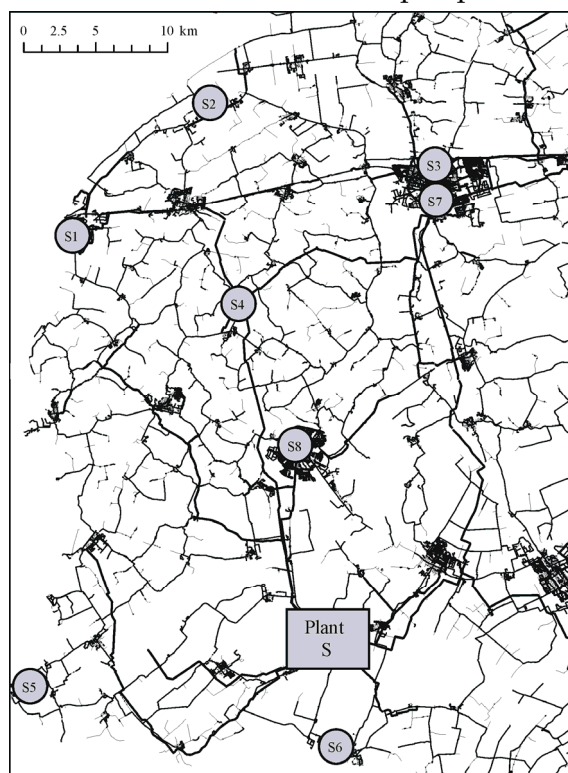
* Alleen onderling verschillende OTU's

4 Identificatie van protozoa in het reine water en in het distributiesysteem van pb Spannenburg

4.1 Doel en aanpak

Bij pb Spannenburg wordt drinkwater bereid uit zuurstofloos grondwater met een hoog NOM-gehalte. Dit onderzoek heeft tot doel om te bepalen welke protozoa voorkomen in het reine water, in de biofilm van het distributiesysteem en in het gedistribueerde water van pb Spannenburg. Hierbij kunnen de volgende subdoelen worden onderscheiden:

- Bepalen van de concentratie van *H. vermiformis* en *Acanthamoeba*-soorten in het reine water, in het gedistribueerde water en in de biofilm in het distributiesysteem van pb Spannenburg;
- Bepalen van de stabiliteit van de gemeenschap van eukaryoten in het reine water van pb Spannenburg op verschillende data in één jaar;
- Vergelijken van de eukaryotische diversiteit van eukaryoten in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem van pb Spannenburg;
- Detectie en identificatie van protozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem van pb Spannenburg;
- Identificatie van mogelijke gastheerprotozoa van *L. pneumophila* en pathogene protozoa in het reine water en in de biofilm van pb Spannenburg.



Figuur 4.1. Monsterlocaties van leidingsegmenten en gedistribueerde water uit het distributiesysteem van pb Spannenburg

Op dezelfde data als bij pb Amersfoortseweg zijn reinwatermonsters, monsters van het gedistribueerde water en biofilmmonsters genomen van pb Spannenburg (Tabel 4.1, 4.2, 4.3 en Figuur 4.1). De leidingsegmenten uit het distributiesysteem van pb Spannenburg komen van verschillende locaties in de provincie Friesland. De reinwatermonsters worden aangeduid met RW-S1 t/m RW-S7, de monster van het gedistribueerde drinkwater worden aangegeven met DW-S1 t/m DW-S8 en biofilm van de leidingsegmenten worden aangeduid met BF-S1 t/m BF-S8. Van alle monsters zijn de concentraties van *H. vermiformis* en *Acanthamoeba*-soorten bepaald met de Q-PCR methode. Daarnaast is van de reinwatermonsters en de biofilmmonsters een fingerprint gemaakt van de gemeenschap van eukaryoten met behulp van de T-RFLP-methode. Van de monsters RW-S1, BF-S1, BF-S4 en BF-S5 zijn ook kloonbibliotheken gemaakt om de dominante protozoa in het reine water en in de biofilm te identificeren. De biofilmmonsters zijn uitgekozen op basis van ATP-concentraties en de afstand die het reine water moet afleggen vanaf het productiebedrijf tot de monsterplaats in het distributienet.

Tabel 4.1 Beschrijving reinwatermonsters van pb Spannenburg

Reinwater	Productiebedrijf	Datum	T (°C)	ATP (ng/l)
RW-S1	Spannenburg	24-02-05	10,8	20,5
RW-S2	Spannenburg	27-04-05	11,3	6,74
RW-S3	Spannenburg	14-08-05	12,3	9,48
RW-S4	Spannenburg	14-09-05	12,3	7,38
RW-S5	Spannenburg	12-10-05	12,1	6,78
RW-S6	Spannenburg	31-07-07	12,0	11,7
RW-S7	Spannenburg	14-11-07	11,5	11,53

Tabel 4.2 Beschrijving van de biofilmmonsters uit het distributiesysteem van pb Spannenburg

Biofilm	Plaats	Straat	Datum	T (°C)	ATP pg/cm ²
BF-S1	Harlingen	Botterhof	12-10-05	13-14	320,9
BF-S2	Tzummarum	Hearewei	12-10-05	13-14	252,0
BF-S3	Leeuwarden	Rixtwei	12-10-05	13-14	848,8
BF-S4	Wommels	Klampe	13-10-05	13-14	383,8
BF-S5	Stavoren	Stationsweg	13-10-05	13-14	224,7
BF-S6	Lemmer	Pollux	13-10-05	13-14	167,4
BF-S7	Leeuwarden	Hollanderhof	02-11-05	13-14	354,3
BF-S8	Sneek	Meerkoetlaan	02-11-05	13-14	125,5

Tabel 4.3 Beschrijving gedistribueerde water van pb Spannenburg

Gedistribueerd water	Plaats	Straat	T (°C)		ATP (ng/l)	
			12-7-07	14-11-07	12-7-07	14-7-07
DW-S1	Harlingen	Botterhof	17,1	11,5	3,3	5,6
DW-S2	Tzummarum	Hearewei	12,4	12,5	3,0	4,6
DW-S3	Leeuwarden	Rixtwei	13,8	12,5	4,1	3,7
DW-S4	Wommels	Klampe	12,3	12,0	4,6	7,7
DW-S5	Stavoren	Stationsweg	12,8	12,5	5,3	5,6
DW-S6	Lemmer	Pollux	13,7	13,5	5,5	5,7
DW-S7	Leeuwarden	Hollanderhof	14,2	11,5	3,7	5,0
DW-S8	Sneek	Meerkoetlaan	16,8	13,5	3,0	4,5

4.2 Hartmannella vermiformis en Acanthamoeba-soorten in het reine water, in het gedistribueerde water en in de biofilm in het distributiesysteem

In RW-S3 en RW-S7 is *H. vermiformis* aangetroffen; de concentratie in beide monsters was 1,5 cel/l. In de andere reinwatermonsters is geen *H. vermiformis* waargenomen. In geen van de negatieve controles is DNA van *H. vermiformis* aangetoond, met uitzondering van de negatieve controles bij monster RW-S1. Het is daarom niet mogelijk om van dit monster de concentratie van *H. vermiformis* te bepalen.

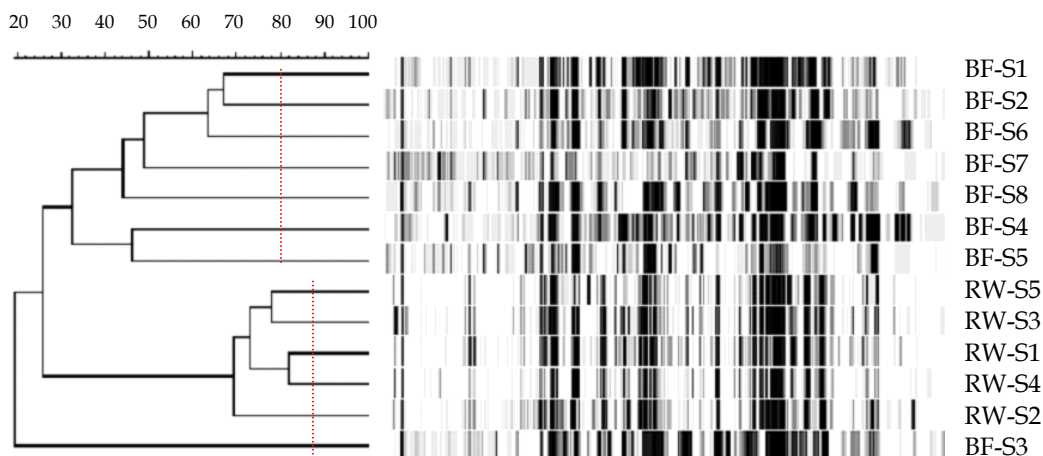
Één van de acht biofilmmonsters uit het distributiesysteem van pb Spannenburg was positief voor *H. vermiformis*. De concentratie van *H. vermiformis* in BF-S7 is 4,6 cellen/10,7 cm². In één biofilmmonster (BF-S5) is remming opgetreden van de PCR-amplificatie. Door het monster 10 maal te verdunnen is deze remming ongedaan gemaakt. Geen van de negatieve controles behorende bij de biofilmmonsters was positief voor *H. vermiformis*.

In alle monsters van het gedistribueerde water is *H. vermiformis* aangetroffen in concentraties variërend van 17 tot 815 cellen/l in juni en in november van 2 tot 18 cellen/l (m.u.v. DW-S3). In de zomer zijn dus hogere concentraties van *H. vermiformis* aangetroffen dan in het najaar. Geen van de negatieve controles behorende bij de monsters van het gedistribueerde water was positief voor *H. vermiformis*. In geen van de monsters en de negatieve controles zijn *Acanthamoeba*-soorten aangetroffen met de Q-PCR methode.

4.3 Eukaryotische diversiteit in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem

De herhaalbaarheid van de T-RFLP-methode met reinwater- en biofilmmonster van pb Spannenburg is bepaald om vast te stellen of de monsters geanalyseerd op verschillende data vergeleken kunnen worden. De herhaalbaarheid van de T-RFLP-methode is op dezelfde wijze bepaald als in de monsters van pb Amersfoortseweg. Als de reinwatermonsters voor 86,6% of meer overeenkomen worden de fingerprints als niet verschillend beschouwd. Bij de biofilmmonsters ligt dit percentage lager; bij minimaal 79,7% overeenkomst worden de monsters als niet verschillend beschouwd. In het reine water en in alle biofilms is een grote eukaryotische diversiteit aanwezig (Figuur 4.2). De fingerprints van het reine water vormen een cluster en de fingerprints van de biofilms vormen twee aparte clusters. Dit laat zien dat de samenstelling van de gemeenschap van eukaryoten in het reine water verschilt van de gemeenschap van eukaryoten in de biofilms. Op de verschillende monsterdata vertonen de gemeenschappen van eukaryoten in het reine water een minimale overeenkomst van 70%. De gemeenschappen van eukaryoten in deze monsters zijn verschillend, omdat ze buiten 86% overeenkomst vallen.

De gemeenschappen van eukaryoten in de biofilms vertonen een overeenkomst van minimaal 29%, m.u.v. BF-S3. Dit biofilmmonster valt buiten beide clusters van het reine water en de biofilms. Op verschillende plaatsen in het distributiesysteem van pb Spannenburg domineren verschillende typen eukaryoten.



Figuur 4.2: T-RFLP-patroon van de gemeenschappen van eukaryoten voorkomend in het reine water en in de biofilm van pb Spannenburg. Gestippelde verticale lijnen geven de minimale overeenkomst tussen de monsters waarbij de monsters als niet verschillend worden beschouwd. Reinwatermonsters: RW-S1 t/m RW-S5. Biofilmonsters: BF-S1 t/m BF-A7.

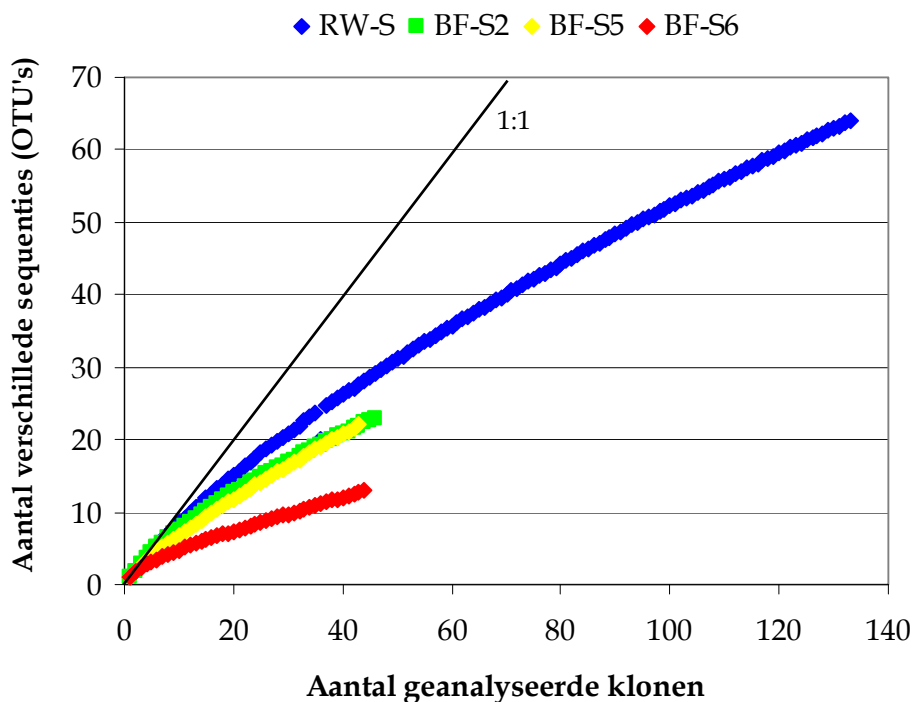
Van één reinwatermonster en drie biofilmonsters zijn kloonbibliotheken gemaakt om de gemeenschap van eukaryoten te identificeren. Van 1,5 liter reinwater is DNA geïsoleerd en hiervan is 1/20 deel geanalyseerd met een kloonbibliotheek. Van 10-25 cm² biofilm uit de leidingsegmenten is DNA geïsoleerd, hiervan is 1/15 deel geanalyseerd met behulp van kloonbibliotheken. In het reine water van Spannenburg zijn 64 verschillende OTU's aangetroffen (>99% overeenkomst) en in de biofilms van pb Spannenburg zijn minimaal 13 OTU's te onderscheiden (Tabel 4.4).

Tabel 4.4. OTU's per kloonbibliotheek van het reine water en in de biofilms van pb Spannenburg

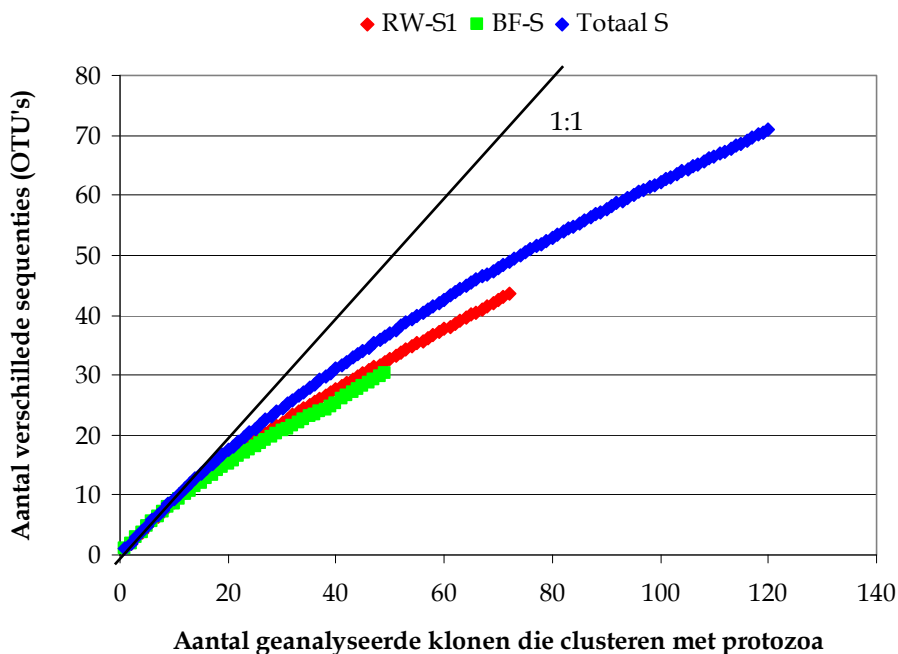
Monstertype	Code	Aantal geanalyseerde klonen	Aantal OTU's	Aantal OTU's die clusteren met protozoa
Reinwater	RW-S1	134	64	43
Biofilm	BF-S2	45	21	14
	BF-S5	43	22	13
	BF-S6	44	13	4
	BF-Totaal	132	55*	31*
Totaal	-	266	117*	71*

* Alleen onderling verschillende OTU's

Met behulp van Rarefactioncurves kan worden voorspeld of het aantal geanalyseerde klonen een goed beeld geeft van de aanwezige eukaryotensequenties. Bij deze Rarefactionbepaling is onderscheid gemaakt tussen alle verkregen sequenties (Figuur 4.3) en de sequenties met de meeste overeenkomst met protozoa (Figuur 4.4). Naarmate er meer klonen geanalyseerd worden, zullen in deze monsters nog nieuwe sequenties worden aangetroffen. De lijnen lopen immers nog niet horizontaal. De dominante OTU's zijn geanalyseerd, maar om alle OTU's in elk monster te identificeren zijn meer klonen nodig. In dit onderzoek gaat het om de dominante typen van eukaryoten (en deze hebben wij met deze aantallen kunnen analyseren).



Figuur 4.3: Rarefactioncurves van de kloonbibliotheken van het reine water en van de biofilms van pb Spannenburg. Het aantal geanalyseerde klonen is uitgezet tegen het aantal OTU's per monster.



Figuur 4.4: Rarefactioncurves van de kloonbibliotheken van het reine water en de biofilms van pb Spannenburg. Het aantal geanalyseerde klonen die clusteren met protozoa is uitgezet tegen het aantal OTU's per monster.

In de kloonbibliotheek van het reine water heeft 52% van de klonen de meeste overeenkomst met een protozo (Tabel 4.5). De kloonbibliotheken van de biofilms laten een andere samenstelling zien. De kloonbibliotheek van BF-S2 bestaat, net als in het reine water, voor het grootste gedeelte uit sequenties die clusteren met protozoa. De

kloonbibliotheken van BF-S5 en BF-S6 bestaan voor minimaal 15% uit protozoa en meer dan 60% uit metazoa. Een zeer dominante metazo in deze twee monsters is de zoetwaterkwal *Craspedacusta sowerbyi*. Dit organisme zal worden besproken in hoofdstuk 7.

Ook in de kloonbibliotheken van het reine water zijn sequenties aangetroffen die de meeste overeenkomst hebben met metazoa. Daarnaast zijn in drie van de vier kloonbibliotheken schimmels aangetroffen. Het is niet mogelijk iets te zeggen over het aantal protozoa ten opzichte van meercellige organismen, omdat één meercellige organisme meer DNA-kopieën bevat dan één eencellig organisme. De verhouding in de kloonbibliotheek komt hierdoor scheef te liggen. De metazoa en schimmels zullen nader worden toegelicht in hoofdstuk 7. Vijftien procent van de sequenties van pb Spannenburg heeft een overeenkomst lager dan 75% met beschreven soorten en is niet te identificeren. Deze sequenties zijn aangeduid met onbekend.

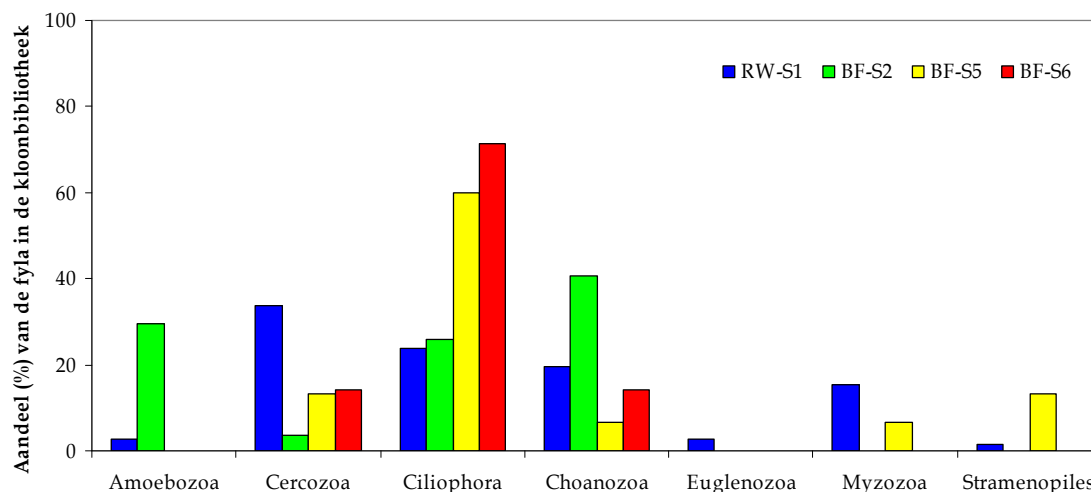
Tabel 4.5 Percentuele samenstelling van de kloonbibliotheken van eukaryoten in het reine water en in de biofilms van pb Spannenburg

Groep	RW-S1 (%)	BF-S2 (%)	BF-S5 (%)	BF-S6 (%)	Totaal (%)
Protozoa	52,2	58,8	34,1	15,9	44,4
Schimmels	2,9	13,0	2,3	0	4,1
Metazoa	23,5	4,3	63,6	77,3	35,5
Protophyta en planten	0	0	0	2,3	0,8
Onbekend	21,4	23,9	0	4,5	15,2
Totaal	100	100	100	100	100

4.4 Protozoa in de kloonbibliotheken van het reine water en van de biofilm in het distributiesysteem

In de vier kloonbibliotheken zijn sequenties aangetroffen die clusteren met de fyta Cercozoa, Ciliophora en Choanozoa (Figuur 4.5). Amoebozoa, Myzozoa en Stramenopiles zijn aangetroffen in het reine water en in één biofilmmonster. Van de organismen behorende tot de fyta Amoebozoa, Cercozoa, Choanozoa, Ciliophora en Myzozoa is bekend dat deze zowel vrij in het water als in de biofilm voorkomen. In de biofilmmonsters varieert het percentage van Amoebozoa per kloonbibliotheek. In BF-S2 is deze groep dominant, bijna 30% van de protozoa valt binnen dit fylum. In de kloonbibliotheken van de andere biofilmmonsters is deze groep niet aangetroffen. In de kloonbibliotheken van de biofilmmonsters BF-S5 en BF-S6 is het Ciliophora-fylum dominant aanwezig in de gemeenschap van protozoa. Meer dan 60% van de klonen heeft de meeste overeenkomst met een Ciliophora.

Het Amoebozoa-fylum in de kloonbibliotheek van het reine water bestaat uit twee verschillende sequenties die de meeste overeenkomst hebben met *Echinamoeba thermanum* (86%) en *Neoparamoeba aestuarina* (89% overeenkomst) (Tabel 4.6 en 4.7). *E. thermanum* staat niet bekend als gastheer van *L. pneumophila*, maar van de soort *E. exundans* is wel bekend dat deze kan fungeren als gastheer van *L. pneumophila* (19).



Figuur 4.5: Samenstelling van de protozoa in de kloombibliotheken van het reine water en de biofilms van pb Spannenburg

Meer dan twintig procent van de OTU's binnen het fyllum van de Cercozoa uit het reine water en de biofilm heeft de meeste overeenkomst (94-97%) met een *Cercomonas*-soort. Eenderde van de klonen uit het reine water en uit de biofilm die binnen het Ciliophora-fyllum vallen hebben de meeste overeenkomst met een *Vorticella*-soort (92-99%). Deze soort behoort tot de ciliaten en is voor het eerst beschreven in 1831 door Ehrenberg (39). Dit organisme kan zich met een steeltje hechten aan een oppervlak en het voedsel filtreren uit het langsstromende water. De meeste klonen uit het reine water behorende tot de Choanozoa-fyllum hebben de meeste overeenkomst (88-95%) met *Monosiga ovata*. Dit is een flagellaat die algemeen voorkomt in zoetwater. Dit organisme zit meestal vast met een steeltje aan een oppervlak, maar zodra de omstandigheden slecht worden kan de protozo zich losmaken en zich voortbewegen met de flagel (39).

De fylla Amoebozoa en Ciliophora zullen nader worden besproken in hoofdstuk 6, omdat binnen deze groepen beschreven gastheren van *L. pneumophila* vallen. Zie bijlage II t/m VIII voor een compleet overzicht van de aangetroffen protozotypen per fyllum.

Tabel 4.6. Dominante protozosoort per fyllum in de kloombibliotheek van het reine water van pb Spannenburg (1 monster)

Fylum	Aantal OTU's	Meest dominante soort	Overeenkomst (%)	Aandeel in fyllum (%)
Amoebozoa	2	Twee verschillende sequenties, geen dominante soort		
Cercozoa	15	<i>Cercomonas</i> sp.	95	21
Choanozoa	8	<i>Monosiga ovata</i>	90-95	38
Ciliophora	12	<i>Vorticella</i> sp.	92-99	35
Euglenozoa	2	Twee verschillende sequenties, geen dominante soort		
Myzozoa	3	Ongekweekte alveolate	91	82
Stramenopiles	1	<i>Paraphrysomonas foraminifera</i>	98	100

Tabel 4.7 Dominante protozosoort per fyllum in de kloonbibliotheken van de biofilm in het distributiesysteem van pb Spannenburg (combinatie van drie monsters)

Fyllum	Aantal OTU's*	Meest dominante soort	Overeenkomst (%)	Aandeel in fyllum (%)
Amoebozoa	2	<i>Hartmannellidae</i> sp.	78	88
Cercozoa	4	Vier verschillende sequenties, geen dominante soort		
Choanozoa	8	<i>Diaphanoeca grandis</i>	93	50
Ciliophora	15	<i>Vorticella</i> sp.	92-99	62
Euglenozoa	0	-	-	-
Myzozoa	1	<i>Peridinium wierrejskii</i>	97	100
Stramenopiles	1	<i>Hyphochytrium catenoides</i>	97	100

* Alleen onderling verschillende OTU's

5 Vergelijking van de twee drinkwatertypen m.b.t. aanwezigheid van protozoa

5.1 Samenstelling van gemeenschappen van eukaryoten in het reine water

Bij beide productiebedrijven varieert de samenstelling van gemeenschappen van eukaryoten tijdens de verschillende monsterdata. Per monsterdatum zijn significant verschillende fingerprints verkregen (Figuur 3.2 en 4.2). Mogelijk hebben aanpassingen van het productieproces, zoals het aanvullen van het materiaal in de filterbedden, invloed op de samenstelling van gemeenschappen van eukaryoten in het reine water. De samenstelling en de temperatuur van het ruwe grondwater bij beide productiebedrijven zijn namelijk stabiel tijdens de verschillende seizoenen.

In deze studie is per productiebedrijf de identiteit bepaald van de dominante eukaryoten door van één van de zeven reinwatermonsters kloonbibliotheken te maken. Analyses van reinwatermonsters van andere monsterdata zullen nog meer nieuwe OTU's opleveren.

De samenstelling van de gemeenschap van de eukaryoten in het reine water van pb Amersfoortseweg verschilt van de samenstelling in het reine water van pb Spannenburg. Er is meer verschil tussen de fingerprints van beide productiebedrijven dan tussen de fingerprints per productiebedrijf. In de kloonbibliotheken van het reine water van pb Spannenburg zijn meer OTU's aangetroffen die clusteren met protozoa en metazoa dan in het reine water van pb Amersfoortseweg (Tabel 5.1). Slechts twee van de 114 OTU's zijn aangetroffen in het reine water van pb Amersfoortseweg en van pb Spannenburg. Beide OTUs clusteren met metazoa (Zie voor meer informatie hoofdstuk 7).

Tabel 5.1 Verdeling van de OTU's in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem

Groep	Pb Amersfoortseweg				Pb Spannenburg				Totaal	
	Reinwater		Biofilm		Reinwater		Biofilm		Aantal OTU's*	%
	Aantal OTU's	% OTU's	Aantal OTU's*	% OTU's	Aantal OTU's	% OTU's	Aantal OTU's*	% OTU's		
Protozoa	25	48	30	54	43	67	31	37	127	58
Schimmels	6	12	11	20	4	6	6	5	25	11
Metazoa	4	8	3	5	10	16	14	47	28	13
Protophyta en planten	3	6	2	4	0	0	1	1	5	2
Onbekend	14	27	10	18	7	11	3	10	34	16
Totaal	52	100	56	100	64	100	55	100	219	100

* Alleen onderling verschillende OTU's

Uit de fingerprints blijkt dat de gemeenschappen van eukaryoten in het reine water van pb Amersfoortseweg meer variatie vertonen dan de gemeenschappen in het reine water van pb Spannenburg (Figuur 3.2 en 4.2). De gehalten aan organische koolstof (NPOC) in het reine water van pb Amersfoortseweg zijn lager (ca. 0,3 mg koolstof/l) dan in het water van pb Spannenburg (ca. 8 mg koolstof/l). Door de mindere aanvoer van voedsel (organische stof), in het reine water van pb Amersfoortseweg dan in het water van pb Spannenburg, is er ook minder microbiologische activiteit (ATP-gehalte) en mogelijk ook minder groei van protozoa (Tabel 3.1 en 4.1). Een beperking van de T-

RFLP-methode is dat naarmate er lagere DNA-concentraties worden gebruikt er meer variatie zichtbaar wordt (46). Dit kan een verklaring zijn voor de grotere variatie in de fingerprints van het reine water van pb Amersfoortseweg ten opzichte van het reine water van pb Spannenburg.

In 1,5 liter van het reine water van pb Amersfoortseweg zijn 52 verschillende OTU's aangetroffen (Tabel 3.4). In 1,5 liter van het reine water van pb Spannenburg zijn 62 verschillende OTU's aangetroffen (Tabel 4.4). De Rarefactioncurve van de kloombibliotheek van pb Spanneburg loopt steiler dan de curve van de kloombibliotheek van pb Amersfoortseweg (Figuur 3.3 en 4.3). Mogelijk is de eukaryotische diversiteit in het reine water van pb Amersfoortseweg kleiner dan in het reine water van pb Spannenburg. Met het aantal geanalyseerde klonen zijn de dominante eukaryoten geanalyseerd. Door meer klonen te analyseren kan bepaald worden of de eukaryotische diversiteit in het reine water van pb Spannenburg groter is dan in het reine water van pb Amersfoortseweg.

5.2 Samenstelling van gemeenschappen van eukaryoten in de biofilms in het distributiesysteem

Bij beide productiebedrijven verschilt de gemeenschap van eukaryoten in het reine water van de gemeenschap van eukaryoten in de biofilm. Bij beide productiebedrijven zijn verschillende fingerprints verkregen van het reine water en de biofilms (Figuur 3.2 en 4.2). Vergelijkbare aantallen OTU's en gelijke verdelingen van de OTU's over de groepen zijn aangetroffen in de kloombibliotheken van het reine water en de biofilm van pb Amersfoortseweg (Tabel 5.1). De aangetroffen OTU's in het reine water van pb Amersfoortseweg zijn niet aangetroffen in de biofilms van het bijbehorende productiebedrijf. In de kloombibliotheken van het reine water van pb Spannenburg zijn meer OTU's aangetroffen dan in de biofilm van het bijbehorende productiebedrijf (Tabel 5.1). Het gaat hier voornamelijk om OTU's die clusteren met protozoa. Twee van deze OTU's, die beide clusteren met protozoa (Ciliophora), zijn zowel aangetroffen in het reine water als in de biofilm van pb Spannenburg. Bijna 50% van de DNA-sequenties uit de biofilm van pb Spannenburg clusteren met metazoa. In deze groep domineren DNA-sequenties met de meeste overeenkomst met de zoetwaterkwal *Craspedacusta sowerbyi* (Zie hoofdstuk 7 voor meer informatie). In het reine water van pb Spannenburg clustert 25% van de sequenties met metazoa, maar de zoetwaterkwal is niet aangetoond in dit monster.

Op verschillende locaties in beide voorzieningsgebieden domineren verschillende eukaryoten. De fingerprints van de biofilms binnen één voorzieningsgebied zijn significant verschillend (Figuur 3.2 en 4.2). In de drie kloombibliotheken van de biofilms van pb Amersfoortseweg domineren (> 55%) sequenties die clusteren met protozoa (Tabel 3.5). Acht (14%) van de 56 OTU's uit de biofilms van pb Amersfoortseweg zijn aangetroffen op meer dan één locatie in het distributiesysteem. In twee van de drie biofilms van pb Spannenburg domineren niet de protozoa, maar de metazoa in de kloombibliotheken van pb Spannenburg (Tabel 4.5). Van de 55 OTU's uit de biofilm van pb Spannenburg is enkel één OTU aangetroffen op twee locaties in het distributiesysteem. Deze OTU heeft de meeste overeenkomst met de zoetwaterkwal. De samenstelling van de gemeenschappen van eukaryoten in de biofilms van pb Amersfoortseweg verschilt van de gemeenschappen in de biofilms van pb Spannenburg. Er is significant meer verschil tussen de fingerprints van pb

Amersfoortseweg en pb Spannenburg dan tussen de fingerprints per productiebedrijf. Geen van de aangetroffen OTU's in de biofilms van pb Amersfoortseweg zijn ook aangetroffen in de biofilms van pb Spannenburg.

In de biofilms van pb Amersfoortseweg zijn minimaal 15 OTU's per 13 cm² aangetroffen, in de biofilms van pb Spannenburg zijn minimaal 13 OTU's aangetroffen per 10 cm² (Tabel 3.4 en 4.4). Rarefactioncurves van de biofilms van beide productiebedrijven lopen ongeveer even steil (Figuur 3.4 en 4.4). Waarschijnlijk is de eukaryotische diversiteit in de biofilms in beide voorzieningsgebieden vrijwel gelijk.

Samengevat, in ieder monster is een grote diversiteit aan eukaryoten aangetroffen en per monstertype zijn onderling verschillende eukaryoten aangetoond.

5.3 Samenstelling van gemeenschappen van protozoa in het reine water van de productiebedrijven

Van de 219 OTU's clusteren 127 OTU's (252 sequenties) met protozoa (Tabel 5.2).

In de kloonbibliotheken van beide reinwatertypen clusteren de meeste OTU's met protozoa (Tabel 5.1). In de kloonbibliotheek van het reine water van pb Spannenburg zijn meer OTU's en sequenties aangetroffen die clusteren met protozoa dan in de kloonbibliotheek van pb Amersfoortseweg. Echter, de Rarefactioncurves van beide reinwatertypen lopen even steil, dus waarschijnlijk is de diversiteit aan protozoa in beide watertypen gelijk (Figuur 3.4 en 4.4). Maar de OTU's aangetroffen in het reine water van pb Amersfoortseweg zijn niet waargenomen in het reine water van pb Spannenburg.

Tabel 5.2 Verdeling van de OTU's over de fyln van protozoa in het reine water en in de biofilm van beide productiebedrijven

Fylum	Pb Amersfoortseweg				Pb Spannenburg				Totaal	
	Reinwater		Biofilm		Reinwater		Biofilm		Aantal OTU's*	%
	Aantal OTU's	% OTU's	Aantal OTU's*	% OTU's	Aantal OTU's	% OTU's	Aantal OTU's*	% OTU's		
Amoebozoa	2	8	4	13	2	5	2	6	10	8
Cercozoa	8	32	12	40	15	35	4	13	39	31
Choanozoa	2	8	8	27	8	19	8	26	26	20
Ciliophora	3	12	1	3	12	28	15	48	29	23
Euglenozoa	10	40	1	3	2	5	0	0	13	10
Myzozoa	0	0	1	3	3	7	1	3	5	4
Stramenopiles	0	0	3	10	1	2	1	3	5	4
Totaal	25	100	30	100	43	100	31	100	127	100

* Alleen onderling verschillende OTU's

Op fylumniveau zijn grote verschillen zichtbaar tussen de twee watertypen. Zo zijn in de kloonbibliotheek van het reine water van pb Amersfoortseweg 10 (40%) OTU's aangetroffen die clusteren met Euglenozoa-typen, terwijl er maar 2 (5%) OTU's zijn aangetroffen in de kloonbibliotheek van pb Spannenburg (Tabel 5.2). In beide watertypen zijn sequenties aangetroffen met de meeste overeenkomst met de Euglenozoa *Neobodo designis* (Zie bijlage VI). Deze flagellaat is een echt zoetwaterorganisme (Figuur 5.1).

In de kloonbibliotheek van het reine water van pb Spannenburg zijn meer OTU's aangetroffen die clusteren met Cercozoa-, Choanozoa- en Ciliophoratypen dan in de kloonbibliotheek van pb Amersfoortseweg. Geen van deze OTU's zijn aangetroffen in

beide watertypen. Wel zijn in beide watertypen sequenties aangetroffen met de meeste overeenkomst met soorten binnen het *Cercomonas*-geslacht (Zie bijlage III). Deze Cercozoa hebben flagellen om zich mee voort te bewegen en schijnvoetjes om zich mee te voeden (Figuur 5.1). Sequenties met de meeste overeenkomst met *Diaphanoeca grandis* (Choanozoa) zijn ook aangetroffen in het reine water van beide productiebedrijven (Zie bijlage IV). Deze flagellaat komt wereldwijd voor en heeft een lengte tussen 16 - 38µm.

DNA-sequenties en OTU's die clusteren met Amoebozoa zijn in beide watertypen niet dominant. In het reine water van pb Spannenburg zijn ook nog sequenties aangetroffen die clusteren met Myzozoa- en Stramenopiles-typen, maar deze zijn niet aangetroffen in het water van pb Amersfoortseweg.



Figuur 5.1 Afbeeldingen van de geslachten v.l.n.r.) *Neobodo*, *Cercomonas*, *Stephanoeca* en *Vorticella*
Bron: *Encyclopedia of life* (2)

5.4 Samenstelling van gemeenschappen van protozoa in de biofilm in het distributiesysteem

In de kloombibliotheken van de biofilms van pb Amersfoortseweg domineren sequenties die clusteren met protozoa, maar in de kloombibliotheken van pb Spannenburg domineren metazoa (Tabel 5.1). Echter, in alle drie de biofilms per productiebedrijf zijn 30 OTU's aangetroffen die clusteren met protozoa (Tabel 5.2). De Rarefactioncurve van de biofilm van pb Spannenburg loopt steiler dan de curve van pb Amersfoortseweg. Mogelijk is de diversiteit aan protozoa in de biofilm van pb Amersfoortseweg kleiner dan in biofilm van pb Spannenburg (Figuur 3.4 en 4.4).

Vijf (17%) van de 30 OTU's zijn aangetroffen in meer dan één biofilmmonster van pb Amersfoortseweg. Vier van deze OTU's clusteren met Cercozoa-typen en één OTU met Choanozoa-typen. Biofilms van de drie geanalyseerde locaties in het distributiesysteem van pb Spannenburg bevatten geen overeenkomende OTU's. Dit betekent dat in ieder monster specifieke omstandigheden heersten, waardoor andere organismen domineerden. Ondanks dat er één type reinwater door het distributiesysteem gepompt wordt, ontstaan verschillende biotopen, waar andere protozotypen domineerden.

De OTU's in de biofilm van pb Amersfoortseweg zijn niet aangetroffen in de biofilms van pb Spannenburg. In de biofilms van pb Amersfoortseweg domineren voornamelijk OTU's die clusteren met Cercozoa- en Choanozoa-typen. Ook in de biofilms van pb

Spannenburg domineren Choanozoa-typen, verder domineren in deze biofilms Ciliophora-typen (Tabel 5.2). In beide distributiesystemen zijn OTU's aangetroffen die de meeste overeenkomst hebben met de Choanozoa-geslachten *Monosiga*, *Ichthyophonus*, *Diaphanoeca* en *Stephanoeca* (Figuur 5.1 en zie bijlage IV).

Geen van de OTU's uit de biofilms van pb Amersfoortseweg zijn ook aangetroffen in het bijbehorende reine water. Twee OTU's uit de biofilm van pb Spannenburg, met de meeste overeenkomst met het *Vorticella*-geslacht, zijn ook aangetroffen in het reine water van pb Spannenburg (Zie bijlage V). Deze ciliaat zit vastgehecht met een steeltje aan de biofilm en filtreert het voedsel uit het langstromende water (Figuur 5.1). Mogelijk is de *Vorticella* in het reine water afkomstig uit het langzaam zandfilter bij het productiebedrijf.

In het reine water en biofilms van pb Amersfoortseweg zijn 55 OTU's aangetroffen die clusteren met protozoa en in het voorzieningsgebied van pb Spannenburg zijn 72 OTU's aangetroffen. De Rarefactioncurve van pb Spannenburg loopt steiler dan van pb Amersfoortseweg (Figuur 3.4 en 4.4). Mogelijk is de diversiteit aan protozoa in het voorzieningsgebied van pb Amersfoortseweg kleiner dan in biofilm van pb Spannenburg. De OTU's aangetroffen in het reine water en in de biofilms van pb Amersfoortseweg zijn niet aangetroffen in het voorzieningsgebied van pb Spannenburg. In ieder monster is een grote diversiteit aan protozoa aangetroffen en in ieder monster zijn verschillende protozoa waargenomen. In beide drinkwatertypen zijn verschillende protozoa aanwezig. Dit betekent dat in beide voorzieningsgebieden verschillende biotopen zijn ontstaan, waar andere protozotypen domineerden.

6 Gastheerprotozoa van *Legionella pneumophila* en pathogene vrijlevende protozoa

6.1 Beschreven gastheerprotozoa en pathogene vrijlevende protozoa

Verschillende laboratoriumstudies laten zien dat *L. pneumophila* zich kan vermeerderen in een of meerdere soorten van de protozogeslachten *Acanthamoeba* (43), *Hartmannella* (42), *Echinamoeba* (19), *Balamuthia* (47), *Naegleria* (43), *Vahlkampfia* (42) en *Tetrahymena* (20, 30). Andere protozogeslachten die in verband zijn gebracht met de groei van *Legionella pneumophila* zijn *Platyamoeba*, *Saccamoeba* en *Vexillifera* (52). Een aantal van deze gastheren kunnen ook pathogene eigenschappen voor de mens hebben. *Acanthamoeba*-soorten kunnen ontstekingen veroorzaken van het hoornvlies bij gebruik van contactlenzen (35). *Acanthamoeba*-soorten (28), *Balamuthia mandrillaris* (59) en *Naegleria fowleri* (62) kunnen ontsteking aan het hersenvlies of de hersenen veroorzaken. Van *Hartmannella*-soorten wordt gesuggereerd dat de verschillende soorten infecties van het hoornvlies kunnen veroorzaken bij gebruik van contactlenzen (1, 28, 34). In een andere studie wordt dit in twijfel getrokken (15).

6.2 Aangetroffen gastheerprotozoa

Bij beide productiebedrijven is *H. vermiformis* aangetoond met de Q-PCR methode in het reine water en in de biofilm in het distributiesystemen (Tabel 6.1). Ook in het gedistribueerde water van pb Spannenburg is *H. vermiformis* aangetroffen met de Q-PCR methode. In de monsters waarvan kloonbibliotheken zijn gemaakt, is *H. vermiformis* echter niet waargenomen met de Q-PCR methode. In de kloonbibliotheek van BF-S2 is één OTU aangetroffen met de meeste overeenkomst met een *Hartmannella*-soort (Tabel 6.1). De gebruikte Q-PCR is specifiek voor *H. vermiformis*, waardoor andere soorten binnen het *Hartmannella*-geslacht niet zijn gedetecteerd.

Twee OTU's uit de kloonbibliotheek van het reine water van pb Amersfoortseweg hebben de meeste overeenkomst met sequenties van het *Acanthamoeba*-geslacht. *Acanthamoeba*-soorten zijn ook aangetoond met de Q-PCR in dit watermonster. Één OTU is niet verder in te delen, maar de andere OTU heeft de meeste overeenkomst (89,3%) met *A. polyphaga*. Ook in één van de biofilms in het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg zijn *Acanthamoeba*-soorten aangetoond in lage concentraties met Q-PCR. Van dit monster is ook een kloonbibliotheek gemaakt, maar geen van de DNA-sequenties heeft de meeste overeenkomst met *Acanthamoeba*-soorten. Dus *Acanthamoeba*-soorten zijn geen dominant type in de gemeenschap van protozoa in het voorzieningsgebied van pb Amersfoortseweg. *Acanthamoeba*-soorten zijn niet waargenomen in de monsters van pb Spannenburg.

Één OTU uit de kloonbibliotheek van pb Spannenburg heeft de meeste overeenkomst (86%) met *Echinamoeba thermarum*. Binnen het *Echinamoeba*-geslacht is alleen *E. exundans* beschreven als gastheer van *L. pneumophila* (19). Soorten binnen één geslacht

kunnen dezelfde fysiologische kenmerken hebben, waardoor meerdere soorten uit één geslacht mogelijk kunnen functioneren als gastheer van *L. pneumophila*.

In de vier kloonbibliotheken van pb Amersfoortseweg hebben 3 (2,2%) van de 133 klonen die clusteren met protozoa de meeste overeenkomst met gastheren van *L. pneumophila* en pathogenen (Zie bijlage II). In de vier kloonbibliotheken van pb Spannenburg hebben 8 (6,6%) van de 120 klonen, die clusteren met protozoa, de meeste overeenkomst met gastheren van *L. pneumophila*. Bij deze berekening zijn de OTU's gebruikt die de meeste overeenkomst hebben met een beschreven gastheer en/of pathogeen. Ook zijn andere soorten die binnen hetzelfde geslacht vallen, als beschreven gastheren van *L. pneumophila* of pathogenen, opgenomen in dit percentage.

Tabel 6.1: Aanwezigheid van beschreven gastheerprotozoa van *L. pneumophila* of pathogenen. Streepjes (-) geven aan dat het geslacht niet is aangetroffen in het monster. * = niet bepaald. RW = reinwater, BF = biofilm, DW = gedistribueerd water. *Naegleria* en *Vahlkampfia* zijn met de toegepaste methode niet detecteerbaar.

Gastheer van <i>L. pneumophila</i>	Pb Amersfoortseweg			Pb Spannenburg			Meeste overeenkomst met	Overeen- komst (%)
	RW	BF	DW	RW	BF	DW		
<i>Acanthamoeba</i>	+	+	-	-	-	-	<i>Acanthamoeba</i> - soorten	Q-PCR 89
	+	-	*	-	-	*		
	+	-	*	-	-	*		
							<i>A. polyphaga</i>	86
							<i>Acanthamoeba</i> - soorten	
<i>Balamuthia</i>	-	-	*	-	-	*	-	-
<i>Echinamoeba</i>	-	-	*	+	-	*	<i>E. therrmarum</i>	86
<i>Hartmannella</i>	+	-	-	+	+	+	<i>H. vermiformis</i>	Q-PCR 78
	-	-	*	-	+	*		
							<i>Hartmannella</i> - soorten	
<i>Tetrahymena</i>	-	-	*	-	-	*	-	-

6.3 Pathogene vrijlevende protozoa

Zoals reeds is vermeld zijn protozoa met de meeste overeenkomst met *Acanthamoeba*-soorten aangetroffen en ook *H. vermiformis*. In hoeverre de aangetroffen soorten daadwerkelijk ziekteverwekkend (kunnen) zijn is niet bekend. Protozoa behorende tot het geslacht *Naegleria* kunnen met de gehanteerde primerset niet worden aangetoond.

7 Schimmels, metazoa en planten

In het reine water en in de biofilms in de distributiesystemen van pb Amersfoortseweg en pb Spannenburg zijn naast protozoa ook andere eukaryoten aangetroffen. Het gaat om schimmels, metazoa, protophyta en meercellige planten. De aangetroffen fyta worden in dit hoofdstuk beschreven.

7.1 Schimmels

In de kloonbibliotheken van het reine water en van de biofilmmonsters zijn klonen aangetroffen met de meeste overeenkomst met een schimmel. Binnen de groep van de schimmels worden ook de gisten gerekend; deze behoren tot de Ascomycota. De aangetroffen sequenties zijn mogelijk afkomstig van sporen. Sporen van schimmels zijn vrijwel overal aanwezig, dus waarschijnlijk ook in het grondwater en in het drinkwater. In totaal zijn 25 OTU's te onderscheiden. De aangetroffen schimmels vallen binnen vier fyta. In bijlage IX is de volledige lijst weergegeven van de OTU's die clusteren met een schimmel met bijbehorende overeenkomst percentages. Twee OTU's zijn niet in te delen op fylumniveau.

7.1.1 Chytridiomycota

De schijnschimmels (Chytridiomycota) behoren tot de meest primitieve soorten onder de schimmels. De wetenschappelijke naam is afgeleid van het Griekse chytridion wat "kleine pot" betekent. De benaming duidt op de structuur waarin de sporen worden bewaard, het sporendoosje of sporangium. Schijnschimmels komen overal op aarde voor. Ze leven op organisch materiaal, zoals insecten, amfibieën, planten en op andere schimmels. De meeste zijn saprofyt en leven in zoetwater. Sommige soorten leven in zuurstofloze omgevingen, bijvoorbeeld in de maag van herkauwers. Twee OTU's hebben de meeste overeenkomst (90%) met een Chytridiomycota. Één OTU heeft de meeste overeenkomst met *Rhizophlyctis rosea* en is aangetroffen in twee biofilmmonsters van pb Amersfoortseweg. De andere OTU is aangetroffen in het reine water van beide pompstations en heeft de meeste overeenkomst met *Triparticalar arcticum*.

7.1.2 Zygomycota

Zygomycota, ook wel lagere schimmels genoemd, vormen vaak een uitgebreid netwerk van draden. De levenscyclus van lagere schimmels bevat een geslachtelijk en een ongeslachtelijk stadium. De geslachtelijke voortplanting vindt plaats doordat twee gametangia (cellen aan het eind van de hyfen) contact met elkaar maken en fuseren in een zygosporie. De ongeslachtelijke voortplanting vindt plaats door middel van sporen. Twee OTU's hebben de meeste overeenkomst met een Zygomycota:

- *Basidiobolus microsporus* (92% overeenkomst) is aangetroffen in het reine water van pb Amersfoortseweg;
- *Zoophagus insidians* (95% overeenkomst) is aangetroffen in de biofilm van pb Amersfoortseweg.

7.1.3 Ascomycota

De Ascomyceten danken hun naam aan de karakteristieke voortplantingsstructuren, de sporezakjes (asci). Ook veel gisten (*Candida*-soorten) worden tot deze groep geteld. De Ascomyceten zijn voor de mens van groot belang, omdat ze enerzijds voor veel ziektes van plant-, dier en mens verantwoordelijk zijn. Anderzijds spelen ze ook een belangrijke rol bij de bereiding van levensmiddelen zoals kaas, brood en bier. Ook worden verschillende antibiotica geproduceerd door deze groep organismen. Zeventien OTU's hebben de meeste overeenkomst met een Ascomycete. Zes (35%) van deze zeventien OTU's hebben de meeste overeenkomst met een pathogene schimmel. Zo zijn OTU's met de meeste overeenkomst met *Aspergillus*-soorten (100% overeenkomst), *Candida*-soorten (84-100%), *Cladosporium*-soorten (100%), en *Fusarium*-soorten (99%) aangetroffen in het reine water en in de biofilm van pb Amersfoortseweg (Zie bijlage IX). In het reine water van pb Spannenburg heeft één OTU de meeste overeenkomst met *Cladosporium*-soorten (100%).

7.1.4 Basidiomycota

Basidiomycota behoren tot de minst primitieve soorten onder de schimmels. De geslachtelijke sporen worden gevormd in een basidium, bestaand uit een knotsvormige cel. Een bijzondere groep van dit fylum vormen de paddenstoelen. Twee OTU's hebben de meeste overeenkomst met een Basidiomycota en hebben veel overeenkomst met de volgende soorten:

- *Cryptococcus*-soort (95%) is aangetroffen in de biofilm van pb Spannenburg. *Cryptococcus*-soorten kunnen infecties bij de mens veroorzaken;
- *Microstroma juglandis* (99%) is aangetroffen in de biofilm van pb Amersfoortseweg.

7.2 Metazoa

7.2.1 OTU's

In totaal hebben 28 OTU's uit het reine water en uit de biofilm van pb Amersfoortseweg en pb Spannenburg de meeste overeenkomst met metazoa, meercellige dierlijke organismen. Het voorkomen van dierlijke organismen in grondwater is afhankelijk van de beschikbaarheid van zuurstof (37). Het grondwater opgepompt bij pb Spannenburg is anaëroob en zal daardoor geen metazoa bevatten. Het grondwater opgepompt bij pb Amersfoortseweg is aëroob en hierin kunnen wel metazoa voorkomen. Echter, het water verblijft voor een zeer lange periode in de grond, waardoor de organismen tijdens de passage door de bodem uit het water gefiltreerd worden. Metazoa worden zelden in hoge aantallen aangetroffen in het grondwater dat de productiebedrijven als grondstof oppompen. Belangrijke immigratieroutes voor metazoa zijn (ventilatie-) openingen zonder horren, waarlangs vooral vliegende insecten maar ook kruipende dierlijke organismen het productiebedrijf kunnen binnendringen. Scheuren in de wanden en de plafonds zijn over het algemeen goede routes voor het binnendringen van organismen die in grond- en oppervlaktewater wonen. Door het optreden van leidingbreuken kunnen organismen ook het distributiesysteem binnendringen (57).

In de kloonbibliotheken van beide reinwatertypen zijn evenveel sequenties ($\pm 24\%$ van de geanalyseerde klonen) aangetroffen die clusteren met metazoa. Maar in de kloonbibliotheek van het reine water van pb Amersfoortseweg zijn minder OTU's (4

OTU's) aangetroffen die clusteren met metazoa dan in het reine water van pb Spannenburg (10 OTU's).

In de kloombibliotheken van twee biofilmmonsters van pb Spannenburg zijn de metazoa zeer dominant aanwezig (meer dan 60% van de klonen clusteren met metazoa). In deze kloombibliotheken zijn twaalf verschillende OTU's aangetroffen. In de kloombibliotheken van de biofilmmonsters van pb Amersfoortseweg hebben de metazoa een zeer klein aandeel (< 7%) en zijn drie OTU's aangetroffen. Vijf OTU's zijn aangetroffen in meerdere monsters. Hiervan zijn drie OTU's aangetroffen in verschillende biofilmmonsters van één van de twee productiebedrijven. Twee OTU's zijn aangetroffen in de kloombibliotheken van beide voorzieningsgebieden.

De OTU's clusteren binnen zes verschillende fyta. Een aantal van deze fyta is eerder aangetroffen in het onderzoek naar dierlijke organismen in systemen voor distributie van drinkwater in Nederland (57). In bijlage X is de volledige lijst weergegeven van de OTU's die clusteren met metazoa met bijbehorende overeenkomstpercentages.

7.2.2 Sponzen

Van de ongeveer 10.000 bekende sponssoorten (Porifera) zijn er slechts enkele die in zoetwater leven. Het overgrote deel leeft in zee, van de pool tot de tropen en van ondiepe poeltjes tot de diepe oceaantroggen. Zij filteren het water en halen daar de benodigde voedingsstoffen uit. Vijf OTU's met de meeste overeenkomst met een spons zijn aangetroffen in het reine water van pb Spannenburg en één OTU is ook aangetroffen in het reine water van pb Amersfoortseweg. De aangetroffen OTU's hebben de meeste overeenkomst met zoetwatersponzen, maar hebben in vergelijking tot de andere OTU's die clusteren binnen de metazoa een lage overeenkomst met beschreven soort.

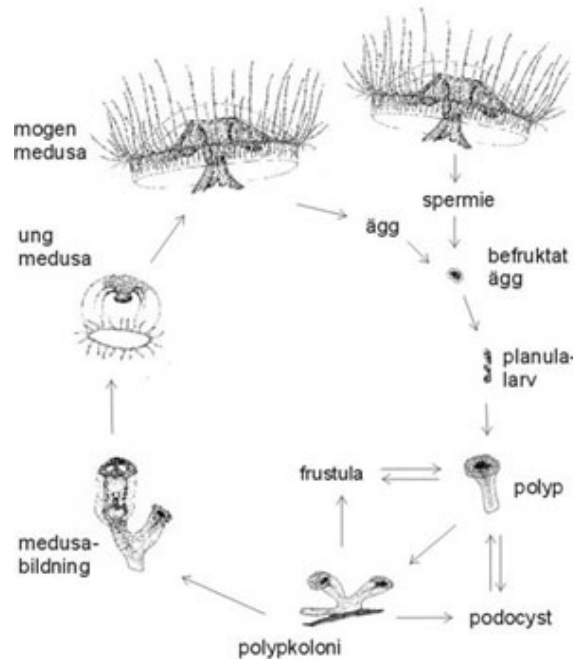
7.2.3 Neteldieren

Acht OTU's uit twee biofilms van pb Spannenburg clusteren binnen de Neteldieren (Cnidaria). Deze OTU's hebben de meeste overeenkomst met de zoetwaterkwal *Craspedacusta sowerbyi* (93-100%) (Figuur 7.1). Het organisme kan twee lichaamsvormen aannemen, een poliepstadium en een medusastadium. In het poliepstadium kan het organisme zich niet bewegen en is het afhankelijk van voedsel dat langs komt. Daarom worden ze alleen aangetroffen in stromend water. Het medusastadium leeft in stilstaand water en kan zich vrij bewegen. Uit onderzoek, uitgevoerd in de jaren 60, bleek dat *C. sowerbyi* vaak is waargenomen in waterleidingsystemen (55). Er werden alleen poliepen aangetroffen. In 2006 is dit organisme drie keer aangetroffen in Nederlands oppervlaktewater, waar het op de bodem voorkwam in het poliepstadium en meer aan het oppervlak in het medusastadium. Voor zover bekend heeft deze zoetwaterkwal geen hinderlijke eigenschappen voor de mens.

7.2.4 Platwormen

Platwormen (Platyhelminthes) hebben een slap en plat lichaam en twee of meer ogen aan de voorzijde bij de kop. Een platworm heeft geen bloed; de huid is zo dun dat zuurstof er doorheen dringt en de organen en de spieren bereikt. De voortbeweging geschiedt met behulp van trilharen en spieren. Twee OTU's met de meeste overeenkomst met *Nematoplana coelogyneporoides* (97%) en *Paracatenula cf. erato* (91,7%) zijn aangetroffen in het reine water van respectievelijk pb Spannenburg en pb Amersfoortseweg. Deze organismen vallen in de *Turbellaria* klasse en hebben afmetingen van 0,5-20 mm. De kleine exemplaren zwemmen met golvende bewegingen; grote exemplaren kruipen met hun trilharen.

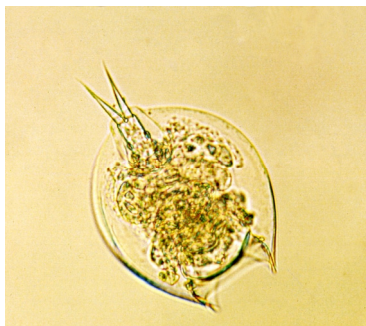
Het zijn rovers en eten o.a. waterpissebedden en borstelwormen. Platwormen zijn eerder aangetroffen in het Nederlandse drinkwater (57).



Figuur 7.1: Levenscyclus van de *Craspedacusta sowerbyi*
Bron: Naturhistoriska riksmuseet (6)

7.2.5 Raderdieren

Ongeveer 1800 soorten behorende tot de Raderdieren (Rotifera) zijn beschreven. Sommige soorten worden overal ter wereld aangetroffen. Veel soorten leven in zoetwater; enkele komen voor in zee water. De lengte van de verschillende soorten varieert tussen de 40 μm en 3 mm. Één OTU aangetroffen in het reine water van pb Amersfoortseweg en in de biofilm van pb Spannenburg heeft de meeste overeenkomst met *Lepadella patella* (100%). Dit is een raderdier dat behoort tot de Monogononta (Figuur 7.2). Deze groep komt voornamelijk zwevend in het water voor (planktonisch). De soorten die eerder in drinkwater zijn aangetroffen behoren meestal tot de planktonische Monogononta (57). In dit onderzoek is ook één OTU aangetroffen in het reine water met 99% overeenkomst met *Lecane leontine*.



Figuur 7.2: *Lepadella patella*
Foto: van Lierverloo 1997



Figuur 7.3: Buikharige
Foto: van Lierverloo 1997

7.2.6 Buikharigen

Buikharigen (Gastroticha) worden vaak aangetroffen in zoetwater en in zoutwater (Figuur 7.3). Enkele soorten leven zowel in zoetwater als in de zee. Meer dan 600 soorten zijn beschreven. De organismen zijn tussen de 65 tot 500 µm lang en eten voornamelijk algen, protozoa en dood organisch materiaal. Buikharigen zijn hermafrodiet. Vier OTU's clusteren met een buikharige en hebben de meeste overeenkomst met *Chaetonotus*-soorten (81-96%) en *Lepidodermella squammata* (96%). Deze OTU's zijn aangetroffen in het reine water en in de biofilm van pb Spannenbrug. *C. neptuni* is eerder aangetroffen in zoutwater, zoals de Middellandse zee. *L. squammata* is een soort die vaak wordt aangetroffen in zoetwatermilieus in Europa (61).

7.2.7 Rondwormen

Rondwormen (Nematoda) vormen een grote groep van meer dan 25.000 beschreven soorten die algemeen voorkomen. Ook de bekende 'aaltjes' behoren tot de rondwormen. Veel rondwormen leven in de bodem van dood organisch materiaal. Drie OTU's aangetroffen in de kloonbibliotheken van het reine water van pb Amersfoortseweg en pb Spannenburg en in de biofilm van pb Spannenburg hebben de meeste overeenkomst met *Rhabdolaimus terrestris* (85-99%). Deze soort wordt voornamelijk aangetroffen in zoetwatermeren en kan een lengte van 300 µm bereiken.

7.2.8 Ringwormen

De ringwormen (Annelida) vormen een groot fylum binnen het dierenrijk waartoe de gesegmenteerde wormen behoren. Er zijn ongeveer 15.000 soorten beschreven, waaronder de bekende regenwormen en de bloedzuigers. Ringwormen komen voornamelijk voor in natte omgevingen. Er zijn land-, zoetwater- en in het bijzonder vele zoutwatersoorten. In lengte variëren de ringwormen van minder dan één millimeter tot 3 meter lang. Één OTU heeft de meeste overeenkomst met *Buchholzia fallax* (97%) en is aangetroffen in het reine water van pb Spannenburg. *Buchholzia fallax* behoort tot de onderklasse van Oligochaeta. Deze groep omvat de aardwormen en veel soorten die in zoetwater leven. Ringwormen zijn vaker aangetroffen in het Nederlandse drinkwater (57).

7.2.9 Geleedpotigen

Geleedpotigen (Arthropoda) zijn dieren met een uitwendig skelet van chitine, eventueel versterkt met calciumcarbonaat, waarvan de poten een aantal gewrichten hebben. Ze vormen het grootste fylum van het dierenrijk en komen in alle leefomgevingen (land, zoetwater en zeewater) voor. Drie OTU's hebben de meeste overeenkomst met een geleedpotige. Één OTU is aangetroffen in de biofilm van pb Spannenburg en twee OTU's zijn aangetroffen in de biofilm van pb Amersfoortseweg. In de beide distributiesystemen is één OTU aangetroffen met de meeste overeenkomst met roeipootkreeftjes namelijk met *Cyclopidae*-soorten (98%) en *Bryocamptus pygmaeus* (95%). Deze zijn in voorgaand onderzoek ook aangetroffen (57). *Cyclopidae*-soorten behoren tot de Cyclopodidea, deze organismen schieten met snelle bewegingen over het sediment. *Bryocamptus* behoren tot de orde van *Harpacticoidea*, deze lopen over en tussen de sedimentdeeltjes door. Één OTU, aangetroffen in de biofilm van pb Amersfoortseweg, heeft de meeste overeenkomst met de kever *Diplochaetus planatus* (98%). Deze kever (Coleoptera) behoort tot Adaphaga; dit zijn meestal jagers en vleeseters. Insecten zijn vaker aangetroffen in het Nederlandse drinkwater (57).

7.3 Protophyta en meercellige planten

In de huidige systematiek worden protophyta niet tot het plantenrijk gerekend, maar tot de protisten. In dit onderzoek worden de protophyta en de meercellige planten gezamenlijk beschreven, omdat veel protophyta-soorten ook licht als energiebron gebruiken, evenals meercellige planten. Groei van meercellige planten in het reine water en de biofilm in de leidingen is niet mogelijk. De zuiveringsstappen bij beide productiebedrijven vinden voornamelijk in het donker plaats en bij de biofilm uit het distributiesysteem komt ook geen licht. De aangetroffen protophyta en planten zijn mogelijk net als metazoa via openingen in de reinwaterkelder of het distributiesysteem binnen gekomen.

Vier OTU's clusteren met een protophyt binnen de Cryptophyta. Dit is een kleine groep flagellaten, waarvan vele soorten mixotroof zijn. Deze organismen kunnen licht gebruiken als energiebron, maar ook kunnen deze organismen anorganische verbindingen gebruiken om aan energie te komen. Dit laatste wordt meestal alleen bij gebrek aan licht gedaan, omdat dit meer energie kost. De Cryptophyta groep is algemeen voorkomend in zoetwater, maar komt ook voor in brakwater en zeewater. De cel is tussen 10 - 50 μm groot. De Cryptophyta is een zeer diverse groep. De indeling van deze organismen is complex en omdat dit onderzoek zich richt op protozoa wordt er niet in detail op de indeling van protophyta ingegaan.

Één OTU, aangetroffen in de biofilm van pb Amersfoortseweg en pb Spannenburg, heeft de meeste overeenkomst met de meercellige plant *Triticum aestivum* (99,4%). Dit is de meest verbouwde tarwesoort ter wereld. Deze OTU is mogelijk uit pollen geïsoleerd, die net als schimmelsporen overal aanwezig zijn.

8 Discussie

8.1 Universele eukaryotenprimerset

Het in dit rapport beschreven onderzoek had tot doel het opsporen en identificeren van vrijlevende protozoa in twee drinkwatertypen. Universele primersets voor protozoa zijn niet beschikbaar en door de diversiteit binnen de protozogroep was het niet mogelijk om deze zelf te ontwikkelen. Daarom is gebruik gemaakt van universele primers die specifiek zijn voor eukaryoten. Alle geïdentificeerde 18S rRNA-gen fragmenten bleken inderdaad de meeste overeenkomst te vertonen met een eukaryoot. Vijftig procent van de geanalyseerde klonen clustert met protozoa. Zesendertig procent van de klonen clustert met schimmels, metazoa en planten. Deze informatie is een aanvulling op eerder uitgevoerd onderzoek (57). Achttien procent van de DNA-sequenties heeft een overeenkomst lager dan 75% met beschreven eukaryoten, waardoor de identificatie onbetrouwbaar is en deze sequenties zijn daarom niet verder ingedeeld.

Met de gebruikte primerset kunnen soorten binnen de geslachten *Naegleria* en *Vahlkampfia* niet worden gedetecteerd, omdat de eukaryotenprimers te veel mismatches hebben met het 18S rRNA-gen van deze organismen. Vier soorten van het *Naegleria*-geslacht en één soort binnen het *Vahlkampfia*-geslacht staan bekend als gastheer van *L. pneumophila*. Daarnaast kunnen niet alle eukaryoten (inclusief protozoa) worden gedetecteerd met de gebruikte primerset. De kloonbibliotheken geven dus mogelijk een onvolledig beeld van de dominante eukaryoten in de gemeenschap. Werkelijke universele eukaryotenprimers zijn niet beschikbaar en met de bestaande database ook niet te maken. Door de gebruikte eukaryotenprimerset aan te vullen met primersets van het *Naegleria*-en het *Vahlkampfia*-geslacht kunnen alle beschreven gastheren van *L. pneumophila* worden gedetecteerd. Momenteel zijn nog geen goed werkende primersets beschreven voor het gehele geslacht van *Naegleria*, maar wel specifiek voor de pathogene *N. fowleri* (40). Deze soort staat ook bekend als gastheer van *L. pneumophila*, daarnaast zijn er nog drie soorten binnen het *Naegleria*-geslacht die als gastheer van *L. pneumophila* kunnen dienen. Voor het *Vahlkampfia*-geslacht zijn ook nog geen primers beschikbaar. Voor *Vahlkampfiid*-typen, zoals *Acanthamoeba*-, *Naegleria*- en *Vahlkampfia*-soorten is een primerset ontwikkeld (16).

Een aantal *Naegleria*-soorten is zeer pathogeen en het werken met deze organismen vereist dus specifieke vaardigheden en werkomstandigheden (62). Op het laboratorium waar de analyses zijn uitgevoerd zijn deze vaardigheden en werkomstandigheden niet beschikbaar.

8.2 Identificatie van eukaryoten

Alle 545 DNA-sequenties zijn ingedeeld in OTU's op basis van 99% overeenkomst. Mogelijke amplificatie- en sequentiefouten (<1%) worden met deze werkwijze niet meegenomen bij de identificatie van de eukaryoten. Voor de identificatie van de eukaryoten is in dit onderzoek een DNA-fragment van ± 550 basenparen (bp)

geanalyseerd van het 18S rRNA-gen dat in totaal 1900 bp bevat. Bij deze identificatie is dus niet het volledige 18S rRNA-gen geanalyseerd en een vergelijking met volledig geanalyseerde 18S rRNA-genen uit de database kan een incompleet beeld geven. Het is onbekend bij welk percentage van overeenkomst sequenties tot dezelfde soort behoren in het domein van de eukaryoten (9, 51). Het percentage van overeenkomst tussen sequenties is een maat voor de verwantschap tussen de betreffende OTU en beschreven organismen in de database. Veel OTU's die clusteren met protozoa verschillen meer dan 20% op nucleotide-niveau met beschreven sequenties. Deze "geringe" overeenkomst met vrijlevende protozoa uit zoetwater is eerder beschreven (51). Ciliaten uit zoutwater ingedeeld in dezelfde soort of geslacht op basis van morfologische eigenschappen kunnen op 18S rRNA-gen niveau onderling sterk verschillen (27). Waarschijnlijk geldt dit ook voor protozoa die leven in zoetwater.

Tabel 8.1: Minimum percentages van overeenkomst tussen beschreven protozosoorten en protozogeslachten. Hierbij is een vergelijking gemaakt met verkregen sequenties uit dit onderzoek. Deze sequenties hebben de meeste overeenkomst met een geslacht waarbinnen gastheren van *L. pneumophila* vallen of met geslachten waarmee veel klonen de meeste overeenkomst hebben. Streepjes (-) geven aan dat maar één sequentie van een soort aanwezig is in de database waardoor onderlinge vergelijking niet mogelijk is.

Sequenties in database	Aantal sequenties	Minimale overeenkomst		
		Binnen de soort (%)	Binnen het geslacht (%)	Met sequenties uit dit onderzoek (%)
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Soort: 11	91,4		80 - 90
<i>Bodo saltans</i>	Geslacht: 154		78,4	
	Soort: 23	86,6		93 - 95
	Geslacht: 28		82,8	
<i>Cercomonas longicauda</i>	Soort: 3	98,2		93 - 96
	Geslacht: 14		80,9	
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	Soort: 5	98,4		78
	Geslacht: 88		79,4	
<i>Echinamoeba exundans</i>	Soort: 1	-		86
	Geslacht: 9		85,2	
<i>Echinamoeba thermanum</i>	Soort: 8	91,8		86
	Geslacht: 9	-	85,2	
<i>Hartmannella vermiformis</i>	Soort: 14	98,5		-
	Geslacht: 15		76,5	
<i>Monosiga ovata</i>	Soort: 3	99,7		89 - 94
	Geslacht: 5		89,5	
<i>Saccamoeba limax</i>	Soort: 1	-		77-79
	Geslacht: 1		-	
<i>Vorticella campamila</i>	Soort: 1	-		90 - 98
	Geslacht: 6		91,9	

Bij het vergelijken van 11 sequenties van *Acanthamoeba polyphaga* uit de database komt naar voren dat sequenties binnen deze soort voor minimaal 91% overeenkomen (Tabel 8.1). Bij *Hartmannella vermiformis* is de overeenkomst hoger (98,5%). De onderlinge verwantschap binnen beschreven protozosoorten verschilt mogelijk per soort. Op geslachtsniveau liggen de minimale verwantschappen tussen 76% en 91%. Hierdoor kunnen bepaalde sequenties mogelijk wel tot op geslachtsniveau worden ingedeeld.

De sequenties die clusteren met protozoa hebben een overeenkomst tussen 75% en 99% met beschreven soorten. In dit onderzoek zijn nieuwe sequenties binnen beschreven

protozosoorten en protozogeslachten aangetroffen. Mogelijk behoort een aantal aangetroffen sequenties tot nog niet beschreven geslachten of soorten. Dit is echter niet vast te stellen omdat soort- en geslachtgrenzen waarschijnlijk per protozo verschillen en hierover zeer weinig informatie beschikbaar is. De aangetroffen sequenties zijn een nuttige aanvulling op bestaande databases. Hiermee zal het in de toekomst eenvoudiger worden om sequenties van protozoa te identificeren op geslacht- of soortniveau.

Achttien procent van de sequenties heeft minder dan 75% overeenkomst met beschreven sequenties in de ARB-database en valt buiten het minimale percentage van overeenkomst op geslachteniveau. Daarnaast zijn deze sequenties zeer moeilijk in te delen, omdat er geen vergelijkende sequenties aanwezig zijn. Daarom zijn de sequenties aangeduid met onbekend.

8.3 Eukaryoten in het reine water en in de biofilm

Alle klonen zijn ingedeeld in OTU's omdat de soortgrens binnen de protozogroep onbekend is (Zie paragraaf 8.2) (21). In totaal zijn 545 18S rRNA-gen sequenties geanalyseerd waarbij 219 OTU's zijn aangetroffen op basis van 99% onderlinge overeenkomst (Tabel 5.1). Op basis van 97% overeenkomst zijn 179 OTU's aangetroffen. In een vergelijkbaar onderzoek waarbij de eukaryotische diversiteit is bepaald in water en sediment uit twee zoetwatermeren in Frankrijk zijn 377 18S rRNA-gen sequenties geanalyseerd (met andere primers dan in dit onderzoek). Hierbij zijn 83 OTU's te onderscheiden op basis van 97% overeenkomst (51). Met deze getallen is de Coverage index bepaald (23). Deze index geeft net zoals een Rarefactioncurve de verhouding weer tussen het aantal geanalyseerde klonen en het aantal verschillende OTU's. De Coverage index van de OTU's in het onderzoek beschreven in dit rapport komt op 67% (bij 97% overeenkomst) en in het onderzoek in de twee verschillende meren in Frankrijk is de Coverage index 78%. Het is niet duidelijk welk deel van de monsters van de Franse meren gebruikt is voor het maken van de kloonbibliotheken. Hierdoor is het niet mogelijk om de diversiteit van de sequenties in de kloonbibliotheken van de Franse meren te vergelijken met de diversiteit in de kloonbibliotheken van beide onderzochte productiebedrijven. Het is ook niet mogelijk om een uitspraak te doen of de eukaryotische diversiteit in beide productiebedrijven hoog of juist laag is vergeleken andere watertypen.

De diversiteit van de sequenties in de kloonbibliotheek kan niet rechtstreeks vertaald worden naar diversiteit van organismen in het monster. Dit verschil tussen de diversiteit van de organismen in het monster en de diversiteit in de kloonbibliotheek wordt beïnvloed door drie factoren:

1. **Detectie van meercellige organismen.** In dit onderzoek is gebruik gemaakt van een deel van het 18S rRNA-gen dat in iedere eukaryotische cel aanwezig is. Hiermee kunnen eencellige en meercellige organismen gedetecteerd worden. In iedere cel is het 18S rRNA-gen aanwezig, dus zal één meercellig organisme domineren over één eencellig organisme in de kloonbibliotheek (51). Hierdoor kan een groot verschil ontstaan tussen de diversiteit in de kloonbibliotheek en het oorspronkelijke monster. In de biofilmmonsters BF-S5 en BF-S6 is een zoetwaterkwal aangetroffen en dit organisme domineert (> 60%) in de kloonbibliotheken (Tabel 4.5).
2. **De kopie-aantallen van het 18S rRNA-gen op het genoom verschillen per soort.** Verschillende soorten protozoa hebben verschillende aantallen kopieën van het

18S rRNA-gen op het totale genoom, waardoor een scheve verhouding ontstaat in de kloombibliotheek. Één *Hartmannella vermiformis* cel heeft ongeveer 1300 kopieën (31) en in *Acanthamoeba*-soorten zijn ongeveer 600 kopieën per cel aanwezig (11). Tussen deze twee organismen zal ongeveer een factor twee verschil zichtbaar worden in een kloombibliotheek. Mogelijk hebben andere protozoa een veel lager kopie-aantal, waardoor deze organismen niet zijn aangetroffen in de kloombibliotheken, maar in even grote aantallen aanwezig waren in de monsters als andere protozoa. Iedere kopie op het 18S rRNA-gen wordt tijdens de PCR reactie geamplificeert en kan ligeren aan een plasmide. Dus meerdere kopieën uit één cel kunnen in verschillende klonen terecht zijn gekomen.

3. **Dominantie van enkele soorten in het monster.** Als in een monster bepaalde soorten zeer dominant en andere soorten minder dominant zijn, zal de diversiteit van de kloombibliotheek laag zijn. Als in een ander monster een net zo grote diversiteit aanwezig is, maar alle soorten in gelijke aantallen vertegenwoordigd zijn, dan zal de diversiteit in de kloombibliotheek hoger zijn dan in het monster met evenveel soorten, waarvan enkele soorten dominant zijn. Dit geldt alleen als van beide monsters een gelijke hoeveelheid klonen wordt geanalyseerd.

Een mogelijk voorbeeld hiervan is aangetroffen in de kloombibliotheek van biofilmmonster BF-A7. In deze kloombibliotheek domineert één OTU (50% van de sequenties) met de meeste overeenkomst met een *Dodonomorpha*-soort. Mogelijk is de eukaryotische diversiteit in BF-A7 even groot als in de andere biofilmmonsters uit hetzelfde voorzieningsgebied, maar is dat niet zichtbaar in de kloombibliotheek omdat één protozo domineert.

Door deze drie factoren is de eukaryotische diversiteit zoals bepaald met de kloombibliotheken onderschat. Dominante sequenties zijn aangetroffen, maar in het oorspronkelijke monster zullen meer verschillende sequenties aanwezig zijn. De Rarefractioncurves van alle kloombibliotheken lopen namelijk nog niet horizontaal wat laat zien dat meer klonen nieuwe sequenties zullen opleveren.

8.4 Gastheerprotozoa van *Legionella pneumophila* en pathogene protozoa

Hartmannella vermiformis is aangetroffen in het reine water van beide productiebedrijven en in één biofilmmonster in het distributiesysteem van pb Spannenburg. *H. vermiformis* is ook aangetroffen in het gedistribueerde water van pb Spannenburg. De concentratie van *H. vermiformis* in het gedistribueerde water was in de zomer (12,3 - 17,1°C) significant hoger dan in de herfst (11,5 - 13,5°C). Nader onderzoek aan de monsters van het gedistribueerde water is nodig om te bepalen of *H. vermiformis* een dominante protozo was in de gemeenschap van protozoa of dat de totale gemeenschap van protozoa in de zomer groter was dan in de herfst. Mogelijk versterkt een hogere temperatuur de groei van prooibacteriën voor *H. vermiformis*, waardoor de concentratie van *H. vermiformis* toeneemt in de zomer ten opzichte van de concentratie in de herfst. De ATP-concentraties, een maatstaf voor celactiviteit, zijn alleen niet hoger in de zomer dan in de herfst.

Acanthamoeba-soorten zijn aangetoond in één reinwater- en één biofilmmonster van pb Amersfoortseweg. In het voorzieningsgebied van pb Spannenburg zijn geen *Acanthamoeba*-soorten aangetroffen.

H. vermiformis en *Acanthamoeba*-soorten zijn geen dominante protozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg en pb Spannenburg. In totaal clustert 4,3% van de aangetroffen protozosequenties met beschreven gastheren van *L. pneumophila*. Maar soorten behorende tot de geslachten *Naegleria* en *Vahlkampfia* konden niet worden aangetoond met de gebruikte primers (Zie paragraaf 8.1). Dit is mogelijk ook het geval voor andere, nog niet beschreven gastheerprotozoa van *L. pneumophila*. Daarnaast, het is onbekend of de protozoa met de aangetroffen sequenties daadwerkelijk als gastheer van *L. pneumophila* kunnen dienen.

L. pneumophila groeit bij temperaturen tussen 20 en 43°C (29, 41, 60). De temperatuur van het reine water, het gedistribueerde water en de biofilm die in dit onderzoek zijn geanalyseerd was onder 19°C, dus groei van *L. pneumophila* in de gastheren was zeer waarschijnlijk niet mogelijk. Als de temperatuur in het distributiesysteem toeneemt, zijn er potentiële gastheren van *L. pneumophila* aanwezig die groei van eventueel aanwezige *L. pneumophila* kunnen bevorderen. Andere *Legionella*-soorten dan *L. pneumophila* gebruiken mogelijk andere protozoa als gastheer (63). Deze protozoa zijn waarschijnlijk geïdentificeerd in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem van beide productiebedrijven. Deze geïdentificeerde protozosequenties kunnen als basis dienen voor vervolgonderzoek.

In het reine water en in de biofilm van pb Amersfoortseweg zijn sequenties aangetroffen die verwantschap vertonen met pathogene vrijlevende protozosoorten. Het gaat om 2,3% van de protozosequenties aangetroffen in het voorzieningsgebied van pb Amersfoortseweg; deze clusteren met *Acanthamoeba*-soorten. Het is echter onduidelijk of protozoa met de aangetroffen sequenties daadwerkelijk infecties bij de mens kunnen veroorzaken.

Naegleria-soorten konden niet worden aangetoond met gehanteerde primerset, dus over aan- of afwezigheid van deze soorten kan geen harde uitspraak worden gedaan. Wel kan worden gesteld dat aanwezigheid van de pathogene *Naegleria fowleri* zeer onwaarschijnlijk is omdat dit organisme erg traag groeit bij temperaturen tussen 20°C à 25°C en optimaal groeit bij 37°C (24).

8.5 Betekenis van de schimmels, metazoa en planten in het drinkwater

Vier OTU's hebben een zeer hoog percentage van overeenkomst (>99%) met beschreven pathogene schimmels, namelijk met *Aspergillus versicolor*, *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides* en *Fusarium oxysporium*. Een aantal van deze schimmels is ook aangetroffen in het drinkwater van Slowakije, Noorwegen en Duitsland (22). Verschillende soorten, zoals *Aspergillus*-soorten en *Penicillium*-soorten kunnen waarschijnlijk groeien in de biofilm of in het sediment in het distributiesysteem (25). Studies hebben aangetoond dat schimmels uit het drinkwater infecties of allergieën kunnen veroorzaken bij patiënten met een verminderd afweersysteem (56). Nader onderzoek naar voorkomen en betekenis van pathogene schimmels in het drinkwater is nodig om te beoordelen of aan deze organismen nadere aandacht moet worden besteed (56). In Nederland worden geen standaardanalyses uitgevoerd om de concentratie van schimmels in drinkwater te bepalen.

Geen van de OTU's met de meeste overeenkomst met een metazo staat bekend als menspathogeen. Wel associëren veel mensen metazoa met onhygiënische omstandigheden en moet voorkómen worden dat deze organismen zichtbaar in het

drinkwater aanwezig zijn. Hoge aantallen organismen kunnen ook smaak- en reukklachten en verstoppingen van installaties veroorzaken. Daarom zijn deze organismen ongewenst in het drinkwater.

Geen van de aangetroffen protophyta en meercellige planten staat bekend als pathogeen. Algen kunnen smaak- en geurklachten veroorzaken; daarnaast kunnen sommige algen toxische stoffen uitscheiden. Dergelijke algen zijn niet aangetroffen bij beide productiebedrijven. Groei van deze organismen is alleen mogelijk als er licht aanwezig is. Tijdens de zuivering zijn er momenten dat het licht aan is, waardoor groei van algen mogelijk is. De distributie van het water vindt plaats in het donker, dus daar is geen groei van algen mogelijk.

Vier OTU's clusteren met een protophyta binnen de Cryptophyta. Dit is een kleine groep flagellaten, waarvan vele soorten mixotroof zijn en dus anorganische verbindingen kunnen gebruiken om aan energie te komen. De Cryptophyta is een zeer diverse groep. De indeling van deze organismen is complex en omdat dit onderzoek zich richt op protozoa wordt er niet in detail op de indeling van protophyta ingegaan.

8.6 Relatie tussen de watersamenstelling en het voorkomen van protozoa in de beide drinkwatertypen

Protozoa eten bacteriën, algen, schimmels en andere protozoa (10, 38, 58). Groei van bacteriën en algen wordt beïnvloed door de watersamenstelling en deze organismen beïnvloeden de groei en samenstelling van de gemeenschap van protozoa. Daarnaast hebben factoren als temperatuur, concentratie afbreekbare stof in het substraat en snelheid waarmee het water door de leidingen stroomt ook invloed op de samenstelling van de gemeenschap van protozoa (41). Het bepalen van de relatie tussen het voorkomen van protozoa en de watersamenstelling is zeer lastig om de volgende redenen:

- De gemeenschappen van protozoa zijn zeer divers;
- De soortgrenzen en geslachtsgrenzen bij protozoa zijn onbekend;
- Informatie over de omgevingseisen van protozoa is zeer beperkt;
- De diversiteit in de kloonbibliotheek kan niet rechtstreeks vertaald worden naar diversiteit in het monster.

De aangetroffen gemeenschappen van protozoa zullen daarom op drie niveau's vergeleken worden met gepubliceerd onderzoek, om te bepalen of het mogelijk is een relatie te leggen tussen de watersamenstelling en het voorkomen van protozoa. De aangetroffen protozoa worden op gemeenschapniveau vergeleken. Hierbij wordt naar aantallen, diversiteit en aanwezigheid van verschillende fyta gekeken. Daarnaast zijn protozoa in voorgaande onderzoeken naar de waterkwaliteit vaak ingedeeld in drie morfologische groepen. Daarom zijn de aangetroffen sequenties, na de identificatie, ook ingedeeld in deze drie groepen. Protozosoorten kunnen als bio-indicator dienen. Ook op soortniveau is daarom naar de aangetroffen protozoa gekeken om een relatie te leggen tussen de waterkwaliteit en het voorkomen van protozoa.

8.6.1 Relatie tussen de watersamenstelling en aantallen en aard van de aanwezige vrijlevende protozoa

De watersamenstelling en de watertemperatuur beïnvloeden het aantal protozoa per liter water en per oppervlak in de biofilm. Verschillende studies met microscopisch

onderzoek laten zien dat protozoa in een distributiesysteem concentraties kunnen bereiken tussen de 5×10^4 tot 7×10^5 cellen per liter en 10^3 cellen per cm^2 (11, 56, 57). In het onderzoek beschreven in dit rapport kan de concentratie van het aantal protozoa per liter van het reine water of per biofilmoppervlak niet worden afgeleid met de gebruikte methode (paragraaf 8.3). De minimale concentratie van OTU's die clusteren met protozoa in het reine water van pb Amersfoortseweg was 25 per 1,5 liter en was 43 per 1,5 liter in het reine water van pb Spannenburg. De Rarefactioncurve van de klonen die clusteren met protozoa van pb Amersfoortseweg loopt minder steil dan de curve van de kloombibliotheek van pb Spannenburg. Mogelijk is de diversiteit van protozoa in het reine water van pb Amersfoortseweg kleiner dan in het reine water van pb Spannenburg.

Volgens Jiang geeft een diversiteitindex van protozoa een goede afspiegeling van de waterkwaliteit van oppervlaktewater (26). Hoe hoger de diversiteitindex is des te beter is de waterkwaliteit (34). De theorie van Jiang, dat de diversiteit aan protozoa gerelateerd is aan waterkwaliteit, kan niet worden geverifieerd met de gegevens verkregen uit dit onderzoek, omdat de diversiteit in de kloombibliotheken niet rechtstreeks vertaald kan worden naar diversiteit in de monsters (zie paragraaf 8.3). Daarnaast is het onderzoek van Jiang uitgevoerd in oppervlaktewater. De samenstelling, zoals het aantal deeltjes en de hoeveelheid algen van drinkwater is anders dan van oppervlaktewater. Hierdoor is ook de microbiologische diversiteit niet onderling te vergelijken. Mogelijk beïnvloedt de watersamenstelling het voorkomen van protozoa op fyllumniveau. Voor zover bekend is weinig gepubliceerd over de relatie tussen de samenstelling van het water en de diversiteit van protozoa op fyllumniveau en zijn er geen specifieke omgevingseisen aan een fyllum van protozoa toegekend.

8.6.2 Relatie tussen de watersamenstelling en het voorkomen van morfologische groepen van protozoa

In onderzoeken naar de relatie tussen de watersamenstelling en het voorkomen van protozoa, zijn de protozoa ingedeeld op basis van morfologische eigenschappen (amoeben, flagellaten en ciliaten) (38). De in dit onderzoek aangetroffen organismen zijn ook ingedeeld in deze drie groepen (Tabel 8.2). In de kloombibliotheken van beide reinwater-typen zijn de flagellaten dominant.

Tabel 8.2: Verdeling van sequenties (percentage van gemeenschap van protozoa) en OTU's over de drie morfologische protozogroepen per type monster

Herkomst monster	Amoeben		Ciliaten		Flagellaten		Totaal	
	Aantal	%	Aantal	%	Aantal	%	Aantal	%
	OTU's	OTU's	OTU's	OTU's	OTU's	OTU's	OTU's	OTU's
RW A-weg	2	8	3	12	20	80	25	100
BF A-weg	4	13	1	3	25	83	29	100
RW S-burg	2	5	12	28	29	67	43	100
BF S-burg	2	6	15	48	14	45	31	100

In een experimenteel distributiesysteem van inwendig gecementeerde gietijzeren leidingen en PVC, dat werd gevoed met drinkwater (gezuiverd met nanofiltratie) in Nancy (Frankrijk), is de samenstelling van de gemeenschap van protozoa bepaald met behulp van microscopische technieken. Het systeem is gedurende 4 maanden gevoed met drinkwater met een DOC-gehalte (opgeloste organische stof) van 2,3 mg koolstof/l. In het gedistribueerde water domineerden de flagellaten (93%), terwijl

amoeben (2,7%) en ciliaten (1,8%) een laag percentage in de gemeenschap van protozoa vormden (48). In de biofilm van dit systeem zijn echter geen flagellaten aangetroffen, maar alleen ciliaten (52%) en amoeben (48%). In het onderzoek beschreven in dit rapport zijn OTU's die clusteren met flagellaten dominant aanwezig in de kloonbibliotheken van beide reinwatertypes en biofilmmonsters (Tabel 8.2).

Microscopische onderzoek in actief slib en afvalwater laat zien dat de diversiteit aan ciliaten afneemt naarmate het water meer organische stof bevat (44). In de kloonbibliotheken van het reine water en in de biofilms van pb Amersfoortseweg zijn minder verschillende OTU's aangetroffen dan in het reine water en in de biofilms van pb Spannenburg. Het reine water van pb Spannenburg bevat een hogere concentratie organische stof dan het reine water van pb Amersfoortseweg. De resultaten van verschillende studies bevestigen dat de gemeenschappen van protozoa in verschillende systemen sterk kunnen variëren.


In het reine water en in de biofilm van beide productiebedrijven zijn verschillende gemeenschappen van protozoa aangetroffen. Protozoa leven planktonisch (in het water) of in de biofilm, afhankelijk van het type organisme. Hierdoor kan gedeeltelijk verklaard worden dat een andere gemeenschap van protozoa wordt aangetroffen in het reine water dan in de biofilm in het distributiesysteem. Maar niet alle protozoa die aangetroffen zijn in het reine water, zijn planktonische organismen. Verschillende typen zijn waarschijnlijk uitgespoeld uit de biofilm van een langzaam zandfilter van pb Spannenburg of een marmerfilter van pb Amersfoortseweg. Uit microscopisch onderzoek in langzame zandfilters is gebleken dat de samenstelling en de grootte van protozoa mogelijk afhangt van de samenstelling van het filtermateriaal (17). Ander onderzoek spreekt dit weer tegen, omdat op gelijke zandfilters grote verschillen in aantallen en soorten ciliaten zijn aangetroffen (33). Waarschijnlijk speelt de frequentie van reinigen van het filter een grotere rol bij het vormen van de biomassa op een filter en ook op de samenstelling van ciliaten (33). Bij het reinigen van de filters wordt de biomassa van de filters verwijderd en de nieuwe aangroei van biomassa wordt beïnvloed door de watersamenstelling.

Over de relatie tussen voorkomen van flagellaten en amoeben en de watersamenstelling is minder bekend dan over de relatie tussen de watersamenstelling en het voorkomen van ciliaten. De drie protozogroepen voeden en bewegen op verschillende wijzen, waardoor de onderzoeksresultaten van ciliaten niet vertaald kunnen worden naar het voorkomen van amoeben en flagellaten in relatie tot de watersamenstelling.

8.6.3 Saprobie-index

Gemeenschappen van protozoa reageren snel op veranderingen in de omgeving. Protozosoorten zijn daarom vaak gebruikt als bio-indicator om zoetwatertypen in te delen in de saprobie-index. Dit is een indeling van watertypen op basis van concentraties van organische stof (35-37, 42, 59). Ieder organisme kan gebruikt worden als indicator, mits globaal bekend is welke omgevingseisen het organisme heeft. Vervolgens wordt bepaald of het indicatororganisme aanwezig of afwezig. Zo kan bepaald worden op welk saprobie-niveau het water zich bevindt (49). Dit systeem is voornamelijk gebruikt voor oppervlaktewater. Over de saprobie-indexen van het Nederlandse water is weinig gepubliceerd (53). Mogelijk kan deze typering van waterkwaliteit ook gebruikt worden voor drinkwater.

Er zijn meerdere indelingen gemaakt van de waterkwaliteit met behulp van de indicatororganismen. Een indeling is gemaakt op zes niveau's met oplopende concentratie van organische stof in het water en afname van de zuurstofconcentratie (50):

- | | | |
|---|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Xenosaprobie 2. Oligosaprobie 3. Beta-mesosaprobie 4. Alfa-mesosaprobie 5. Polysaprobie 6. Metasaprobie |  | <p>Toename concentratie van organische stof</p> <p>Afname concentratie van zuurstof</p> |
|---|---|---|

Negentien van de protozoeslachten die zijn aangetroffen in het reine water en in de biofilm bij beide productiebedrijven zijn beschreven als indicatororganismen. Het gaat vooral om ciliaten en enkele flagellaten. Veertien OTU's van pb Amersfoortseweg en vijftiwintig OTU's van pb Spannenburg hebben de meeste overeenkomst met beschreven indicatororganismen die kenmerkend zijn voor alfa- en/of beta-mesosaprobie. Deze kwaliteitsklassen staan voor middelmatige verontreinigd met organische stof en met een hoog gehalte aan zuurstof. Verschillende geslachten die binnen het mesosaprobie-niveau zijn aangetroffen zijn; *Bodo* (94-95% overeenkomst), *Desmarella* (93%), *Heliophrya* (85%), *Hemiophrys* (92-98%), *Rhynchomonas* (98%) en *Vorticella* (91-95%) (24, 59).

De protozoa die zijn aangetroffen in het reine water en in de biofilms in de distributiesystemen van pb Amersfoortseweg vallen in dezelfde kwaliteitsklassen (trofiegraad) als de protozoa van pb Spannenburg, ondanks het relatief grote verschil tussen de NOM-gehaltenes van de beide drinkwatertypen. De gemeenschappen van protozoa zijn in beide reinwatertypen en in de biofilms uit het distributiesysteem zijn zeer divers. Informatie over de specifieke condities die de groei van deze organismen bevorderen ontbreekt en het daarom niet mogelijk om een relatie te leggen tussen de aangetroffen protozoa en de watersamenstelling. Een aanpak die wel veelbelovend lijkt is de kwantitatieve detectie van bepaalde soorten vrijlevende protozoa, bijvoorbeeld *H. vermiformis*. Uit het onderzoek kwam naar voren dat deze organismen in de zomer in relatief hoge aantallen aanwezig waren in het water afkomstig van pb Spannenburg. Duidelijk is dat ook de omgevingstemperatuur van invloed is op de groei van vrijlevende protozoa. Daarom zal verder onderzoek zich onder meer richten op de aanwezigheid en identiteit van gastheerprotozoa van *L. pneumophila* en pathogene vrijlevende protozoa in leidingwater met een temperatuur boven 25°C.

9 Conclusies en aanbevelingen

9.1 Conclusies

Het hoofddoel van dit onderzoek was om de gemeenschap van vrijlevende protozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem bij twee verschillende drinkwatertypen te identificeren. Het is niet mogelijk om alle protozoa selectief te amplificeren met de beschikbare moleculaire technieken en daarom is de gehele gemeenschap van eukaryoten geanalyseerd.

- In alle monsters van drinkwater en biofilm is een grote eukaryotische diversiteit aangetroffen;
- De diversiteit van eukaryoten, bepaald met de T-RFLP-techniek en met kloonbibliotheken, geven een onderschatting van de werkelijke diversiteit in het monster, maar geven wel informatie over de dominante organismen.
- Kwantitatieve uitspraken over de diversiteit van de eukaryoten kunnen niet worden gedaan, omdat (i) het aantal genkopieën per cel onbekend is en per soort kan verschillen en (ii) het DNA van meercellige organismen ook wordt geamplificeerd. Deze meercellige organismen dragen grotere hoeveelheden DNA bij aan de kloonbibliotheek dan de eencellige organismen;
- In de kloonbibliotheken zijn meer sequenties aangetroffen die clusteren met protozoa (46%) dan met schimmels of gisten (9%);
- Enkele aangetroffen OTU's hebben een hoog percentage van overeenkomst (>99%) met beschreven pathogene schimmels (zoals *Aspergillus*- en *Fusarium*-soorten);
- Een zoetwaterkwal is dominant (45%) in de kloonbibliotheken van twee van de drie biofilmmonsters uit het distributiesysteem van pb Spannenburg is, terwijl in de andere kloonbibliotheken van de biofilms de protozoa domineerden (>55%);
- Geen van de aangetroffen OTU's die de meeste overeenkomst heeft met een metazo of plant is beschreven als pathogeen voor de mens.

Protozoa zijn onmisbaar voor de vermeerdering van *Legionella pneumophila*. Daarnaast hebben bepaalde protozoa zelf ook ziekteverwekkende eigenschappen.

- Protozoa zijn aanwezig in het reine water en in de biofilm in de distributiesystemen van pb Amersfoortseweg en pb Spannenburg. Van de 539 verkregen eukaryotensequenties clusteren 252 sequenties (46%) met protozoa;
- In dit onderzoek zijn sequenties aangetroffen die nog niet eerder beschreven zijn;
- Protozoa die binnen hetzelfde geslacht of binnen dezelfde soort vallen, kunnen op 18S rRNA-gen niveau onderling sterk verschillen. Op 18S rRNA-gen niveau hebben protozoa die tot hetzelfde geslacht behoren een overeenkomst tussen 75 en 92%;
- Een deel (17%) van de aangetroffen sequenties heeft een lagere overeenkomst dan 75% met beschreven soorten. Deze sequenties konden daarom niet worden geïdentificeerd;
- *Hartmannella vermiformis* is aangetroffen in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem van de beide productiebedrijven maar is geen dominante protozo in de eukaryoten gemeenschap in deze situaties;
- *Hartmannella vermiformis* is aangetroffen in het gedistribueerde water van pb Spannenburg. In de zomer zijn hogere concentraties aangetroffen dan in de herfst;
- In het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg en pb Spannenburg zijn sequenties aangetroffen met de meeste overeenkomst met beschreven gastheerprotozoa van *Legionella pneumophila* en met

pathogene protozoa (*Acanthamoeba*-, *Echinamoeba*- en *Hartmannella*-soorten). Het is onbekend of deze protozoa daadwerkelijk als gastheer van *L. pneumophila* kunnen fungeren. Evenmin is onduidelijk of deze organismen daadwerkelijk ziekteverwekkend zijn.

Relatie met watersamenstelling

De samenstelling van de gemeenschap van protozoa in het reine water en in de biofilm wordt beïnvloed door de samenstelling van het water, zoals de temperatuur en aanwezigheid (concentratie/samenstelling) van afbreekbare stof in het water en hydraulische condities (stroomsnelheid, stagnatie).

- De gemeenschappen van protozoa in het reine water en in de biofilm uit het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg verschillen sterk van de gemeenschappen van protozoa in het reine water en in de biofilm uit het distributiesysteem van pb Spannenburg. Dit is zichtbaar op het fylumniveau en op soortniveau.
- Bij beide productiebedrijven verschilt de gemeenschap van protozoa in het reine water sterk van de gemeenschap van protozoa in de biofilms in het distributiesysteem;
- De verschillen tussen de gemeenschappen per monster duiden erop dat ook binnen een distributiesysteem een diversiteit aan niches aanwezig is;
- Gepubliceerde onderzoeken naar de relatie van de samenstelling van gemeenschappen van protozoa en de leefomgeving zijn gebaseerd op morfologisch onderzoek. Dit verschil in aanpak bemoeilijkt de vergelijking van de resultaten van het onderzoek beschreven in dit rapport met de resultaten van gepubliceerd onderzoek;
- Met behulp van beschreven indicatororganismen (19 aangetroffen protozogeslachten) worden beide watertypen ingedeeld in het niveau van mesosaprobie. Dit niveau staat voor een gemiddelde organische stof concentratie. Met de beschreven indicatororganismen zijn de twee watertypen niet van elkaar te onderscheiden;
- Door de beperkte identificatie van de protozoa en de beperkte informatie over de voedsel- en omgevingseisen van de protozoa is het niet mogelijk om een verband te leggen tussen de watersamenstelling en het voorkomen van verschillende fyta van protozoa;
- De collectie van sequenties van protozoa die aanwezig zijn in drinkwatersystemen is met dit onderzoek sterk uitgebreid en biedt een basis voor verder onderzoek naar de invloed van de samenstelling van het water en andere milieufactoren (bijvoorbeeld stroomsnelheid) op de gemeenschappen van vrijlevende protozoa.

9.2 Aanbevelingen voor verder onderzoek

- Ontwikkelen van primersets voor de specifieke amplificatie van het *Naegleria*-geslacht en het *Vahlkampfia*-geslacht. De gebruikte eukaryotenprimerset kan dan aangevuld worden met deze primersets, waardoor alle beschreven gastheren van *L. pneumophila* kunnen worden gedetecteerd;
- Optimaliseren en toepassen van een Q-PCR methode voor de detectie van *Naegleria*;
- Verschillende volumes van één monster analyseren met de T-RFLP methode en kloonbibliotheken om meer inzicht te krijgen in de diversiteit van protozoa in het drinkwater;
- Toepassen van Q-PCR voor beschreven gastheren van *L. pneumophila* in drinkwater en warmwaterinstallaties;

- Onderzoek naar vrijlevende protozoa in water met een temperatuur hoger dan 25°C (drinkwater in de zomer en warmtapwaterinstallaties) om de aanwezigheid van gastheren van *Legionella pneumophila* en pathogene protozoa te onderzoeken;
- Uitvoeren van incubatie-experimenten met watermonsters bij 37°C om na te gaan welke, en mogelijk niet eerder beschreven, gastheerprotozoa voor *L. pneumophila*, aanwezig zijn in de betreffende watertypen.

10 Literatuur

1. **Anoniem.** 2002. Biomedical sciences, <http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/amoeba.htm>.
2. **Anoniem.** Encyclopedia of life, <http://www.eol.org>. Accessed 15 januari 2009.
3. **Anoniem.** *Giardia* in the Wilderness, <http://giardiaclub.com/giardia.html>.
4. **Anoniem.** 2002. Improved Protocol for T-RFLP by Capillary Electrophoresis, http://rdp8.cme.msu.edu/html/t-rflp_jul02.html.
5. **Anoniem.** 2008. National Centre for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
6. **Anoniem.** 2008. Naturhistoriska riksmuseet, <http://www.nrm.se/utstallningarcosmonova/jourhavandeforskare/jourhavandebiolog/rygggradslosadjur/sotvattensmaneter.1258.html>.
7. **Anoniem.** 2004. Universität Stuttgart, <http://www.theo2.physik.uni-stuttgart.de/lehre/hauptseminar.html>.
8. **Anoniem.** 2006. Wordpress, <http://maddym.wordpress.com/2006/08/30/my-science-geekiness-knows-no-bounds-i-heart-tetrahymena/>.
9. **Baldauf, S. L.** 2003. The deep roots of eukaryotes. *Science* **300**:1703-1706.
10. **Bloem, J., M. B. Bar-Gilissen, and T. E. Cappenberg.** 1986. Fixation, counting, and manipulation of heterotrophic nanoflagellates. *Adv. Appl. Microbiol.* **52**:1266 - 1272.
11. **Byers, T. J., E. R. Hugo, and V. J. Stewart.** 1990. Genes of *Acanthamoeba*: DNA, RNA and protein sequences (a review). *J. Protozool.* **37**:17S-25S.
12. **Cavalier-Smith, T.** 2002. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:297-354.
13. **Clement, B. G., L. E. Kehl, L. DeBord, and C. L. Kitts.** 1998. Terminal restriction fragment patterns (TRFLPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J. Microbiol. Methods* **31**:135-142.
14. **Cole, J. R., B. Chai, T. L. Marsh, R. J. Farris, Q. Wang, S. A. Kulam, S. Chandra, D. M. McGarrell, T. M. Schmidt, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje.** 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* **31**:442-443.
15. **De Jonckheere, J. F., and S. Brown.** 1998. Is the free-living amoeba *Hartmannella* causing keratitis? *Clin. Infect. Dis.* **5**:1337-1338.
16. **De Jonckheere, J. F., and S. Brown.** 2005. The identification of vahlkampfiid amoebae by ITS sequencing. *Protist* **156**:89-96.
17. **Duncan, A.** 1988. The ecology of slow sand filters. In Graham N.J.D. Slow sand filtration. Recent developments in water treatment technology. John Wiley & Sons. Slow sand filtration.
18. **Fields, B. S., R. F. Benson, and R. E. Besser.** 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:506-526.
19. **Fields, B. S., G. N. Sanden, J. M. Barbaree, W. E. Morrill, R. M. Wadowsky, E. H. White and, J. C. Feeley.** 1989. Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in amoebae isolated from hospital hot water tanks. *Curr. Microbiol.* **18**:131-137.
20. **Fields, B. S., E. B. Shotts, Jr., J. C. Feeley, G. W. Gorman, and W. T. Martin.** 1984. Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:467-471.
21. **Finlay, B. J., and G. F. Esteban.** 1998. Freshwater protozoa: biodiversity and ecological function. *Biodiv.Conserv.* **7**:1163-1186.
22. **Frankova, E., and M. Horecka.** 1995. Filamentous soil fungi and unidentified bacteria in drinking water from wells and water mains near Bratislava. *Microbiol. Res.* **150**:311-313.

23. **Good, I. J.** 1953. The population frequencies of species and the estimation to the population parameters. *Biometrika* **40**:237-264.
24. **Griffin, J. L.** 1972. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. *Science* **178**:869-870.
25. **Hageskal, G., A. K. Knutsen, P. Gaustad, G. S. de Hoog, and I. Skaar.** 2006. Diversity and significance of mold species in Norwegian drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:7586-7593.
26. **Jiang, J. G., and Y. F. Shen.** 2007. Development of the microbial communities in Lake Donghu in relation to water quality. *Environ. Monit. Assess.* **127**:227-236.
27. **Johnson, M. D., T. Tengs, D. W. Oldach, C. F. Delwiche, and D. K. Stoecker.** 2004. Highly divergent SSU rRNA genes found in the marine ciliates *Myrionecta rubra* and *Mesodinium pulex*. *Protist* **155**:347-359.
28. **Jones, D. B., G. S. Visvesvara, and N. M. Robinson.** 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. *Trans. Ophthalmol. Soc. U K.* **95**:221-232.
29. **Katz, S. M., and J. M. Hammel.** 1987. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **17**:150-156.
30. **Kikuhara, H., M. Ogawa, H. Miyamoto, Y. Nikaido, and S. Yoshida.** 1994. Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in *Tetrahymena thermophila*. *J. Uoeh.* **16**:263-275.
31. **Kuiper, M. W., R. M. Valster, B. A. Wullings, H. Boonstra, H. Smidt, and D. van der Kooij.** 2006. Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5750-5756.
32. **Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell.** 1999. *Molecular cell biology*
33. **Madoni, P., D. Davoli, G. Cavagnoli, A. Cucchi, M. Pedroni, and F. Rossi.** 2000. Microfauna and filamentous microflora in biological filters for tap water production. *Water Research* **34**:3561-3572.
34. **Margalef, R.** 1969. Diversity and stability: a practical proposal and a model of interdependence. *Brookhaven Symp. Biol.* **22**:25-37.
35. **Nagington J., P. G. W., T. J. Playfair, J. McGill, B. R. Jones, and A. D. M. G. Steel.** 1974. Amoebic infection of the eye. *The lancet* **28**:1537-1540.
36. **Newsome, A. L., R. L. Baker, R. D. Miller, and R. R. Arnold.** 1985. Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **50**:449-452.
37. **Noteboom, J., K. de Boom, en P. van Beelen.** 1990. Grondwaterlevensgemeenschappen: een studie naar meercellige organismen in het bovenste grondwater en de milieuhygiënische implicaties. RIVM rapport 710302001
38. **Parry, J. D.** 2004. Protozoan grazing of freshwater biofilms. *Adv. Appl. Microbiol.* **54**:167-196.
39. **Patterson, D. J.** 1992. Free-living freshwater protozoa. A colour guide.
40. **Qvarnstrom, Y., G. S. Visvesvara, R. Sriram, and A. J. da Silva.** 2006. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3589-3595.
41. **Rogers, J., A. Dowsett, P. Dennis, J. Lee, and C. Keevil.** 1994. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1585-1592.
42. **Rowbotham, T. J.** 1986. Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr. J. Med. Sci.* **22**:678-689.
43. **Rowbotham, T. J.** 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* **33**:1179-1183.
44. **Salvadó, H., and P. Gracia.** 1992. Determination of organic loading rate of activated sludge plants based on protozoan analysis. *Water Res.* **27**:891-895.
45. **Schloss, P. D., and J. Handelsman.** 2004. Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. *Appl. Environ. Microb.* **71**:1501-1506.

46. **Schwarzenbach, K., J. Enkerli, and F. Widmer.** 2007. Objective criteria to assess representativity of soil fungal community profiles. *J. Microbiol. Methods* **68**:358-66.
47. **Shadrach, W. S., K. Rydzewski, U. Laube, G. Holland, M. Ozel, A. F. Kiderlen, and A. Flieger.** 2005. *Balamuthia mandrillaris*, free-living ameba and opportunistic agent of encephalitis, is a potential host for *Legionella pneumophila* bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2244-2249.
48. **Sibille, I., T. Sime-Ngando, L. Mathieu, and J. C. Block.** 1998. Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:197-202.
49. **Sládeček, V.** 1979. Continental systems for the assessment of river water quality. In James, A. en L. Evison, Division of public health engineering (p. 3-1 t/m 3-32), John Wiley & Sons, L td.
50. **Sládeček, V.** 1973. System of water quality from biological point of view. . *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **7**:I-IV, 1-218.
51. **Šlapeta, J., D. Moreira, and P. Lopez-Garcia.** 2005. The extent of protist diversity: insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes. *Proc. Biol. Sci.* **272**:2073-2081.
52. **Steinert, M., U. Hentschel, and J. Hacker.** 2002. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**:149-162.
53. **Tolkamp H. H., and J. J. P. Gardeniers.** 1988. The devolpment of biological water quality assessment in the Netherlands. *Hydrobiological* **22**:87-91.
54. **Valster, R., B. Wullings, S. Voost, G. Bakker, H. Smidt, and D. van der Kooij.** 2006. Detection and identification of free-living protozoa present in drinking water. *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*:427-430.
55. **Van der Land, J., en R. Ates.** 1999. Kwallen uit de kraan. *Natura* **6**:166-168.
56. **Van der Wielen, P. W. J. J., en D. van der Kooij.** 2009. Literatuurstudie naar opportunistische-ziekteverwekkende micro-organismen die kunnen vermeerderen in drinkwater. KWR rapport. BTO(s) 2009.001.
57. **Van Lieverloo., J. H. M., G. Veenendaal, en D. van der Kooij.** 1997. Dierlijke organismen in systemen voor distributie van drinkwater. Resultaten van een inventarisatie. SWE 96.023. Kiwa Onderzoek en Advies, Nieuwegein, The Netherlands.
58. **Vickerman, K.** 1992. The diversity and ecological significance of protozoa. *Biodiv. Conserv* **1**:334-341.
59. **Visvesvara, G. S., F. L. Schuster, and A. J. Martinez.** 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**:504-514.
60. **Wadowsky, R. M., R. Wolford, A. M. McNamara, and R. B. Yee.** 1985. Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1197-1205.
61. **Wayne, A. E.** 1993. First report of *Lepidodermella squamata* (Gastrotricha: Chaetonotida) from lake Erie. *Ohio J. Sci.* **4**:111-112.
62. **Willaert, E.** 1974. Primary amoebic meningo-encephalitis. A selected bibliography and tabular survey of cases. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **54**:429-440.
63. **Wullings, B. A., and D. van der Kooij.** 2006. Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella* spp. in drinking water treated at temperatures below 15°C. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:157-166.

Bijlagen

I Chemische en fysische parameters van het ruwe en het reine water van pb Amersfoortseweg en pb Spannenburg

Tabel 1: Chemische en fysische eigenschappen van het ruwe en reine water van pb Amersfoortseweg en pb Spannenburg (gemiddelde waarden)

Parameter	Amersfoortseweg		Spannenburg	
	ruw	rein	ruw	rein
Temperatuur (°C)	10.0	10.5	11.5	11.5
pH	6.7	7.8	6.8	7.6
Kleur (mg pt/l)	-	< 5	-	18
O ₂ (mg/l)	4.5	6.4	<0.5	5.9
HCO ₃ (mg/l)	46	98	453	< 10
Cl (mg/l)	10	13	28	28
Na (mg/l)	8.9	11.1	17.7	76.9
K (mg/l)	< 1	< 1	2.0	2.0
Ca (mg/l)	17	35.4	129	32.7
Mg (mg/l)	2.2	2.4	10.5	9.7
Fe (µg/l)	0.4	< 0.02	11.4	0.03
Mn (µg/l)	0,18	< 0.01	0.5	< 0.01
SO ₄ (mg/l)	17	16	< 10	<10
NH ₄ (mg/l)	< 0.05	< 0.05	3.4	< 0.05
NO ₃ (mg/l)	4.2	4.1	< 1	11
SiO ₂ (mg Si/l)	-	6.6	-	15
NPOC (mg C/l)	0.46	0.33	9.5	7.9
ATP (ng/l)	-	0.9	-	10.3
Koloniegetal 22°C (cfu/ml)	< 1	< 1	< 1	8
<i>Aeromonas</i> 30°C (cfu/100 ml)	-	< 1	-	13

II Identificatie van sequenties van Amoebozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem

Tabel 2. De overeenkomst tussen de OTU's uit het reine water en uit de biofilm uit het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg (A) en pb Spannenburg (S) en beschreven sequenties in de ARB-database. OTU's clusteren met Amoebozoa-soorten.

Meeste overeenkomst met groep of soort	Overeenkomst (%)	Aantal OTU's	Aantal klonen per monstertype			
			RW-A	BF-A	RW-S	BF-S
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	89,3	1	1	-	-	-
<i>Echinamoeba thermanum</i>	85,7	1	-	-	1	-
Eimeriidae milieu-kloon/ <i>Acanthamoeba</i> sp.	96,8/85,9	1	2	-	-	-
Ongekweekte amoeba/ <i>Hartmannellidae</i> sp.	79,2/77,9	1	-	-	-	7
<i>Neoparamoeba aestuarina</i>	89,3	1	-	-	1	-
<i>Pterocystis tropica</i>	93,4	1	-	1	-	-
<i>Rainieriophrys erinaceoides</i>	93,3 - 94,7	2	-	2	-	-
Ongekweekte eukaryoot/ <i>Rainieriophrys</i> sp.	89,0/88,4	1	-	1	-	-
Ongekweekte Sarcosomataceae/ <i>Amastigomonas mutalitis</i>	78,3/77,1	1	-	-	-	1
Totaal		10	3	4	2	8

III Identificatie van sequenties van Cercozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem

Tabel 3: De overeenkomst tussen de OTU's uit het reine water en uit de biofilm uit het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg (A) en pb Spannenburg (S) en beschreven sequenties in de ARB-database. OTU's clusteren met Cercozoa-soorten

Meeste overeenkomst met groep of soort	Overeenkomst (%)	Aantal OTU's	Aantal klonen per monstertype			
			RW-A	BF-A	RW-S	BF-S
Athalamea milieu-monster/Bodem flagellaat	91,1/88,5	1	-	-	2	-
Athalamea milieu-monster/ <i>Hedriocystis reticulata</i>	90,3/85,5	1	-	-	1	-
Athalamea milieu- monster/ <i>Exuviaella pusilla</i>	81,4/81,0	1	-	1	-	-
<i>Cercomonas longicauda</i>	91,1 - 96,3	3	4	-	1	-
<i>Cercomonas metabolicus</i>	94,8 - 97,5	3	6	-	-	-
<i>Cercomonas</i> sp.	80,6 - 95,2	3	-	3	5	-
Cercomonadida milieu- monster/Bodem flagellaat	93,4 - 98,1/ 92,6 - 94,1	2	-	1	1	-
Cercomonadidae milieu- monster/ <i>Cercomonas</i> sp.	95,1/95,0	1	-	-	-	1
Cercomonadida milieu- monster / <i>Masisteria marina</i>	87,4/84,6	1	-	1	-	-
<i>Dimorpha</i> -like sp.	93,4	1	-	10	-	-
<i>Dodomorpha</i> sp.	99,4	1	-	24	-	-
<i>Ebria tripartita</i>	88,2	1	-	3	-	-
<i>Pseudodifflugia</i> cf. <i>gracilis</i>	88,7	1	-	-	-	1
<i>Trachelocorythion pulchellum</i>	76,5	1	-	13	-	-
Ongekweekte Banisveld eukaryoot/Bodem flagellaat	99,8/99,1	1	-	1	-	-
Ongekweekte Cercozoa /Cercomonadida milieu-monster	92,6/91,9	1	-	-	2	-
Ongekweekte Cercozoa/ <i>Cercomonas</i> sp.	98,0/91,4	1	-	-	1	-
Ongekweekte Cercozoa/ <i>Massisteria marina</i>	89,1/87,4	1	-	-	1	-
Ongekweekte Cercozoa/ <i>Pseudodifflugia</i> cf. <i>gracilis</i>	90,0/87,5	1	-	-	2	-
Ongekweekte Cercozoa/Bodem flagellaat	99,0/93,0	1	-	-	3	-
Ongekweekte Cercozoa/ <i>Cercomonas</i> sp.	97,9/89,1	1	-	-	1	-
Ongekweekte Cercozoa/ <i>Ebria tripartita</i>	96,1/88,0	1	-	1	-	-
Ongekweekte eukaryoot/ <i>Protaspis grandis</i>	96,1/92,6	1	-	-	1	-
Ongekweekte eukaryoot/Ongekweekte zoetwater Cercozoan	95,1/94,0	1	-	1	-	-
Ongekweekte eukaryoot/ <i>Protaspis grandis</i>	99,4/94,0	1	-	-	-	1
Ongekweekte zoetwater Cercozoa/Cercomonadidae milieu-kloon	83,3/81,4	1	1	-	-	-
Ongekweekte zoetwater Cercozoa/ <i>Cercomonas</i> sp.	89,0-92,6/ 88,4-91,4	2	2	-	-	1
Ongekweekte zoetwater Cercozoa/Rigidomastix-like sp.	93,5/92,9	1	-	1	-	-
Ongekweekte rhizosphere Cercozoan/Bodem flagellaat	78,9/74,5	1	1	-	-	-
Niet geïdentificeerde eukaryoot/ <i>Lecythium</i> sp.	95,9-97,0/ 94,4 - 95,9	2	-	-	3	-
Totaal		39	14	60	24	4

IV Identificatie van sequenties van Choanozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem

Tabel 4. De overeenkomst tussen de OTU's uit het reine water en uit de biofilm uit het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg (A) en pb Spannenburg (S) en beschreven sequenties in de ARB-database. OTU's clusteren met Choanozoa-soorten

Meeste overeenkomst met groep of soort	Overeenkomst (%)	Aantal OTU's	Aantal klonen per monstertype			
			RW-A	BF-A	RW-S	BF-S
<i>Amoebidium parasiticum</i>	90,5	1	-	-	1	-
Codonosigidae milieu-kloon/ <i>Monosiga ovata</i>	97,1/93,5	1	-	1	-	-
<i>Corallochytrium limacisporum</i>	79,5	1	-	-	1	-
<i>Diaphanoeca grandis</i>	75,7-92,9	3	3	-	-	3
Eimeriidae milieu-kloon/ <i>Diaphanoeca grandis</i>	92,3/90,1	1	-	-	-	1
Eimeriidae milieu-kloon/ <i>Endochytrium</i> sp.	91,9/90,2	1	-	1	-	-
Eimeriidae milieu-kloon/ <i>Monosiga ovata</i>	90,2-94,9/ 88,9-92,1	3	-	2	-	1
Eimeriidae milieu-kloon/ <i>Stephanoeca diplocostata</i>	91,5-93,5/ 90,2-92,8	2	-	7	1	-
<i>Ichthyophonus irregularis</i>	79,4-92,4	2	-	2	-	1
<i>Nuclearia moebiusi</i>	91,8	1	-	-	-	1
<i>Rhinosporidium seeberi</i>	90,1	1	-	1	-	-
Ongekweekte eukaryoot / <i>Diaphanoeca grandis</i>	90,7/89,6	1	-	-	1	-
Ongekweekte eukaryoot picoplankton kloon/ <i>Monosiga ovata</i>	90,7-98,5/ 90,4-94,4	3	-	-	5	1
Ongekweekte eukaryoot picoplankton kloon/ <i>Stephanoeca diplocostata</i>	92,2/92,0	1	-	-	1	-
Ongekweekte marine eukaryoot kloon/ <i>Corallochytrium limacisporum</i>	90,4/89,9	1	-	-	-	2
Ongekweekte marine eukaryoot kloon/ <i>Diaphanoeca grandis</i>	88,7-94,0/ 88,4-92,4	2	-	1	4	-
Ongekweekte marine eukaryoot kloon/ <i>Stephanoeca diplocostata</i>	93,4/92,0	1	-	-	-	3
Totaal		26	3	15	14	13

V Identificatie van sequenties van Ciliophora in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem

Tabel 5. De overeenkomst tussen de OTU's uit het reine water en uit de biofilm uit het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg (A) en pb Spannenburg (S) en beschreven sequenties in de ARB-database. OTU's clusteren met Ciliophora-soorten.

Meeste overeenkomst met groep of soort	Overeenkomst (%)	Aantal OTU's	Aantal klonen per monstertype			
			RW-A	BF-A	RW-S	BF-S
<i>Dextrichides pangi</i>	91,2	1	2	-	-	-
<i>Heliophrya erhardi</i>	85,6-86,3	2	-	-	-	5
<i>Hemiophrys macrostoma</i>	82,6	1	-	-	1	-
<i>Hemiophrys procera</i>	96,8-98,1	2	-	-	2	-
<i>Holosticha diademata</i>	96,7-98,7	2	-	-	2	-
Oxytrichidae milieu kloon/ <i>Gonostomum namibiense</i>	97,5/96,9	1	-	-	1	-
<i>Parabirojimia similis</i>	97,3	1	-	-	1	-
<i>Tokophrya lemnae</i>	87,6	1	-	4	-	-
Niet geïdentificeerde eukaryoot/ <i>Carchesium polypinum</i>	90,4/90,2	1	-	-	-	1
Ongekweekte eukaryoot / <i>Dextrichides pangi</i>	98,9/87,1	1	-	-	1	-
Niet geïdentificeerde eukaryoot/ <i>Ophrydium versatile</i>	85,9/85,3	1	-	-	-	1
Niet geïdentificeerde eukaryoot/ <i>Vorticella campanula</i>	92,4 -94,8/ 92,1-94,6	2	-	-	-	4
Ongekweekte hypotrichid ciliaat / <i>Aspidisca steini</i>	88,9/87,7	1	-	-	2	-
Ongekweekte marine eukaryoot/Ongekweekte ciliaat	77,0/76,2	1	3	-	-	-
Ongekweekte marine eukaryoot / <i>Plagiopyliella pacifica</i>	94,5/94,5	1	2	-	-	-
<i>Uroleptus gallina</i>	87,6	1	-	-	1	-
<i>Vorticella campanula</i>	91,6-99,2	6	-	-	1	7
<i>Vorticella fusca</i>	99,3	1	-	-	-	1
<i>Vorticella</i> sp.	96,6	1	-	-	5	1
<i>Zoothamnium niveum</i>	94,8	1	-	-	-	1
Totaal		29	7	4	17	21

VI Identificatie van sequenties van Euglenozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem

Tabel 6. De overeenkomst tussen de OTU's uit het reine water en uit de biofilm uit het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg (A) en pb Spannenburg (S) en beschreven sequenties in de ARB-database. OTU's clusteren met Euglenozoa-soorten.

Meeste overeenkomst met groep of soort	Overeenkomst (%)	Aantal OTU's	Aantal klonen per monstertype			
			RW-A	BF-A	RW-S	BF-S
<i>Bodo saltans</i>	77,2 - 95,6	2	2	-	-	-
<i>Neobodo designis</i>	87,7 - 97,4	6	10	-	1	-
<i>Petalomonas cantuscygni</i>	85,8	1	-	1	-	-
<i>Rhynchomonas nasuta</i>	85,4 - 98,1	2	4	-	-	-
Ongekweekte eukaryoot/ <i>Bodo saltans</i>	94,5/93,6	1	1	-	-	-
Ongekweekte eukaryoot/ <i>Petalomonas cantuscygni</i>	80,5/78,5	1	-	-	1	-
Totaal		13	17	1	2	0

VII Identificatie van sequenties van Myzozoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem

Tabel 7. De overeenkomst tussen de OTU's uit het reine water en uit de biofilm uit het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg (A) en pb Spannenburg (S) en beschreven sequenties in de ARB-database. OTU's clusteren met Myzozoa-soorten.

Meeste overeenkomst met soort of groep	Overeenkomst (%)	Aantal OTU's	Aantal klonen per monstertype			
			RW-A	BF-A	RW-S	BF-S
<i>Pseudoperkinsus tapetis</i>	86,8	1	-	1	-	-
Ongekweekte alveolate/ <i>Corallochytrium limacisporum</i>	87,8/78,9	1	-	-	1	-
Ongekweekte eukaryoot /Ongekweekte alveolate kloon	97,3/91,0	1	-	-	9	-
Ongekweekte eukaryoot/ <i>Colpodella pontica</i>	98,1/77,3	1	-	-	1	-
Ongekweekte marine eukaryoot/ <i>Peridinium wierzejskii</i>	97,1/96,7	1	-	-	-	1
Totaal		5	0	1	11	1

VIII Identificatie van sequenties van Stramenopiles in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem

Tabel 8. De overeenkomst tussen de OTU's uit het reine water en uit de biofilm uit het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg (A) en pb Spannenburg (S) en beschreven sequenties in de ARB-Database. OTU's clusteren met Myzozoa-soorten.

Meeste overeenkomst met groep of soort	Overeenkomst (%)	Aantal OTU's	Aantal klonen per monstertype			
			RW-A	BF-A	RW-S	BF-S
<i>Aphanomyces invadans</i>	98,4 - 98,7	2	-	3	-	-
<i>Hyphochytrium catenoides</i>	97,3	1	-	-	-	2
<i>Paraphysomonas foraminifera</i>	98,5	1	-	-	1	-
<i>Rhizidiomyces apophysatus</i>	98,3	1	-	1	-	-
Totaal		5	0	4	1	2

IX Identificatie van schimmels in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem

Tabel 9. De overeenkomst tussen de OTU's uit het reine water en uit de biofilm uit het distributiesysteem van pb Amersfoortseweg (A) en pb Spannenburg (S) en beschreven sequenties in de ARB-Database. OTU's clusteren met schimmels.

Meeste overeenkomst met beschreven groep of soort	Overeenkomst (%)	Fylum	Aantal OTU's	Aantal klonen per monstertype			
				RW-A	BF-A	RW-S	BF-S
<i>Rhizophlyctis rosea</i>	90,3	Chytriomycota	1	-	3	-	-
<i>Triparticalar arctium</i>	91,5	Chytriomycota	1	-	1	-	-
<i>Basidiobolus microsporus</i>	91,6	Zygomyceta	1	2	-	-	-
<i>Zoophagus insidians</i>	94,85	Zygomycota	1	-	6	-	-
<i>Aspergillus versicolor</i>	99,8	Ascomycetes	1	2	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	99,8	Ascomycetes	1	-	5	-	-
<i>Candida geochares</i>	84,3	Ascomycetes	1	-	-	1	-
<i>Candida solani</i>	89,8	Ascomycetes	1	-	1	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	Ascomycetes	1	1	-	-	-
<i>Epicoccum nigrum</i>	99,4	Ascomycetes	1	2	-	-	-
<i>Exophiala pisciphila</i>	97,0	Ascomycetes	1	-	1	-	-
<i>Fusarium oxysporium</i>	99,4	Ascomycetes	1	-	3	-	-
Ongekweekte banisveld eukaryoot	75,6;90,2	Ascomycetes	2	-	2	1	2
Ongekweekte eukaryoot	75,6	Ascomycetes	1	-	3	-	-
Ongekweekte schimmel	77,1-85,0	Ascomycetes	3	-	1	-	2
Ongekweekte zoetwater eukaryoot	76,5	Ascomycetes	2	1	-	2	-
<i>Pichia jadinii</i>	99,8	Ascomycetes	1	-	1	-	-
<i>Cryptococcus sp.</i>	95	Basidiomycota	1	-	-	-	1
<i>Microstroma juglandis</i>	99,3	Basidiomycota	1	-	1	-	-
Ongekweekte schimmel	85,7;96,3	Onbekend	2	-	-	-	2
Totaal	-	-	25	9	28	4	7

X Identificatie van metazoa in het reine water en in de biofilm in het distributiesysteem

Tabel 10. De overeenkomst tussen de OTU's uit het reine water en uit de biofilm van pb Amersfoortseweg (A) en pb Spannenburg (S) en beschreven sequenties in de ARB-database. OTU's clusteren met metazoa.

Meeste overeenkomst met beschreven soort of groep	Overeenkomst (%)	Fylum	Aantal OTU's	Aantal klonen per monstertype			
				RW-A	BF-A	RW-S	BF-S
<i>Baikalospongia fungiformis</i>	75,2	Sponzen	1	-	-	2	-
<i>Ephydatia cooperensis</i>	87,6	Sponzen	1	-	-	1	-
<i>Ephydatia fluviatilis</i>	77,3	Sponzen	1	1	-	2	-
<i>Spongilla lacestris</i>	77,0	Sponzen	1	-	-	1	-
<i>Swartschewskia papyracea</i>	76,0	Sponzen	1	-	-	1	-
<i>Craspedacusta sowerbyi</i>	93,3 - 99,6	Neteldieren	8	-	-	-	39
<i>Nematoplana coelogyneporoides</i>	96,9	Platwormen	1	-	-	1	-
<i>Paracatenula cf. erato</i>	91,7	Platwormen	1	2	-	-	-
<i>Lecane leontina</i>	99,2	Radardieren	1	-	-	2	-
<i>Lepadella patella</i>	99,8	Radardieren	1	2	-	-	1
<i>Chaetonotus neptuni</i>	95,0 - 95,9	Buikharigen	2	-	-	17	1
<i>Chaetonotus like gastrotrich</i>	81,3	Buikharigen	1	-	-	1	-
<i>Lepidodermella squammata</i>	96,3	Buikharigen	1	-	-	-	1
<i>Buchholzia fallax</i>	97,0	Ringwormen	1	-	-	2	-
<i>Rhabdolaimus terrestris</i>	85,1 - 98,5	Rondwormen	3	28	-	2	12
<i>Bryocamptus pygmaeus</i>	94,7	Geleedpotigen	1	-	6	-	-
<i>Cyclopidae sp.</i>	98,4	Geleedpotigen	1	-	-	-	8
<i>Diplochaetus planatus</i>	97,6	Geleedpotigen	1	-	1	-	-
Totaal	-	-	28	33	5	32	62

