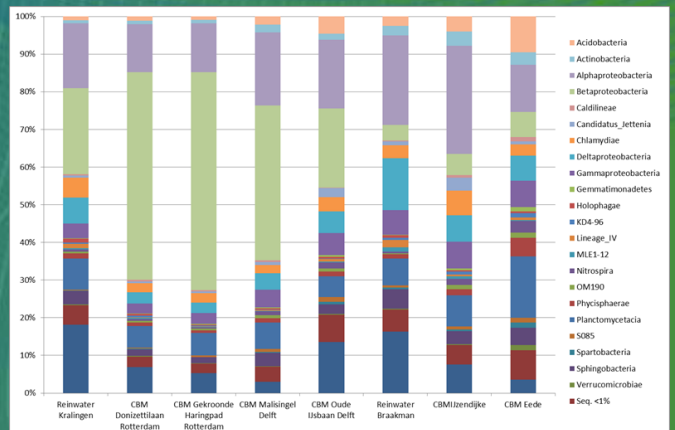


BTO 2017.033 | Juli 2017

## BTO rapport

Analyse van de bacteriepopulatie met NGS in water, sediment en biofilm van het leidingnet in Kralingen en Braakman in 2014 en 2015 (EVIDES Waterbedrijf)





# BTO/Evides

**Analyse van de bacteriepopulatie met NGS in water, sediment en biofilm van het leidingnet in Kralingen en Braakman in 2014 en 2015 (EVIDES Waterbedrijf)**

**BTO 2017.033 | Juli 2017**

## **Opdrachtnummer**

400882.002.001

## **Projectmanager**

Edwin Kardinaal

## **Opdrachtgever**

BTO – Speerpuntonderzoek

## **Kwaliteitsborger**

Paul van der Wielen

## **Auteurs**

Bart Wullings en Wim Hijnen

## **BTO/Evides**

Dit onderzoek is een aanvullend deel van het bedrijfseigen SPO/BTO onderzoek van Evides en is medegefinancierd uit het H2020 onderzoekprogramma van Evides

**Jaar van publicatie**  
2017

### **Meer informatie**

Ir. B.A. Wullings  
T 06 11 36 52 19  
E [bart.wullings@kwrwater.nl](mailto:bart.wullings@kwrwater.nl)

### **Keywords**

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511  
F +31 (0)30 60 61 165  
E [info@kwrwater.nl](mailto:info@kwrwater.nl)  
I [www.kwrwater.nl](http://www.kwrwater.nl)



**Watercycle  
Research  
Institute**

**BTO 2017.033 | Juli 2017 © 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.

# Samenvatting

Een van de belangrijkste onderzoeksvragen bij Evides is om meer inzicht te krijgen in de biologische activiteit in het distributienet vanwege verhoogde groei van *Aeromonas* (BioS). In de winter van 2014–2015, als ook in de zomer van 2015, zijn veldstudies uitgevoerd waarbij het vóórkomen en het gedrag van *Aeromonas* in het sediment en op de buiswand in relatie tot de microbiologische en fysisch/chemische condities in het leidingnet is onderzocht. In het leidingnet van Kralingen en Braakman zijn op verschillende locaties, met een verschillende verblijftijd, de verschillende niches in het leidingnet (water, spuiwater, sediment en buiswand) bemonsterd en zijn tevens op de locaties CBM's geplaatst (onderzoek zomer 2015).

Als aanvulling op de traditionele microbiologische metingen zijn de monsters van dit onderzoek tevens onderzocht op de samenstelling van de bacteriepopulaties door middel van de Next Generation Sequencing (NGS-) methodiek. De analyse van de bacteriepopulatie kan inzicht geven in de dynamiek van de microbiologische en fysische processen (groei, afsterving en uitwisseling) die optreden in de verschillende niches van het leidingnet (water, sediment en buiswand). De NGS-methode maakt het mogelijk om vrijwel de gehele aanwezige bacteriepopulatie op basis van de aanwezigheid van DNA te identificeren. De analyse is onafhankelijk of de bacteriën kweekbaar zijn. Bacteriepopulaties in de verschillende niches zijn vergeleken met de populatie in het water 'af pompstation' en met de populaties die zich in de CBM ontwikkelden. De onderzoekslocaties zijn zo gekozen dat ook een mogelijk effect van de verblijftijd kon worden onderzocht.

De NGS-analyse voor de identificatie van de bacteriepopulaties richt zich op een deel van het bacteriële 16S rRNA gen waarin tussen de verschillende bacteriën relatief veel verschillen in de DNA-volgorde voorkomen (V3–V4 regio). Op basis van de DNA-volgorde van dit gen-fragment is het mogelijk bacteriën te identificeren. Per monster zijn gemiddeld ongeveer 70.000 DNA-sequenties geïdentificeerd. Elke geanalyseerde DNA-sequentie is door middel van fylogtypering of biologische barcodering geïdentificeerd (taxonomisch op naam brengen). Bij fylogtypering wordt elke sequentie vergeleken met een referentiesequentiedatabase die internationaal beschikbaar is en vervolgens ingedeeld/op naam gebracht op basis van de gelijkheid met de referentiesequentie. In dit onderzoek is gekozen om de verschillende populaties op klasse-niveau te identificeren. Voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen zijn deelverzamelingen van de monsters gemaakt en de bacteriepopulaties m.b.t. de overeenkomsten en verschillen geanalyseerd.

De analyse van de bacteriepopulaties in de verschillende niches per distributielocatie (biofilm plus fijn en grof sediment) inclusief het water 'af pompstation' als bron (alleen onderzoek zomer 2015) laat zien dat er relatief grote verschillen zijn tussen de populaties in het water 'af pompstation' enerzijds en in het sediment en de biofilm anderzijds. Daarentegen zijn er grote overeenkomsten tussen de populaties in de spuimonsters met fijn sediment en de planktonnetmonsters met grof sediment.

De bacteriepopulaties in de watermonsters van de twee pompstations verschillen vrij veel van elkaar (56% overeenkomst). In het voorzieningsgebied van Kralingen is de overeenkomst tussen de populatie in het water 'af pompstation' en in het distributienet vrij hoog (89–99%) en hoger dan in het voorzieningsgebied van Braakman (75%). Bij dit laatste pompstation

waren de onderlinge verschillen tussen de locaties met toenemende verblijftijd groter (>20% verschil). Uit de vergelijking van de bacteriepopulaties in de watermonsters kan worden geconcludeerd dat de populatiesamenstelling in het drinkwater voornamelijk bepaald wordt door (i) de herkomst (af-pompstation) en dat de bacteriesamenstelling in mindere mate aan verandering onderhevig is gedurende (ii) het transport in het distributiegebied en dat die verandering waarschijnlijk ook afhankelijk is van (iii) de verblijftijd.

Een vergelijking van de bacteriepopulaties in de verschillende geanalyseerde spuiwater- en sedimentmonsters van de twee afzonderlijke pompstations laat zien dat de populaties met een grotere overeenkomst clusteren (>80). Dit duidt erop dat de bacteriesamenstelling in het niche "sediment, fijn en grof" opvallend overeenkomt en niet aantoonbaar wordt beïnvloed door de herkomst van het water en verschillen in lokale milieuomstandigheden van het leidingnet. Het sediment wordt gedefinieerd als het uitspoelbaar materiaal uit een distributienet, het spuiwater bevat zowel het fijne als grove sediment. De milieucondities in het sediment van beide locaties zijn voor bacteriën kennelijk overeenkomend.

De bacteriepopulaties in de CBM monsters zijn vrij verschillend ten opzichte van de spuiwater-, sediment- en buiswandmonsters. Dit wordt mogelijk veroorzaakt door het grote verschil in leeftijd van de biofilms. De CBM monsters bevatten een vier weken oude niet gestabiliseerde biofilm terwijl de biofilms in het leidingnet stabiel zijn en veel ouder.

Met behulp van de NGS methodiek is een gedetailleerd inzicht verkregen in de dynamiek van de bacteriepopulaties in de verschillende niches in leidingnet en de mogelijke verbanden tussen de verschillende niches waarin bacteriën aanwezig zijn (water, sediment (fijn, groot) en biofilm op de buiswand. Er is nog een relatief kleine steekproef uitgevoerd waardoor de uitspraken over de biologische processen in het leidingnet nog niet algeheel geldend kunnen zijn. Er wordt dan ook aanbevolen om de methodiek verder toe te passen o.a. met de monsters die in 2016 zijn verzameld.

# Voorwoord

Het onderzoek dat in dit rapport is beschreven is geïnitieerd naar aanleiding van een introductie van Leo Heijnen over deze nieuwe moleculaire technologie bij Evides in 2014. Daarin werd duidelijk dat deze nieuwe DNA technologie inzicht kan geven in de microbiologische processen in het leidingnet. In het SPO-onderzoek 2015 is besloten om de techniek toe te passen op een uitgebreid vergelijkend leidingnetonderzoek bij twee productielocaties van Evides (Braakman en Kralingen) dat tot doel had de biostabiliteit in het leidingnet te beschrijven met nieuwe parameters die hiervoor zijn ontwikkeld en aangevuld met analyse van sediment/buiswand monsters. Het onderzoek moet worden gezien als een verkenning van de waarde van de methodiek in distributieonderzoeken bij Evides.

# Inhoud

<b>1</b>	<b>Inleiding</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Methoden, werkwijze en betekenis</b>	<b>7</b>
2.1	DNA monsters	7
2.2	Monsters: locaties en type monsters	7
2.3	ATP	7
2.4	Monsters van de CBM	8
<b>3</b>	<b>Resultaten en discussie</b>	<b>9</b>
3.1	NGS analyse interpretatie	11
3.2	NGS analyse alle monsters	11
3.3	NGS analyse van alle niches per distributielocatie en het water 'af pompstation'	13
3.4	Analyse van de NGS gegevens van de afzonderlijke niches van de locaties	23
3.5	Bacteriepopulaties in de CBM monsters	27
<b>4</b>	<b>Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>37</b>
4.1	Conclusies	37
4.2	Aanbevelingen voor verder onderzoek	38
	<b>Bijlage I Dendrogrammen van de bacteriële gemeenschappen berekend op verschillende taxonomische niveaus</b>	<b>39</b>
	<b>Bijlage II Monsters voor DNA-isolatie</b>	<b>41</b>
	<b>Bijlage III NGS analyse</b>	<b>45</b>



# 1 Inleiding

Bij Evides wordt een uitgebreid onderzoeksproject uitgevoerd naar de vermeerdering van *Aeromonas* in het distributiegebied (BioS). Een deelproject daarin is 'Aeromonas groeifactoren' waarin zowel op laboratoriumschaal met groeiproeven als in het veld met gerichte metingen het mechanisme achter de vermeerdering en verspreiding van *Aeromonas* in het distributiegebied wordt onderzocht. In 2014–2015 is een eerste oriënterend veldonderzoek uitgevoerd naar het vóórkomen en het gedrag van *Aeromonas* in het sediment en op de buiswand in relatie tot de microbiologische en fysisch/chemische condities in het leidingnet. Het doel van dit project was om op een aantal geselecteerde locaties in het leidingnet sediment en buiswandmonsters te nemen en deze te analyseren op een aantal specifieke parameters om daarmee de microbiologische en fysisch/chemische samenstelling van sediment, biofilm en water te kunnen vergelijken. Dit eerste veldonderzoek heeft inzicht gegeven in de aanwezigheid van bacteriële activiteit (bepaald op basis van de concentratie ATP), dierlijke organismen, *Aeromonas* bacteriën en (an)organische componenten (TOC en metalen), in water, sediment en op buiswand (biofilm) monsters van een beperkt aantal monsters van de locaties Kralingen. In 2015 is dit onderzoek uitgebreid en zijn de monsterlocaties van het speerpuntonderzoek 2015 'biologische stabiliteit in het distributiegebied' op dezelfde wijze bemonsterd en onderzocht.

Naast de meer traditionele microbiologische metingen zijn ook DNA-technieken toegepast op de monsters. Zo is met q-PCR methoden de aanwezigheid van *Aeromonas* gekwantificeerd en vergeleken met het aantal kweekbare *Aeromonas* bacteriën en is een schatting gemaakt van de aanwezigheid van DNA van waterpissebedden (*Asellidae*) in de monsters (Hijnen en Bahlman, 2016). De monsters van dit onderzoek zijn aanvullend ook onderzocht op de samenstelling van de bacteriepopulaties door middel van Next Generation Sequencing (NGS) methode (Heijnen, 2015). Deze methode maakt het mogelijk om vrijwel de gehele aanwezige bacteriepopulatie op basis van de aanwezigheid van DNA te identificeren. De identificatie is vanzelfsprekend ongeacht of de bacteriën kweekbaar zijn. Bij het biologische stabiliteitsonderzoek is ook de Continue biofouling monitor (CBM) ingezet om de biomassa accumulerende eigenschappen van het drinkwater in het leidingnet te bepalen. Van de biomassa die zich in deze monitor ophoopt door biofilmgroei en/of adsorptie zijn ook DNA monsters genomen en met NGS geanalyseerd.

Doel van het NGS onderzoek was om met deze nieuwe techniek door middel van het identificeren van de bacteriële populatie inzicht te krijgen in de dynamiek van de microbiologische en fysische processen (groei, afsterving en uitwisseling) die optreden in de verschillende niches van het leidingnet (water, sediment en buiswand). De volgende onderzoeksvragen stonden daarbij centraal:

1. Wat zijn de verschillen en overeenkomsten tussen de bacteriepopulaties in water, biofilm, spuiwater en sediment per monsterlocatie en vergeleken met de bacteriepopulatie in het drinkwater 'af pompstation'?
2. Wat zijn de verschillen en overeenkomsten tussen de bacteriepopulaties in het drinkwaterdistributiesysteem van twee pompstations?
3. Wat is het effect van verblijftijd en/of afstand op de samenstelling van de bacteriepopulaties in de verschillende niches van het leidingnet?



4. Welke overeenkomende of juist verschillende bacteriegroepen domineren in de verschillende specifieke niches (water, sediment en biofilm) in het drinkwaterleidingnet van de twee onderzochte pompstations?
5. Wat zijn de overeenkomsten en verschillen tussen de bacteriepopulaties die zich in de CBM ontwikkelen en die in de sediment/buiswand monsters worden gevonden?

## 2 Methoden, werkwijze en betekenis

### 2.1 DNA monsters

Voor dit onderzoek zijn NGS analyses van het 16S rRNA-gen uitgevoerd op DNA geïsoleerd uit water-, sediment- en biofilmmonsters van locaties in de voorzieningsgebieden van pompstation Kralingen en Braakman. De DNA monsters zijn overeenkomend het onderzoek uitgevoerd en in 2015 geanalyseerd (Heijnen, 2015). Voor de identificatie van de monsters is een variabele regio van het bacteriële 16S rRNA gen geanalyseerd (V3-V4 regio). Per monster zijn gemiddeld ongeveer 70.000 DNA-sequenties geïdentificeerd.

### 2.2 Monsters: locaties en type monsters

De eerste vier monsterlocaties waar DNA van is geanalyseerd waren geselecteerd in het eerste sediment/buiswand onderzoek dat voor Evides in 2014/2015 is uitgevoerd. Er zijn twee monsterlocaties op een verblijftijd van circa 24 en 48 uur van het pompstation van de locatie Kralingen geselecteerd: Avenue Concordia en Bernhardlaan in Delft waar ook overschrijdingen van de *Aeromonas* norm zijn waargenomen. Daarnaast is een locatie in het distributiegebied van Braakman (Sluis) en van Ouddorp/Berenplaat (Herkingen) geselecteerd, respectievelijk als controle zonder *Aeromonas* overschrijdingen en een locatie waar veel waterpissebedden (*Asellus aquaticus*) zijn gevonden; er zijn aanwijzingen dat er een verband is tussen dit organisme en de (na)groei van *Aeromonas*. In het vervolg van 2015 zijn de monsterlocaties onderzocht waar het biologische stabiliteits onderzoek in het leidingnet van Kralingen en Braakman is uitgevoerd. Hier werd lopende 2015 de biologische stabiliteit beoordeeld met diverse daarvoor ontwikkelde parameters (AOC, BPP, hemoflow, CBM).

De bemonstering, de verschillende monstertypen of niches (water, spuiwater, sediment en buiswand) en werkwijzen zijn beschreven in Hijnen en Bahlman (2016). Hieronder volgt een korte samenvatting van de belangrijkste monstergegevens en werkwijzen voor dit rapport.

In Tabel 1 zijn de monsterpunten beschreven. Bij deze punten zijn op de standaardwijze spui monsters genomen en het sediment verzameld dat achterblijft in een 30, 100 en 500 µm planktonnet. Monsters van de biofilm zijn verzameld door swabmonsters te nemen van een stuk PVC-leiding dat voor het onderzoek is uitgenomen. De swabmonsters (~10 cm<sup>2</sup>) zijn op vier plaatsen aan de binnenzijde van het leidingstuk verzameld (onder, midden (2x) en boven). De verzamelde biofilm op de swabs is vervolgens standaardwijze losgetrild en in weer in suspensie gebracht (LMB voorschrift 0.10). De watermonsters waren afkomstig van continu doorstroomde kranen die op de distributieleidingen waren aangesloten. In Tabel 2 zijn de verschillende monsters en de daarop uitgevoerde analyses waaronder NGS samengevat.

### 2.3 ATP

Zoals uit Tabel 2 blijkt is met de ATP bepaling een maat verkregen van de actieve biomassa in de verschillende niches (niet celgebonden-ATP is niet bepaald). Hiermee is in Hijnen en Bahlman (2016) het percentage van het totale ATP-gehalte uitgerekend dat in elk van de bemonsterde niches is gemeten. Deze zijn in het locatiegericht analyseren van de DNA gegevens opgenomen om aan te kunnen geven waar het belangrijkste deel van de actieve biomassa is.

## 2.4 Monsters van de CBM

Van de CBM met glaspereels en glasplaatjes is op twee afzonderlijke monstertmomenten bij dezelfde water temperatuur van circa 18–20°C tijdens de looptijd het DNA van de biofilm van de twee duplo's in een mengmonster geïsoleerd voor NGS analyse. Deze twee verschillende tijden worden met '1' en '3' aangeduid in de monsters (nummers staan voor cuvet 1+2 = '1' en cuvet 3+4 ('3')). Hierdoor wordt een indruk verkregen van de verschillen in bacteriesamenstelling tussen de verschillende locaties op twee verschillende momenten in de looptijd van de CBM en wordt indruk van de variatie in bacteriepopulaties. Een ander belangrijk doel van het meenemen van deze monsters was om de populaties in de CBM te kunnen vergelijken met de populaties waargenomen in de verschillende niches van dezelfde locatie in het leidingnet.

TABEL 1 DE TECHNISCHE GEGEVENS VAN DE DISTRIBUTIEPUNTEN VAN DE LOCATIES KRALINGEN EN BRAAKMAN DIE IN 2014 EN 2015 ZIJN ONDERZOCHT (ALLE LEIDINGSTUKKEN 110 MM PVC-U)

	Locatie <sup>a</sup>	Datum	Temp. (°C)	Code	Lengte tot PS. (m)	Opp. (m <sup>2</sup> )	±Verblijftijd (h)
Av. Concordia	KRA	25/11/2014	10,4	1-KRA1	gg <sup>b</sup>	gg	0–10 <sup>c</sup>
Bernhardlaan	KRA	26/11/2014	11,1	1-KRA2	Gg	gg	20–30 <sup>c</sup>
Donizettilaan	KRA	24/08/2015	20,2	2-KRA3	7955	24989	20
Gekr. Haringpad	KRA	25/08/2015	20,2	2-KRA4	9134	30746	26
Malisingel	KRA	31/08/2015	18,8	2-KRA5	21749	65806	43
Oude IJsbaan	KRA	31/08/2015	18,4	2-KRA6	21692	65166	40
Herkingen	OUD/BPL	18/02/2015	7,0	-	gg	gg	40–70 <sup>c</sup>
Sluis	BRA	04/03/2015	6,9	1-BRA1	gg	gg	40–70 <sup>c</sup>
IJzendijke	BRA	07/09/2015	18,4	2-BRA2	13554	17900	60
Eede	BRA	07/09/2015	18,2	2-BRA3	36991	43439	60

<sup>a</sup> KRA = Kralingen; BRA = Braakman; OUD = Ouddorp/Berenplaat; <sup>b</sup> gg = geen gegevens; <sup>c</sup> geschat en rest berekend

TABEL 2 DE VERSCHILLENDE MONSTERS EN DE ANALYSES DIE HIEROP ZIJN UITGEVOERD

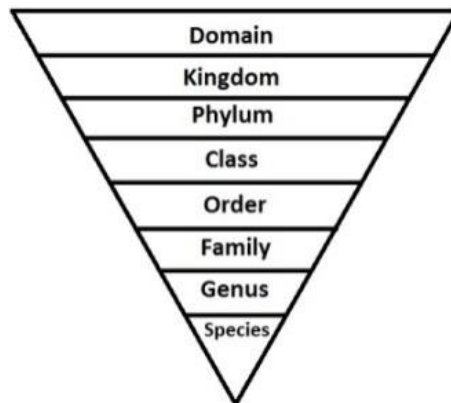
	Dierlijke organismen	Microbiologisch ATP/kweek	Moleculair <sup>a</sup>
Watermonster op locatie		ATP, Aer, KG22	NGS,qPCR
Spuimonster ongefiltreerd		ATP, Aer, KG22	NGS,qPCR
Spuimonster Gefiltreerd <30 µm		ATP, Aer	NGS,qPCR
Sed. 30–100 µm	DO	Aer	NGS,qPCR
Sed. 100– 500 µm	DO	Aer	NGS,qPCR
Sed. >500 µm	DO		
Buiswand swab 4x gepoold		ATP, Aer, KG22	NGS,qPCR
Buiswand TandBorstel		ATP, Aer, KG22	

<sup>a</sup> DNA isolatie en NGS en q-PCR *Aeromonas* en *Asellota*

## 3 Resultaten en discussie

De NGS analyses geven een uitgebreid beeld van de bacteriepopulatie die in een monster aanwezig is. Van elk monsters wordt elke geanalyseerde sequentie (in dit onderzoek gem. 69.678) door middel van fylogenering (ook wel genoemd biologische barcoding) geïdentificeerd (taxonomisch op naam brengen). Bij fylogenering wordt elke sequentie vergeleken met een referentiesequentiedatabase die internationaal beschikbaar is en vervolgens taxonomisch ingedeeld op basis van de gelijkheid met de referentiesequentie.

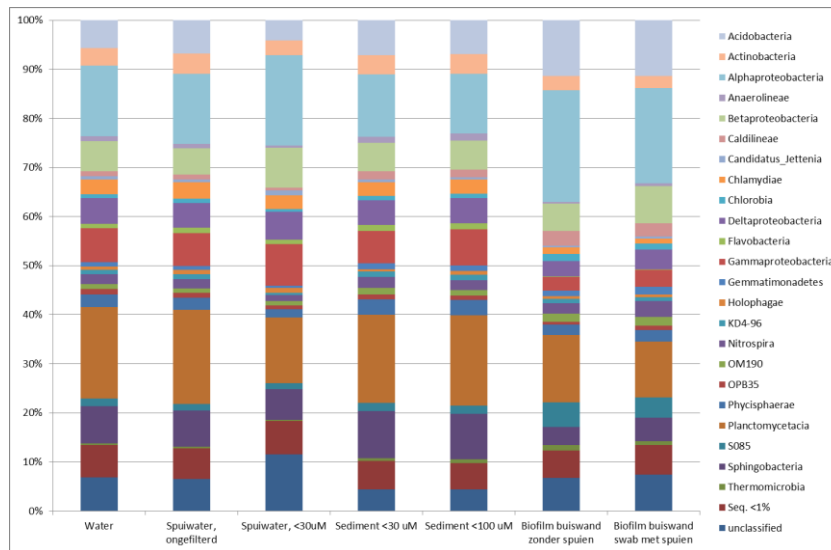
Het taxonomisch niveau waarop de sequenties op naam kunnen worden gebracht hangt af van (1) de lengte van het geanalyseerde DNA-fragment en (2) de aanwezigheid van overeenkomende sequenties in de referentiedatabase (figuur 1). De lengte van het geïdentificeerde 16S rRNA gen-fragment is zo gekozen dat het met de huidige technische mogelijkheden van NGS DNA-sequentieanalyse een optimaal betrouwbaar resultaat geeft en tevens voldoende informatie om de sequenties te identificeren. De betrouwbaarheid van de identificatie hangt ook af van de beschikbaarheid van overeenkomende sequenties in de referentiedatabase ([www.arb-silva.de](http://www.arb-silva.de)) op basis waarvan de geanalyseerde sequenties zijn geïdentificeerd. Indien op bijvoorbeeld genusniveau een overeenkomende referentiesequentie ontbreekt zal de sequentie op dit niveau als "onbekend" worden getypeerd. Voor het geanalyseerde 16S rRNA genfragment is dit redelijk goed en is de identificatie van de sequenties betrouwbaar. Daarnaast is de mate van sequentiediversiteit per klasse/order/familie ook verschillend. De familie van de enterobacteriaceae is bijvoorbeeld onderling zeer verwant. Het hangt dus van verschillende factoren af tot welk taxonomisch niveau een DNA-fragment kan worden geïdentificeerd.



FIGUUR 1: TAXONOMISCHE PYRAMIDE

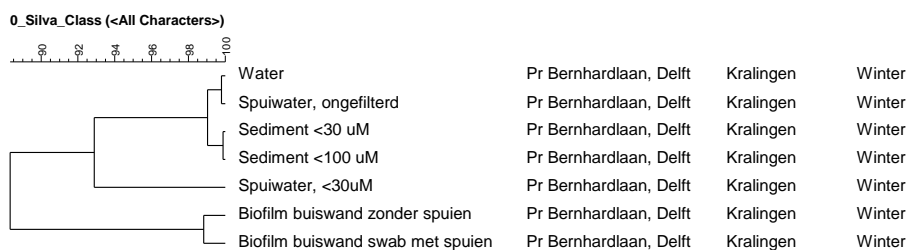
In dit onderzoek is gekozen om de bacteriepopulaties in de verschillende geanalyseerde niches tot op klassenniveau te identificeren. Op dit niveau is het percentage DNA-sequenties dat kan worden geïdentificeerd zeer hoog. Per vergeleken niche zijn twee analyses weergegeven. Een staafdiagram waarin het percentage van de verschillende geïdentificeerde bacterieklassen per monster is weergegeven. Als voorbeeld zijn in figuur 2 de verschillende bacteriegroepen weergegeven die zijn geïdentificeerd in de verschillende spuiwater/sediment/biofilm uit de locatie Pr. Bernhardlaan in Delft. Uit dit figuur blijkt dat het percentage niet geïdentificeerde sequenties (unclassified) laag is (4,4-11,6%). De verschillende klassen zijn in alfabetische volgorde in de staafdiagram geplaatst. Voor de

leesbaarheid zijn alleen de belangrijkste bacteriepopulaties weergegeven die >1% van het totaal aantal geïdentificeerde sequenties vertegenwoordigen.



FIGUUR 2 DOMINANTE OP KLASSE-NIVEAU GEÏDENTIFICEERDE BACTERIEPOPULATIES (> 1%) IN (SPUI)WATER, SEDIMENT EN BIOFILM BEMONSTERD IN DE WINTERPERIODE OP LOCATIE PR. BERNHARDLAAN IN DELFT UIT HET LEIDINGNET VAN KRALINGEN

Naast het op naam brengen van de aanwezige bacteriën in de monsters geeft de NGS methodiek en de identificatie van de bacteriepopulatie ook de mogelijkheid om de samenstelling van de verschillende bacteriepopulaties op overeenkomst te vergelijken. Het resultaat van deze analyse wordt weergegeven in een dendrogram (boomdiagram, figuur 3 waarin populaties die een grote mate van overeenkomst vertonen dicht bij elkaar worden geclusterd (horizontale afstand). De mate van overeenkomst in populatiesamenstelling wordt in een percentage overeenkomst uitgedrukt. De onderlinge verwantschap kan op verschillende niveaus van de sequentie-identificatie worden berekend. In figuur 3 is als voorbeeld de monsters afkomstig van de Pr. Bernhardlaan onderling vergeleken op klasseniveau. De dendrogrammen berekend op de verschillende niveaus van taxonomische identificatie (Phylum, Class, Order, Family en Genus) zijn weergegeven in Bijlage 1a.



FIGUUR 3: DENDOGRAM VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN IN (SPUI)WATER, SEDIMENT EN BIOFILM AFKOMSTIG VAN DE PR BERNHARDLAAN UIT HET LEIDINGNET VAN KRALINGEN BEREKEND OP KLASSE-NIVEAU

Uit het dendrogram is af te lezen dat de bacteriepopulaties van het water, spuiwater (ongefilterd), sediment <30µm en sediment <100µm voor ±99% overeenkomen. De bacteriepopulatie van het spuiwater <30µm komt ±93% overeen met de bacteriepopulatie

van het water/spuiwater/sediment. De bacteriesamenstelling van de biofilmmonsters van de buiswand clustert onderling samen met  $\pm 98\%$ . Dit cluster komt  $\pm 88\%$  overeen met de clusters van de bacteriepopulaties van de water/spui/sediment monsters.

Deze percentages zijn gebaseerd op een onderlinge vergelijking van de in dit figuur vergeleken zeven populaties. Het is niet mogelijk deze percentages tussen figuren te vergelijken die zijn berekend op basis van verschillende selecties van monsters. De percentages veranderen per selectie van monsters gebaseerd op hun onderlinge relatieve verschillen. Deze percentages zijn immers berekend op basis van de aanwezige verschillen in de geanalyseerde monsters. In het rapport zullen de verschillende populatiesamenstellingen van de monsters kwalitatief worden besproken vanuit een vooraf gekozen selectie van monsters, waarbij de percentages alleen worden gebruikt om de mate van relatieve onderlinge verschillen per selectie van monsters aan te duiden. Een nuanciering bij de bespreking van de verschillen is dat deze zich richten op de populatiesamenstelling, er is daarnaast echter ook een duidelijk verschil in populatiedichtheid in de verschillende niches.

In dit rapport wordt bij elke analyse van een specifieke niche zowel een staafdiagram weergegeven van de geïdentificeerde bacterieklassen als een dendrogram waarin de populaties onderling zijn geclusterd. De doelstellingen van dit onderzoek is om de verschillende niches in het leidingnet met elkaar te vergelijken en om deze reden worden de dendrogrammen in dit rapport nader besproken en worden de staafdiagrammen niet besproken en ter illustratie weergegeven in de bijlagen.

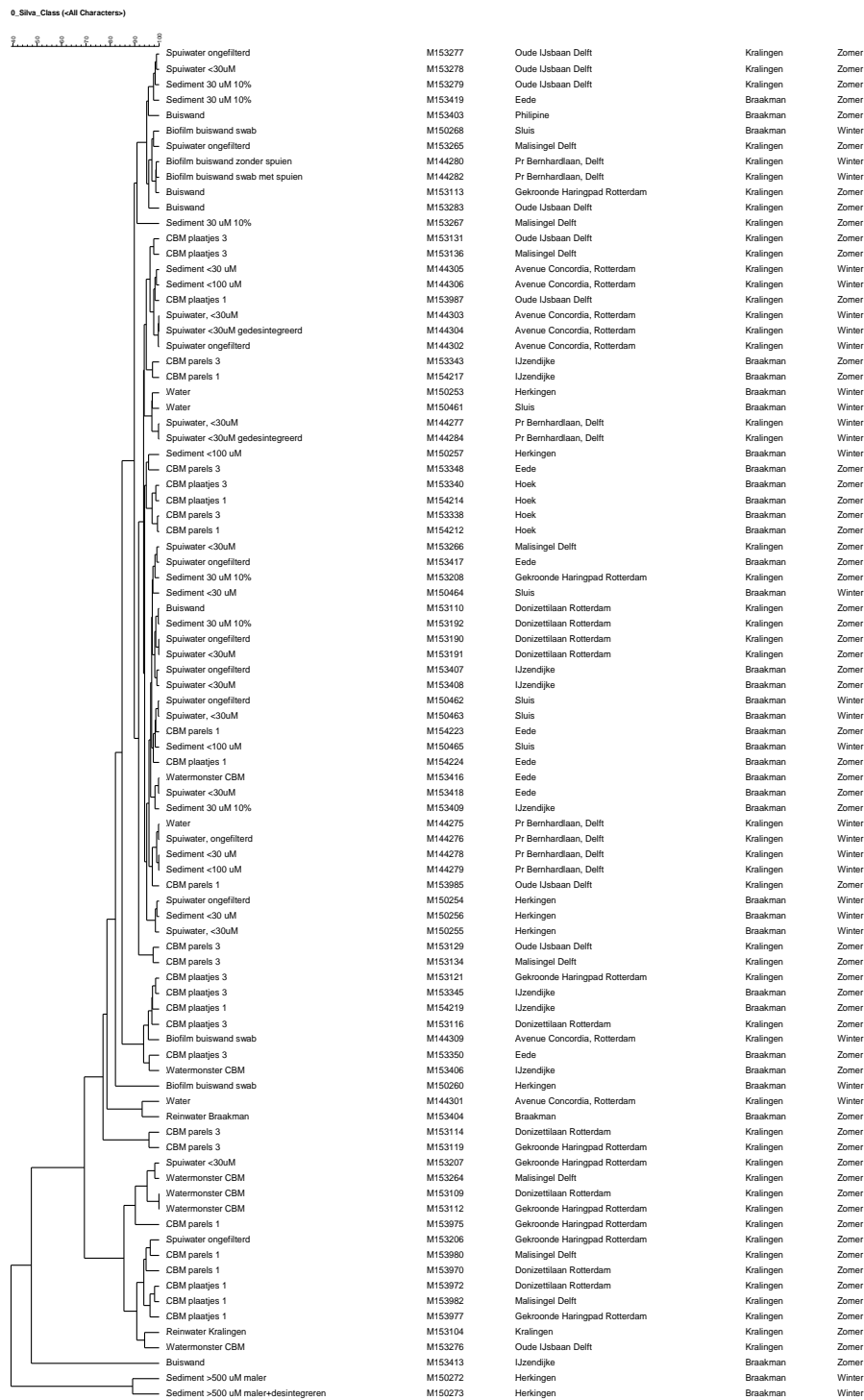
### 3.1 NGS analyse interpretatie

De NGS analyses in dit onderzoek hebben geresulteerd in gemiddeld 69.678 DNA-sequenties van hoge kwaliteit met een spreiding van 26.179, een max. aantal van 126.380 en een min. aantal van 5.011 sequenties (zie details in bijlage II).

### 3.2 NGS analyse alle monsters

In Figuur zijn alle bacteriepopulaties die in de twee onderzoeken zijn geanalyseerd onderling vergeleken op mate van overeenkomst. Opvallend is dat de drie monsters onderin de dendrogram, sediment  $>500 \mu\text{m}$  en de biofilm van IJzendijke, niet clusteren met de overige monsters. Dit wordt veroorzaakt doordat de bacteriepopulatie in het buiswandmonster van IJzendijke (M153413) voor 29% bestaat uit onbekende *Pseudonocardineae* en de twee sedimentmonsters met grotere deeltjes ( $>500\mu\text{m}$ ) afwijkende bacteriepopulaties bevatten (40% overeenkomst). Figuur A is te uitgebreid om hiermee de NGS gegevens van de verschillende populaties per locatie en de locaties onderling goed te kunnen interpreteren. Daarom zijn de volgende deelverzamelingen van de monsters gemaakt om daarmee de onderzoeksvragen te kunnen beantwoorden:

- De populaties van de niches per distributielocatie inclusief het water 'af pompstation';
- De populaties per niche van de verschillende monsterpunten in beide distributiesystemen;
- De populaties in de CBM monsters: dynamiek in de tijd en in vergelijking tot de populaties in sediment en op de buiswand.



FIGUUR 4A DENDROGRAM VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN IN (SPUI)WATER, SEDIMENT EN BIOFILM AFKOMSTIG UIT HET LEIDINGNET VAN KRALINGEN EN BRAAKMAN



### 3.3 NGS analyse van alle niches per distributielocatie en het water 'af pompstation'

#### 3.3.1 Eerste serie monsters van de winter

Van de eerste serie monsters afkomstig van de vier locaties en de verschillende niches in het voorzieningsgebied van Kralingen en Braakman die in de winter zijn genomen is per locatie een staafdiagram weergegeven van de dominant geïdentificeerde bacteriepopulaties (>1%) en is een dendrogram berekend die de verschillen in bacteriesamenstelling tussen de monsters weergeeft (Figuur 1, Figuur 2, Figuur 3, Figuur 4). In Tabel 3 is voor iedere locatie het percentage van de actieve bacteriepopulatie gemeten als ATP in de verschillende niches (water, biofilm, spuiwater (fijn sediment) en sediment vermeld (uitgerekend in  $\mu\text{g}$  ATP per meter buislangte (rond 110 mm). Uit de gegevens blijkt dat het aandeel ATP in het water bij de locaties laag is.

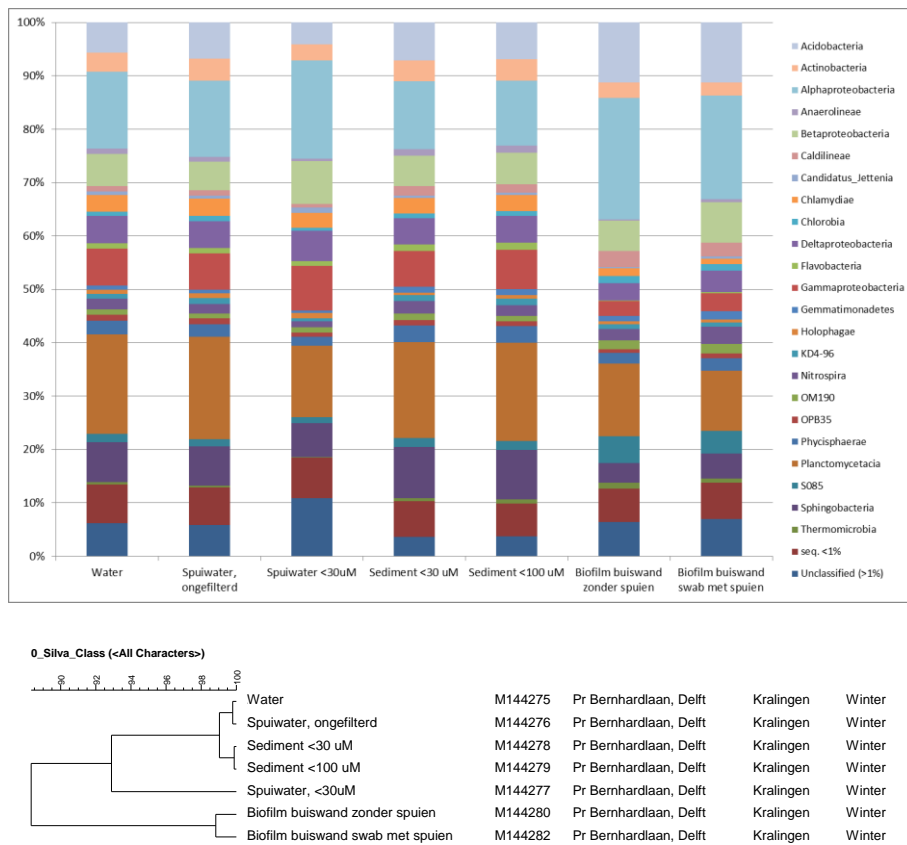
TABEL 3 VERDELING IN PERCENTAGE VAN ATP ( $\mu\text{g}/\text{M}$ ) IN VERSCHILLENDE NICHES VAN DE MONSTERPUNTEN IN DE WINTERPERIODE

	Bernhardlaan	Av. Concordia	Sluis	Herkingen
Temperatuur	10,4°C	11,1°C	6,9°C	7,0°C
Drinkwater	<0,1	2,3	<0,1	<0,1
Biofilm	97,9	51,2	98,6	77,4
Spuiwater <30 $\mu\text{m}$	2,1	47,7	1,0	14,1
Sediment	Nb <sup>a</sup>	nb	0,4	8,5

<sup>a</sup> nb = niet bepaald

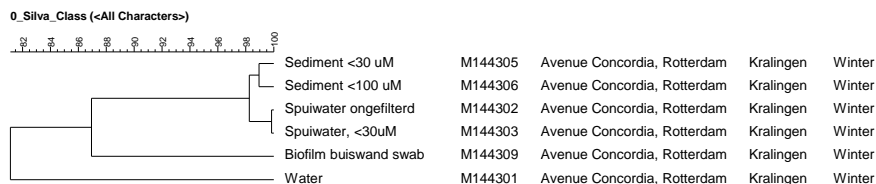
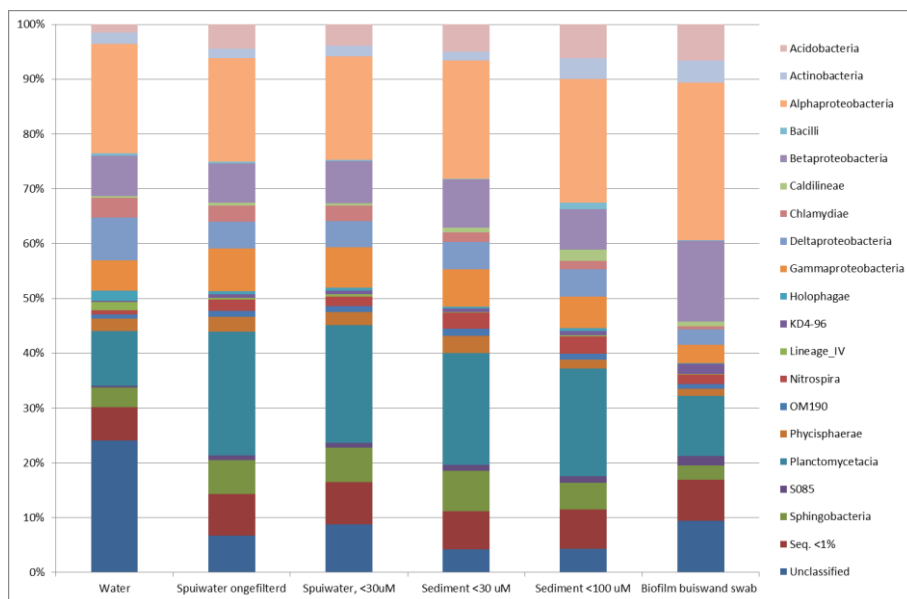
Bij de Bernhardlaan en Sluis wordt de hoogste ATP aandeel gevonden in de biofilm op de buiswand (resp. 97,9 en 98,6%). Bij de Avenue Concordia is de verdeling van ATP ca. 50% op de buiswand en 50% in het fijne sediment (spuiwater) en bij Herkingen is de ATP-verdeling over buiswand en sediment/spuiwater ca. 70-30%.

Bij deze monsters is een vergelijking van de bacteriepopulatie in het drinkwater 'af pompstation' en in het distributiesysteem niet mogelijk (in de monsterserie die in de winterperiode is bemonsterd is dit punt niet meegenomen). Het dendrogram van de monsters genomen op de Bernhardlaan wijken af van de overige locaties door een sterke mate van overeenkomst tussen de bacteriepopulaties in het water, totale spuiwater en sediment ( $\geq 99\%$ ) en een hiervan sterke afwijkende populatie in het fijne sediment (spuiwater <30) en de biofilm. Een mogelijke verklaring is het feit dat de spuiactie niet goed is verlopen: de spuisnelheid is door een verkeerde afsluiter manipulatie voor een deel van het monster te laag geweest (0,5 i.p.v. 1,0 m/s). Uit de vergelijking van de verschillende populaties geïdentificeerd in de monsters (staafdiagram) en de clustering (dendrogram) blijkt dat in de monsters overwegend dezelfde klassen van bacteriën zijn geïdentificeerd maar dat de verschillen tussen de monsters in de dendrogrammen met name wordt veroorzaakt door veranderende dominantie (%) en minder door het verdwijnen of opkomen van nieuwe klassen. Dit beeld wordt in de andere monsters van deze serie ook gezien.

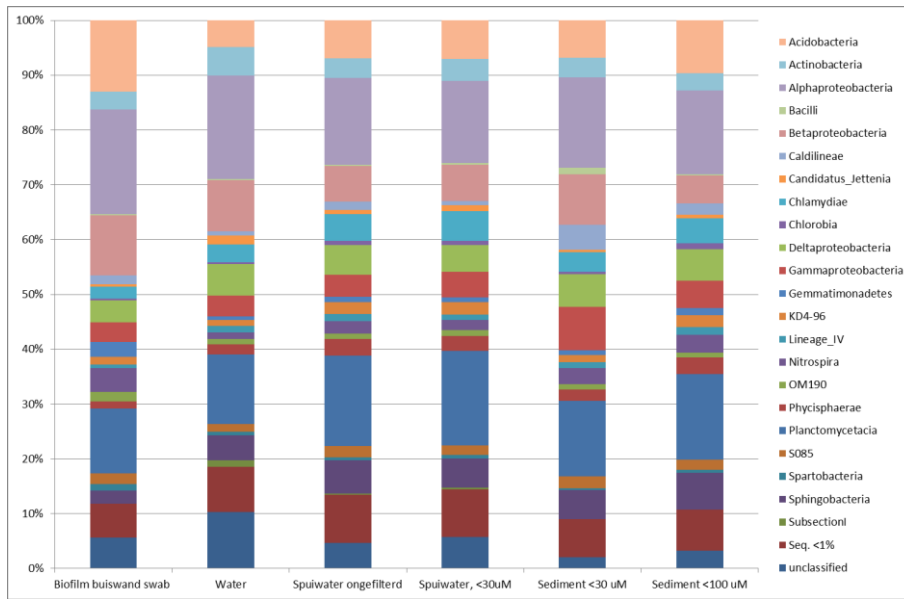


FIGUUR 1 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (> 1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN IN (SPUI)WATER, SEDIMENT EN BIOFILM BEMONSTERD IN DE WINTERPERIODE OP LOCATIE PR. BERNHARDLAAN IN DELFT UIT HET LEIDINGNET VAN KRALINGEN

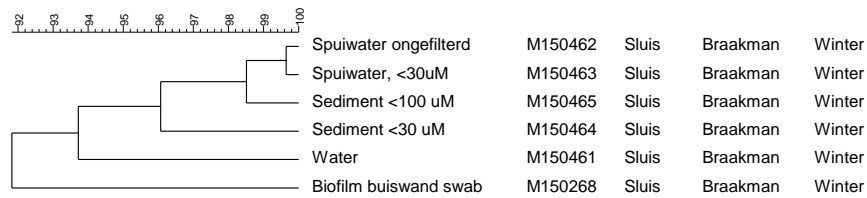
Op de overige locaties clusteren de spuiwater- en sedimentmonsters ook sterk samen. Bij alle locaties van deze serie wijken de bacteriepopulaties in de biofilms het meeste af van de populaties in het water en het sediment. Bij Av. Concordia wordt de grootste afwijking gevonden tussen de populaties in het water enerzijds en de populaties in biofilm en sediment. Bij de andere locaties lijkt de bacteriepopulatie in het water meer op die in het sediment dan die in de biofilm. Samengevat kan op basis van deze vier locaties worden geconcludeerd dat de populatieovereenkomst tussen de verschillende monsters vrij groot is (minimale percentage overeenkomst van 81% bij Av. Concordia) en er drie verwante maar toch duidelijk verschillende niches kunnen worden onderscheiden: het losse sediment; de biofilm en het water.



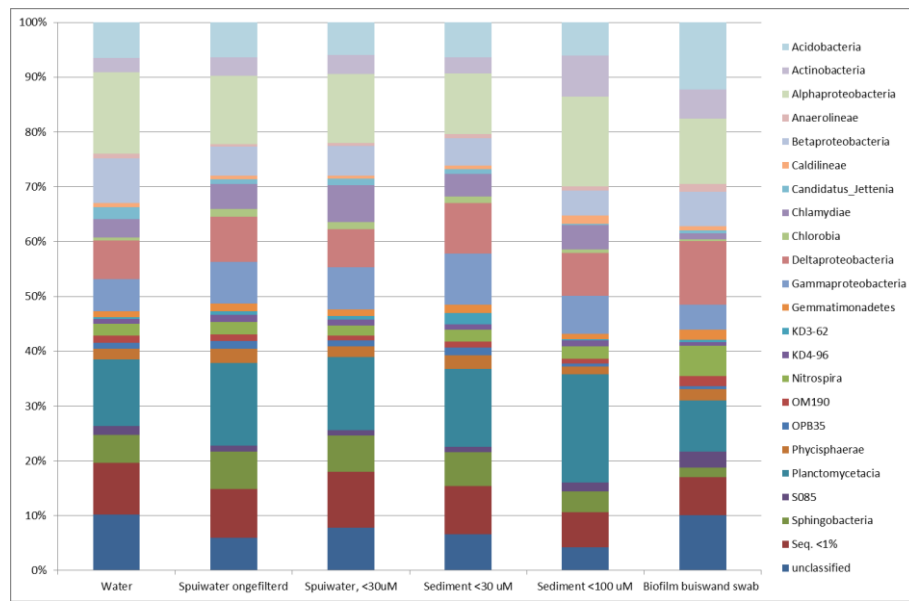
FIGUUR 2 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (>1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN IN (SPUI)WATER, SEDIMENT EN BIOFILM BEMONSTERD IN DE WINTERPERIODE OP LOCATIE AVENUE CONCORDIA IN ROTTERDAM UIT HET LEIDINGNET VAN KRALINGEN



0\_Silva\_Class (<All Characters>)



FIGUUR 3 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (> 1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN IN (SPUI)WATER, SEDIMENT EN BIOFILM BEMONSTERD IN DE WINTERPERIODE OP LOCATIE SLUIS UIT HET LEIDINGNET VAN BRAAKMAN



FIGUUR 4 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (>1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN IN (SPUI)WATER, SEDIMENT EN BIOFILM BEMONSTERD IN DE WINTERPERIODE OP LOCATIE HERKINGEN UIT HET LEIDINGNET VAN OUDDORP

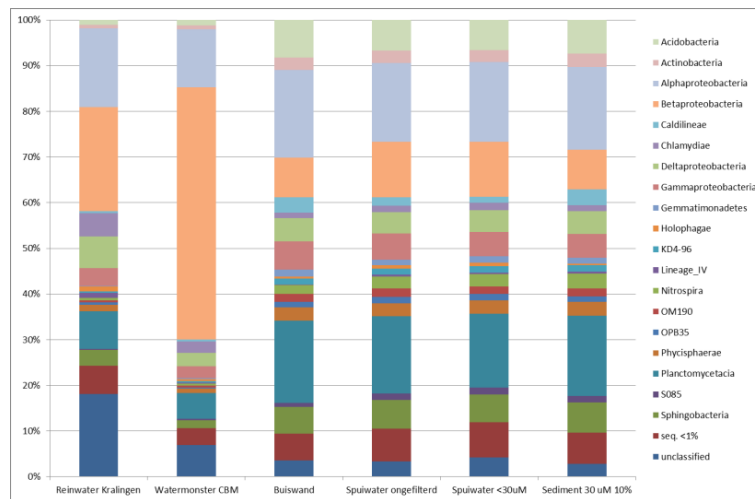
### 3.3.2 Tweede serie DNA monsters van de zomer: Kralingen

De dendrogrammen van de tweede serie monsters uit het distributiegebied van Kralingen in de zomerperiode zijn weergegeven in Figuur 5 en Figuur 6 en van de ATP-gegevens in Tabel 4. Uit de gegevens van de ATP-verdeling over de verschillende niches blijkt dat de ATP-concentraties van de biofilm op de buiswand op de Donizettilaan en Gekroonde Haringpad (beide locaties met een verblijftijd van ca. 24 uur) hoger zijn dan van de biofilm op de buiswand op de Malisingel en Oude Ijsbaan (ca. 40 uur verblijftijd). Op die locatie wordt het hoogste ATP aandeel gevonden in het grotere en fijne sediment (spuiwater <30um).

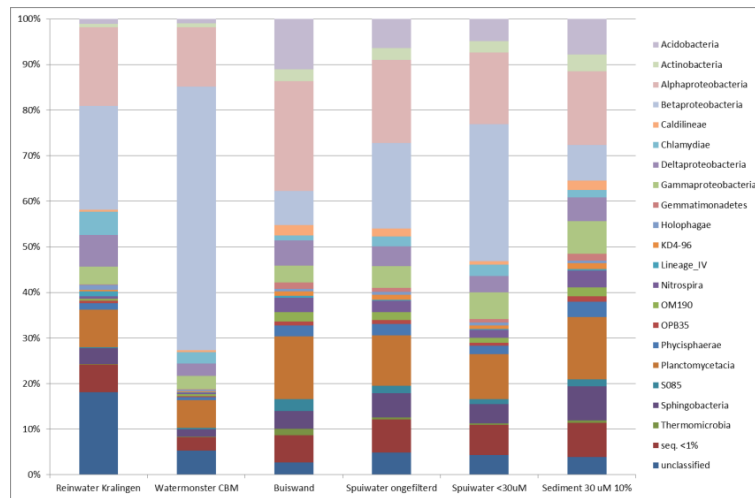
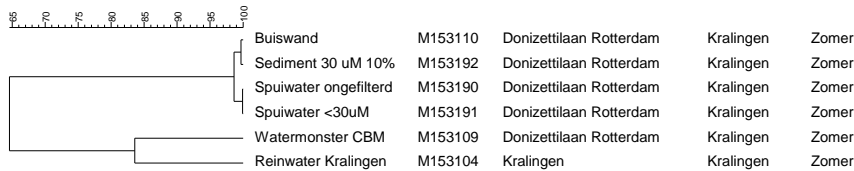
TABEL 4 ATP VERDELING IN VERSCHILLENDE NICHE VAN DE MONSTERPUNTEN VAN DE LOCATIE KRALINGEN (ZOMER)

	Donizettilaan	Gekr. Haringpad	Malisingel <sup>a</sup>	Oude Ijsbaan
Temperatuur	20,2°C	20,2°C	18,8°C	18,4°C
Drinkwater CBM	<0,1	<0,1	<0,1	nb
Biofilm	54,5	97,3	21,6	24,1
Spuiwater <30 µm	32,9	0,0	29,2	17,4
Sediment	12,7	2,6	49,2	58,5

<sup>a</sup> geen DNA monster beschikbaar



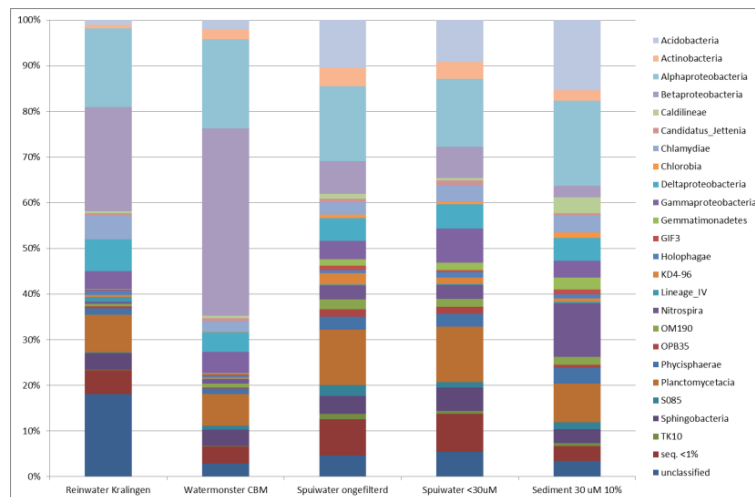
0\_Silva\_Class (<All Characters>)



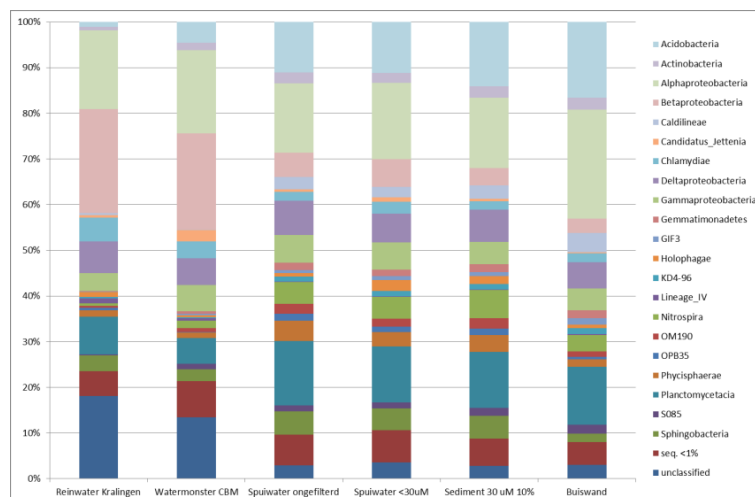
0\_Silva\_Class (<All Characters>)



FIGUUR 5 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (> 1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN IN (SPUI)WATER, SEDIMENT EN BIOFILM BEMONSTERD IN DE ZOMERPERIODE VAN 2015 OP LOCATIE DONIZETTILAAN (BOVEN) EN GEKROONDE HARINGPAD (ONDER) UIT HET LEIDINGNET VAN KRALINGEN



0. Silva\_Class (<All Characters>)



0. Silva\_Class (<All Characters>)



FIGUUR 6 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (> 1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN IN (SPUI)WATER, SEDIMENT EN BIOFILM BEMONSTERD IN DE ZOMERPERIODE VAN 2015 OP LOCATIE MALIESINGEL (BOVEN) EN OUDE IJSBAAN DELFT (ONDER) UIT HET LEIDINGNET VAN KRALINGEN

De onderlinge procentuele overeenkomst weergegeven met de schalen zijn in deze serie monsters van de zomer kleiner (>60%) dan in de winter (minimaal 81%). Dit is mogelijk verklaarbaar door de hogere watertemperatuur en mogelijk meer of ander voedselaanbod in de verschillende tijden van het jaar waardoor er in de zomer waarschijnlijk meer biologische



activiteit optreedt maar ook met een grotere diversiteit. Bij deze tweede serie DNA monsters is een populatievergelijking mogelijk tussen het water 'af pompstation' en op de verschillende locaties in het distributiesysteem. Hieruit blijkt dat de bacteriepopulatie in het drinkwater tijdens het verblijf in het distributiegebied verandert op drie van de vier locaties met 5–15%. In de bacteriepopulaties van het drinkwater uit de CBM worden de Betaproteobacteriën erg dominant. De klasse van Betaproteobacteria is een diverse groep van gram negatieve bacteriën die in staat zijn vele verschillende componenten in het water af te breken. Dit is nog niet eerder waargenomen in monsters die zijn geanalyseerd (persoonlijke mededeling, Paul van der Wielen) en zien we ook niet in monsters die zijn genomen in de winter. Het water is afkomstig van een continue doorstroomde aansluitleiding van de CBM op de distributieleiding en kan zijn beïnvloed door biofilm in die aanvoerleiding (niet door de biofilm in de cuvetten). Omdat deze leiding echter met gedurende maanden is doorspoeld geweest met het drinkwater lijkt dat niet erg waarschijnlijk, maar natuurlijk niet geheel uitgesloten. Overigens zou dit gelden voor alle mogelijke aansluitingen op de distributieleiding om daaruit drinkwater te bemonsteren.

In de parels van de CBM zie je ook een dominantie van Betaproteobacteriën in Donizettilaan, Gekroond Haringpad en Malisingel. De biofilmontwikkeling kan ook beïnvloed zijn geweest door de aanvoerleiding. Omdat de biofilm condities over de looptijd een duidelijke trend laat zien die verband houdt met water temperatuur en waterkwaliteit lijkt dit niet erg aannemelijk waardoor de drinkwatermonsters als reëel kunnen worden beschouwd.

Opmerkelijk is dat het verschil tussen de populatie in het drinkwater 'af pompstation' en in het water op de Oude Ijsbaan na circa 40 uur verblijftijd het kleinst (ca. 10%) is. Tevens blijkt in de dendrogram waarin alle monsters die in dit onderzoek zijn geanalyseerd dat de drinkwaterpopulaties op alle locaties geen duidelijke overeenkomsten vertonen met populaties die op de buiswand en in het sediment voorkomen maar wel met de biofilm op de CBM parels (figuur 4A). Deze waarneming past in het beeld dat adsorptie van biomassa uit het water in de parels van de CBM een bijdrage levert aan de accumulatie van biofilm en bevestigd is uit de adsorptie van *Aeromonas* uit het in de biofilm van zowel de plaatjes als de parels (Hijnen en Bahlman, 2016).

Op de locatie Gekroond Haringpad (Tabel 4) is de bacteriepopulatieovereenkomst het sterkst tussen biofilm en het grote sediment (>30 µm) (Figuur 8). De populaties in het fijne sediment (spuiwater) en het water wijken daar sterk van af (>50%). Bij de Malisingel (geen buiswand DNA monster geanalyseerd) wijken de populaties in water en sediment sterk af (>50%) en ook in het fijne en grote sediment zijn de overeenkomsten relatief beperkt (80%). Bij de Maliesingel en Oude Ijsbaan is de overeenkomst in populaties tussen biofilm en fijn en groot sediment weer hoog (≥88 en ≥95%) en duidelijk afwijkend van de populaties in het water (>60%).

### 3.3.3 Tweede serie DNA monsters van de zomer: Braakman

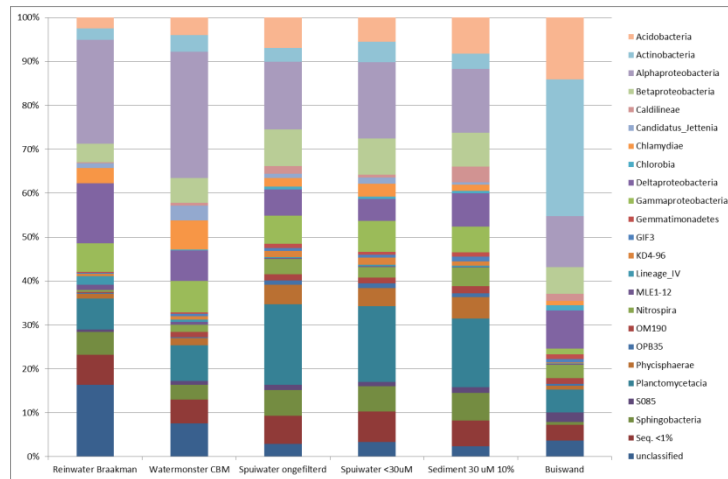
De dendogrammen van de tweede serie monsters uit het distributiegebied van Braakman zijn weergegeven in Figuur 7. Belangrijkste bacteriepopulaties (>1%) (boven) en dendogram (onder) van de bacteriële gemeenschappen in (spui)water, sediment en biofilm bemonsterd in de zomerperiode van 2015 op locatie op locatie IJzendijke (Boven) en Eede (onder) uit het leidingnet van Braakman. Uit de ATP gegevens in Tabel 5 blijkt dat het merendeel van de actieve biomassa op de twee geanalyseerde locaties in het distributiesysteem van Braakman zich in de biofilm bevindt. Bij IJzendijke is het percentage hoger (95,6%) dan in Eede (75,1%).

Net als bij Kralingen wijken bij Braakman de bacteriepopulaties in het water 'af pompstation' af van de bacteriepopulaties in het water bemonsterd uit de CBM op de twee locaties in het

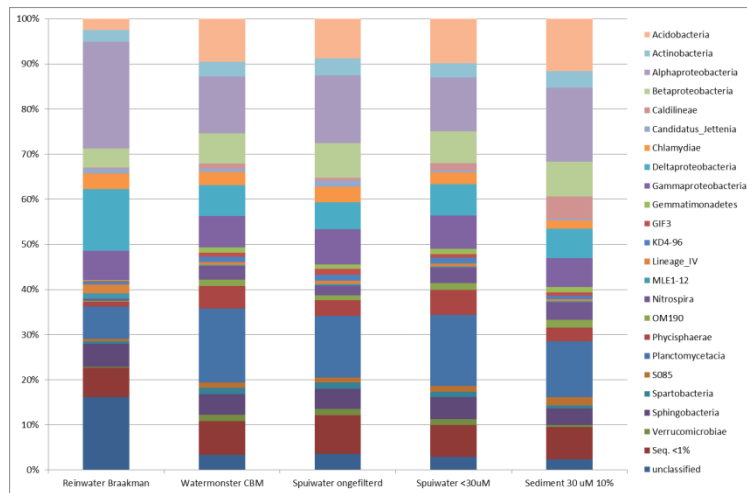
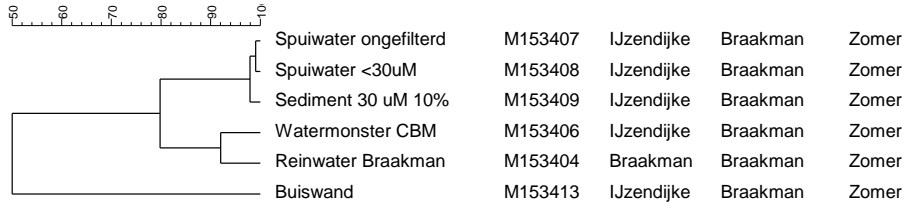
distributiesysteem. De populaties in het water bij IJzندیke wijken sterk af van de populaties in de biofilm (>50%) en het sediment (>20%). Bij Eede (ook hier geen DNA monster van biofilm geanalyseerd) wordt een sterke overeenkomst in de bacteriepopulatie tussen het water en het fijne (>95%) en in mindere mate met het grotere sediment (>93%) waargenomen.

TABEL 5 ATP-CONCENTRATIE (ATP IN %) PER ??? IN VERSCHILLENDE NICHES VAN DE MONSTERPUNTEN VAN DE LOCATIE BRAAKMAN (ZOMER)

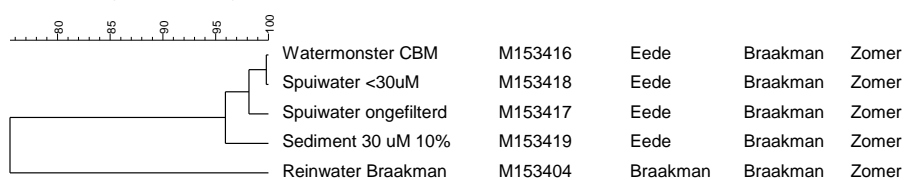
	IJzندیke	Eede
Temperatuur drinkwater	18,4°C	18,2°C
Drinkwater CBM	<0,1	<0,1
Biofilm	95,6	75,1
Spuiwater <30 µm	2,4	7,4
Sediment	2,0	17,5



0\_Silva\_Class (<All Characters>)



0\_Silva\_Class (<All Characters>)



FIGUUR 7 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (> 1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN IN (SPUI)WATER, SEDIMENT EN BIOFILM BEMONSTERD IN DE ZOMERPERIODE VAN 2015 OP LOCATIE OP LOCATIE IJZENDIJKE (BOVEN) EN EEDE (ONDER) UIT HET LEIDINGNET VAN BRAAKMAN

### 3.3.4 Samenvatting van de bevindingen per locatie

Samenvattend kan op basis van deze beperkte dataset over de overeenkomsten en verschillen in de bacteriepopulatiesamenstelling geanalyseerd in de niches water, biofilm en fijn en groot sediment worden geconcludeerd dat

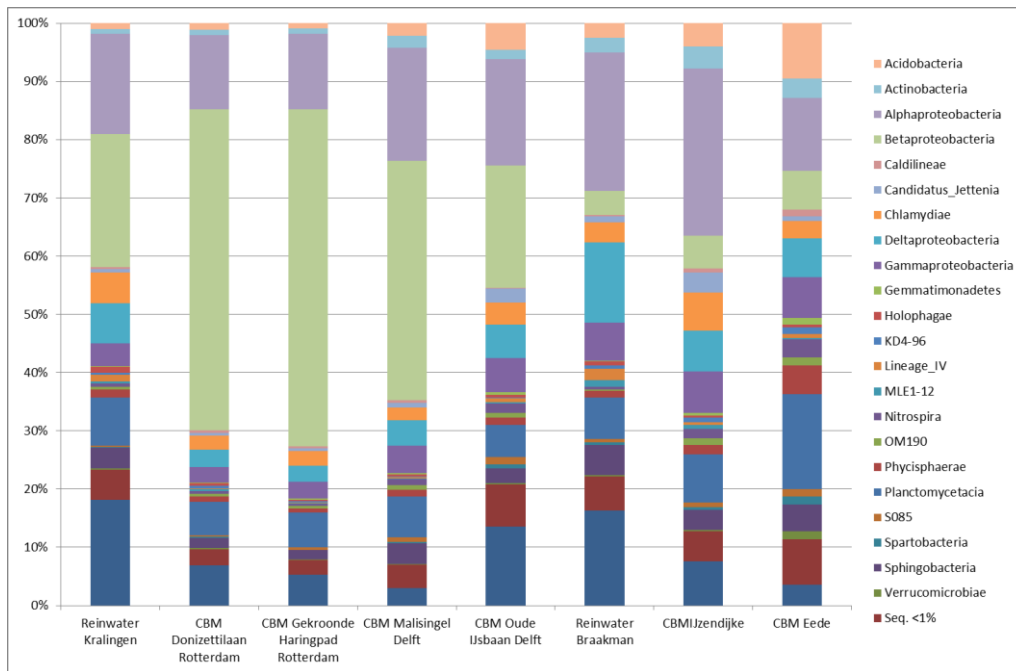
- De bacteriepopulaties in het water 'af pompstation' vaak afwijken van het water dat is bemonsterd in het distributiegebied;
- Er grote verschillen zijn tussen de populaties in het water enerzijds en die in het sediment en de biofilm anderzijds;
- Van de 8 monsters waar de biofilm is geanalyseerd er twee locaties van Kralingen in de zomer zijn waar de bacteriepopulaties in de biofilm op de buiswand duidelijk overeenkomsten vertonen met de bacteriepopulaties in het sediment.
- De bacteriepopulaties in de spuimonsters met fijn sediment en de planktonnetmonsters met grof sediment zijn over het algemeen sterk overeenkomend.

## 3.4 Analyse van de NGS gegevens van de afzonderlijke niches van de locaties

### 3.4.1 Bacteriepopulaties in het water

Uit de vergelijking van de bacteriepopulaties in de verschillende watermonsters, af pompstation en in het distributienet van Braakman en Kralingen blijkt dat de watermonsters op basis van pompstation/herkomst in het dendrogram in twee clusters worden verdeeld (Figuur 8). De bacteriepopulaties in de watermonsters van de twee pompstations verschillen vrij veel van elkaar (56% overeenkomst). De bacteriepopulatiesamenstelling in alle watermonsters van Braakman en Kralingen hebben ongeveer een gelijke onderlinge overeenkomst van respectievelijk 75 en 85%. De locaties van Kralingen die op basis van verblijftijd zijn geselecteerd (Gekroonde Haringpad/Donizettilaan en (Malisingel/Oude Ijsbaan) worden in de dendrogram ook samen geclusterd. De populaties in het drinkwater van Kralingen met een verblijftijd van ongeveer 24 uur (locaties Donizettilaan en gekroonde Haringpad) zijn vrijwel identiek (>99% overeenkomend). De watermonsters met een verblijftijd van ongeveer 48 uur (Malisingel en Oude Ijsbaan) worden ook samen geclusterd maar hebben een lagere onderlinge overeenkomst (85%). Opvallend is dat de bacteriepopulatie in het reine water van Kralingen meer overeenkomt met de watermonsters met een langere verblijftijd (95%) dan met de watermonsters met een kortere verblijftijd (85%). Belangrijk hierbij is te noemen dat de beide locaties met gelijke verblijftijd op één dag zijn bemonsterd, maar de monsters van verschillende verblijftijd met een verschil van 6 dagen (Donizetti/Haringpad als eerste) van elkaar zijn bemonsterd. Deze resultaten laten zien dat de procedure van bemonstering (locatie en tijdstip) van groot belang is om betrouwbare conclusies te kunnen trekken.

Op basis van de beperkte dataset in dit onderzoek lijkt de populatiesamenstelling in het drinkwater voornamelijk bepaald te worden door (i) de herkomst (productielocatie) en dat de bacteriesamenstelling in mindere mate aan verandering onderhevig is gedurende (ii) het transport in het distributiegebied en dat die verandering waarschijnlijk ook afhankelijk is van (iii) de verblijftijd. De analyses geven alleen een richting aan, maar dat een grotere monstercampagne per distributiesysteem nodig is, om hier betrouwbaar iets over te kunnen zeggen. Wel kun je hier verwijzen naar andere studies die ook hebben laten zien dat de productielocatie belangrijk is in bepaling van de bacteriepopulatie.

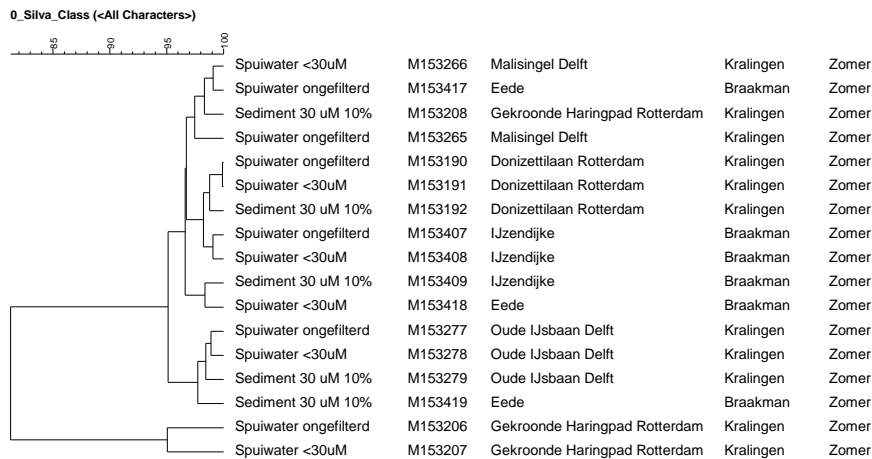
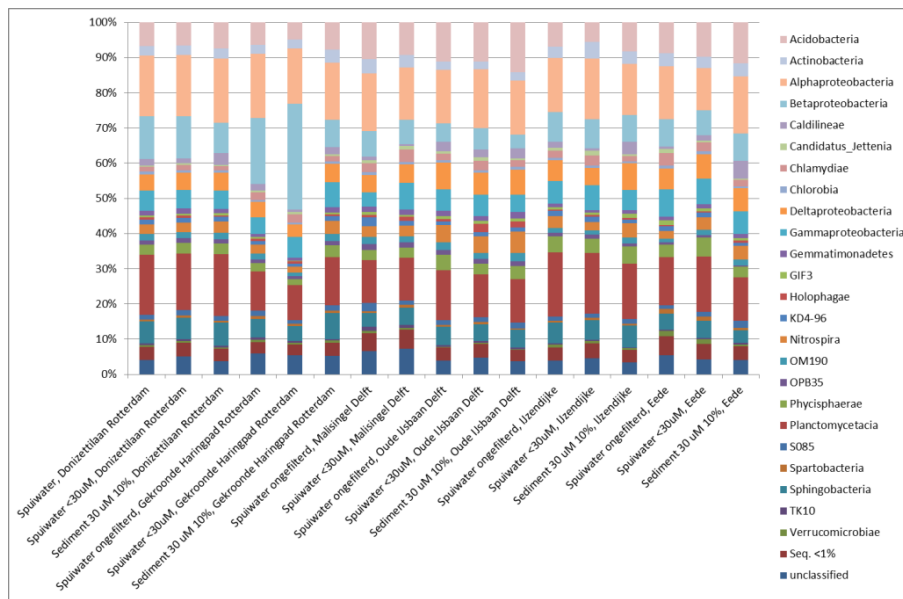


FIGUUR 8 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (>1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN VAN ALLE DRINKWATERS VAN KRALINGEN EN BRAAKMAN

### 3.4.2 Bacteriepopulaties in spuiwater en sediment

Uit het dendrogram van de verschillende spuiwater en sedimentmonsters van Kralingen en Braakman blijkt dat voor alle locaties, uitgezonderd gekroonde Haringpad, geldt dat de bacteriepopulaties met >95% een relatief opmerkelijke grote mate van overeenkomst hebben (Figuur 9).

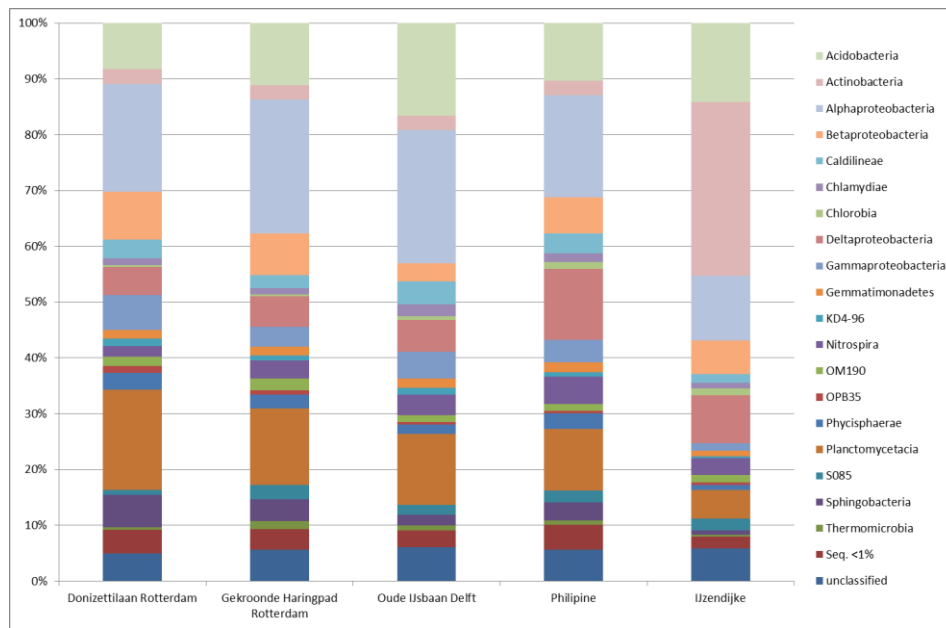
Het cluster van het fijne sediment uit de Gekroonde Haringpad heeft slechts een overeenkomst van 80% met de andere monsters. Bij de locatie Haringpad wijkt de bacteriepopulatie in het spuiwater (met en zonder voorfiltratie over 30 µm) het sterkst af van alle andere spuiwaters en sedimentmonsters. Bij deze locatie was de ATP verdeling anders met het hoogste percentage in de biofilm (Tabel 4) en week de bacteriepopulatie in deze biofilm en in het sediment 30 µm sterk af van de populaties in de andere niches (Figuur 5).



FIGUUR 9 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (> 1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN DENDOGRAM VAN ALLE SPUIWATER EN SEDIMENTMONSTERS VAN KRALINGEN EN BRAAKMAN (NGS ANALYSE SEDIMENT 30µM 10% MALISINGEL ROTTERDAM IS MISLUKT)

### 3.4.3 Bacteriepopulaties in de buiswandmonsters

De bacteriepopulaties in vier van de vijf verschillende biofilms op de buiswandmonsters van Kralingen en Braakman hebben een grote mate van overeenkomst (88%) (Figuur 10). In overeenkomst met de sedimentmonsters is dit opnieuw een indicatie dat de verschillen in lokale milieufactoren op grond van waterkwaliteit en leidingnetcondities tussen beide pompstations, geen aantoonbare invloed hebben op de samenstelling van de bacteriepopulatie in de biofilm. Onduidelijk is wat de achterliggende oorzaak is dat de bacteriepopulatie in IJzendijke zo sterk afwijkt van de andere biofilms. Er werd op deze locatie een hoog percentage (29%) Actinobacteria (Figuur 10) gevonden die bestond uit een onbekende *Pseudonocardineae* bacteriesoort (Bijlage 2). Dit punt blijkt door de ligging in het gebied een relatief hoge verblijftijd te hebben voor de afstand tot het pompstation (Hijnen en Bahlman, 2016). Herbemonstering van deze locatie (wordt gedaan in 2016) zou meer inzicht moeten geven of de bacteriepopulatie op deze locatie daadwerkelijk afwijkt of dat dit is veroorzaakt door bemonstering van een “minder” representatief monster.



0\_Silva\_Class (<All Characters>)



FIGUUR 10 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (>1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN VAN ALLE BUISWANDMONSTERS VAN KRALINGEN EN BRAAKMAN

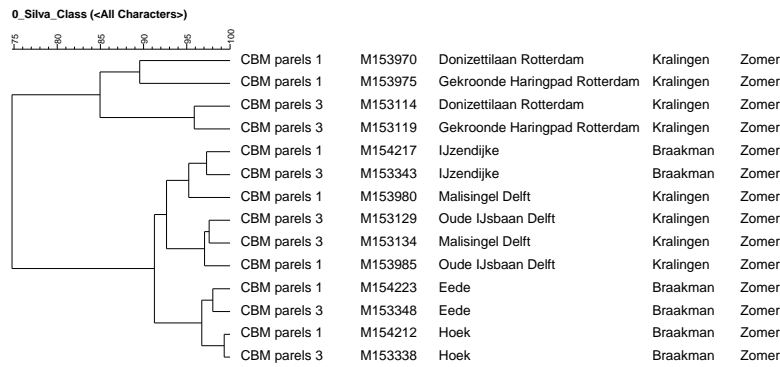
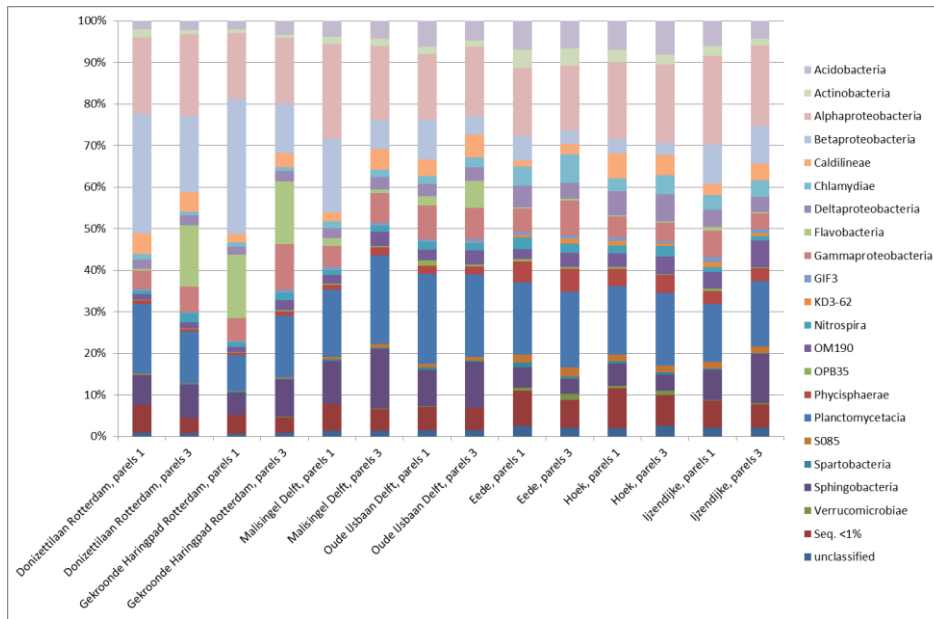
Samenvattend kan worden gesteld dat in tegenstelling tot het leidingwater de bacteriepopulaties in spuiwater, sediment en buiswand van de twee pompstations meer clusteren met een grotere overeenkomst. Dit zo erop kunnen duiden dat de bacteriesamenstelling in het niche “sediment, fijn en groot” en de biofilm op de buiswand opvallend overeenkomt en niet aantoonbaar wordt beïnvloed door de herkomst van het water en verschillen in lokale milieuomstandigheden van het leidingnet. De milieucondities in het sediment en biofilm van beide locaties zijn voor bacteriën kennelijk gelijk.



### 3.5 Bacteriepopulaties in de CBM monsters

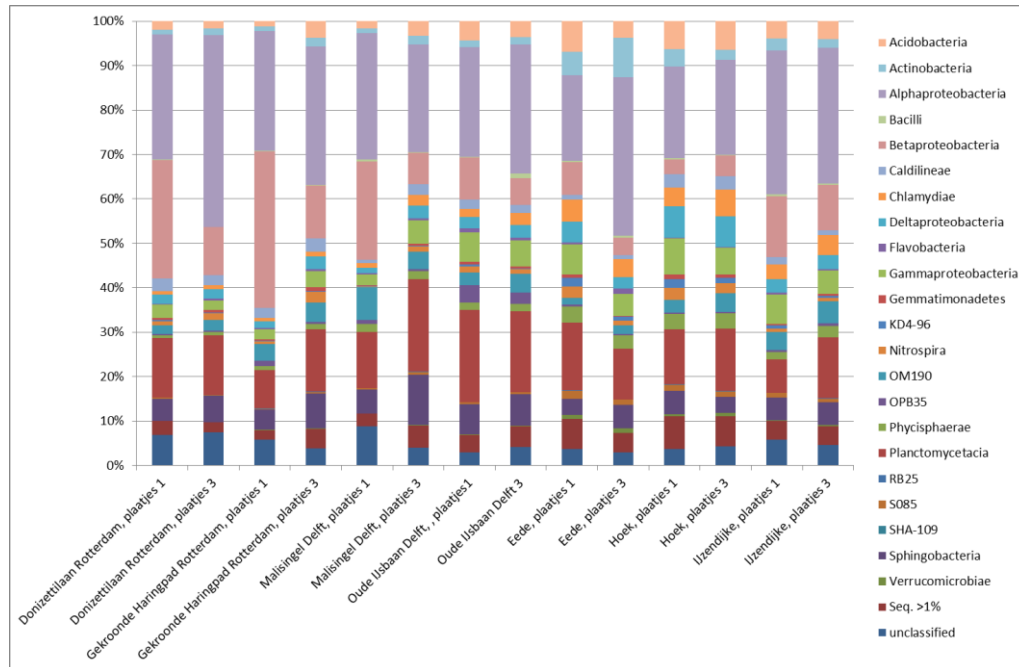
#### 3.5.1 Onderlinge vergelijking van glaspapels en glasplaatjes

Uit de populatievergelijking van de biofilmmonsters van de glasplaatjes (Figuur 11) en glaspapels (Figuur 12) blijkt dat de populatiesamenstelling van biofilms gemeten op tijdstip 1 en 3 (tijdsverschil 6 weken) in de glaspapels van Kralingen sterk van elkaar verschilden in de tijd (>10% afwijking) en alleen voor de Oude IJbaan was het verschil tussen de monsters van moment 1 en 3 circa 5%. Hoewel er nog weinig gegevens zijn over de variatie tussen bacteriepopulaties in de verschillende/overeenkomsten kolommen in een CBM is het opvallend dat voor Braakman de populatiesamenstelling tussen moment 1 en 3 veel minder verschilde ( $\leq 5\%$  afwijking). Uit de populatievergelijkingen tussen de verschillende locaties blijkt dat er grote verschillen zijn in de mate van overeenkomst van de bacteriepopulaties in de biofilms van de glaspapels. De locaties Hoek, Eede, IJzendijke van Braakman en Maliesingel en Oude IJbaan in Delft, Kralingen zijn relatief overeenkomend (>90%) maar daarentegen is de overeenkomst tussen de bacteriepopulaties in de Rotterdamse locaties: Donizetlaan en Gekroonde Haringpad lager (>85%) en verschilt deze ook ten opzichte van de overige monsters (overeenkomst >75%) .

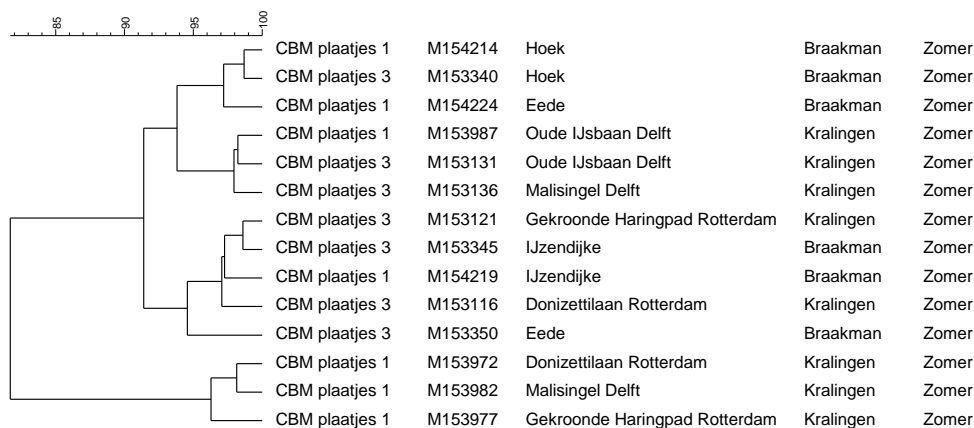


FIGUUR 11 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (>1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN VAN DE GLASPARELS IN DE CBM OP DE VERSCHILLENDE LOCATIES

Ook de biofilm op de glasplaatjes geeft een wisselend beeld met betrekking tot de overeenkomst van de bacteriepopulaties tussen de verschillende CBM's en de twee bemonsteren. Het is nog onduidelijk wat de drijvende kracht is achter de grote variaties in overeenkomst en verschillen in de bacteriepopulaties tussen de biofilmmonsters van de CBM's in tijd en plaats.



0\_Silva\_Class (<All Characters>)

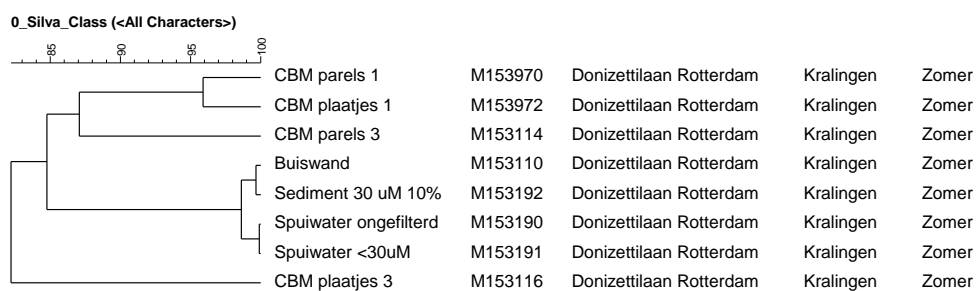
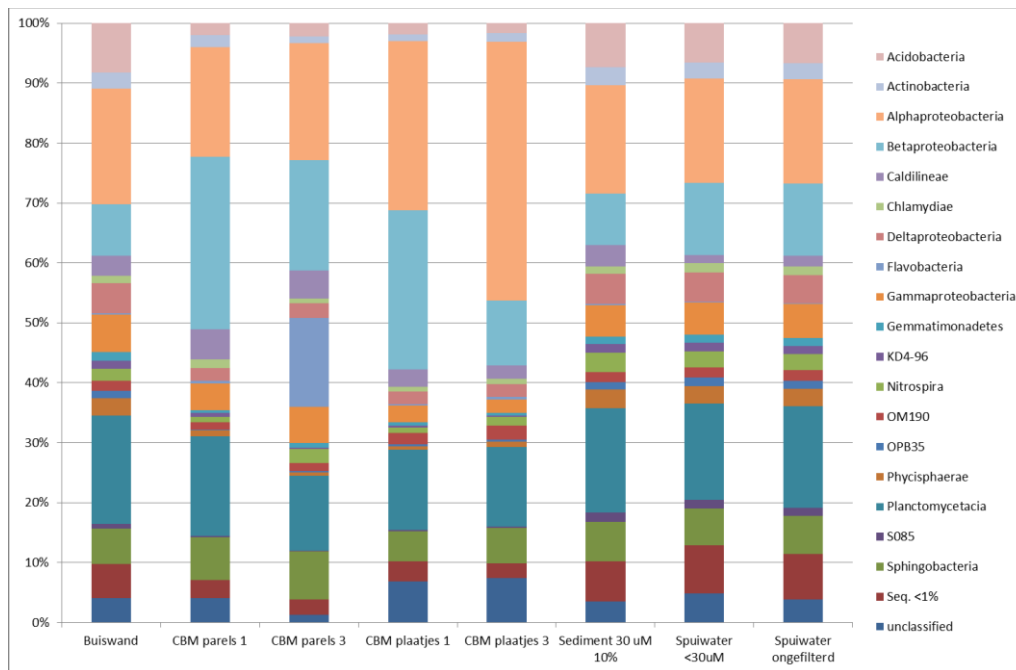


FIGUUR 12 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (>1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN VAN DE GLASPLAATJES IN DE CBM OP DE VERSCHILLENDE LOCATIES

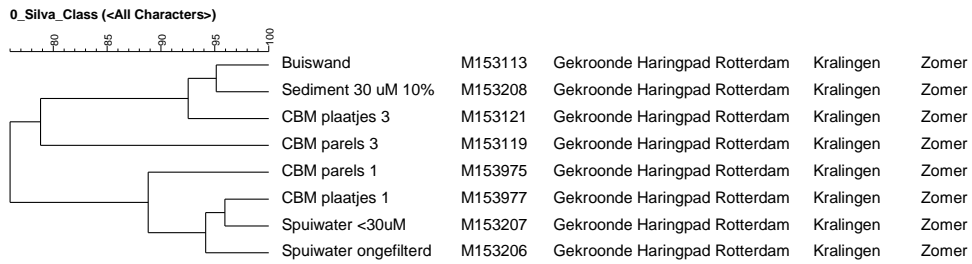
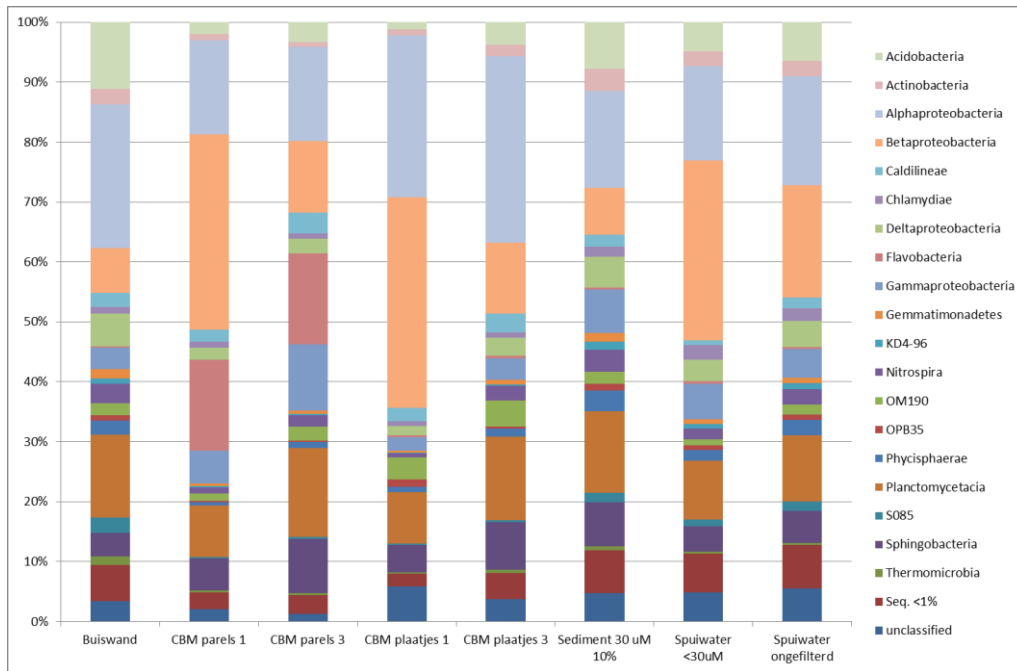
### 3.5.2 Vergelijking van de CBM monsters met de leidingnet niches

Wanneer de dendrogrammen per locatie worden gemaakt voor de CBM-monsters en de monsters van de buiswand en de spui monsters (incl.) dan blijkt dat voor Kralingen de populatiesamenstelling van de CBM-monsters sterk afwijkt van de populatiesamenstelling in de spuiwater, sediment en buiswandmonsters (Figuur 13, Figuur 14, Figuur 15 en Figuur 16). Ook in Braakman zijn de verschillen relatief groot maar minder groot dan bij Kralingen (Figuur 17, Figuur 18 en Figuur 19).

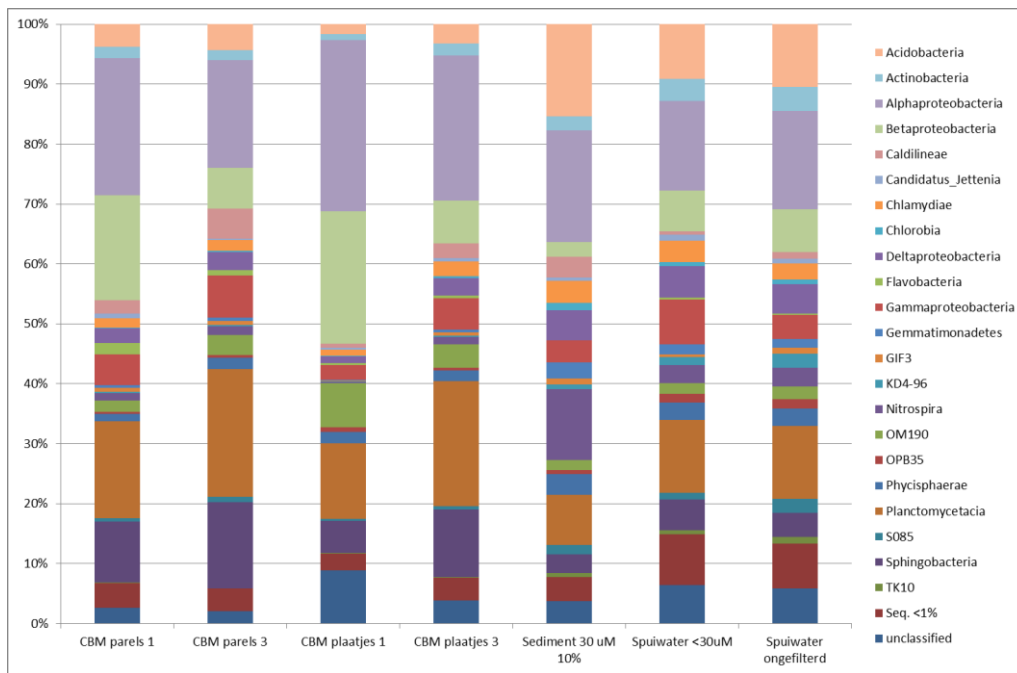
Samenvattend kan worden gesteld dat de bacteriepopulaties in de biofilms van de CBM op zowel plaatjes als glaspereels sterk afwijkt van de bacteriepopulaties in het fijne en grotere sediment en ook ten opzichte van de biofilm op de buiswand. Dit kan worden verklaard doordat mogelijk de milieucondities in het sediment en de biofilm in het distributienet verschillend zijn met de condities in de CBM. Een andere mogelijke verklaring is dat de betrekkelijk ‘jonge’ biofilms (4 weken) in de CBM ander bacteriesoorten bevat dan een oudere biofilm in het leidingnet waarin een vorm van successie is opgetreden. De bacteriepopulaties in de CBM zijn op basis van dit onderzoek dan ook niet representaties voor de bacteriepopulaties in de biofilm in het distributienet. De CBM is overigens ook niet ontwikkeld voor dit doel maar om te bepalen wat de biofilmvormings- of biomassa-accumulatiesnelheid is die gebaseerd is op afbreekbare stoffen in water.



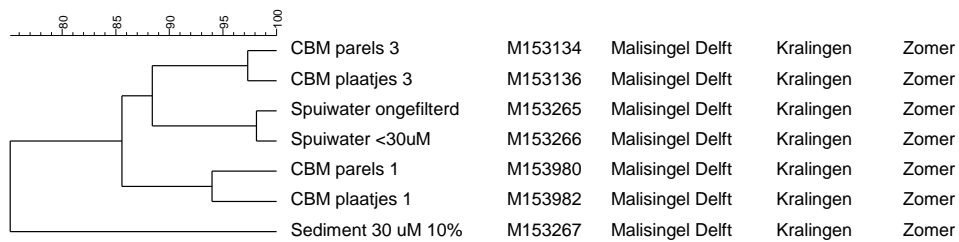
FIGUUR 13 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (>1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN VAN DE CBM- EN SEDIMENT/BUISWAND MONSTERS VOOR KRALINGEN OP LOCATIE DONIZETTILAAAN IN ROTTERDAM



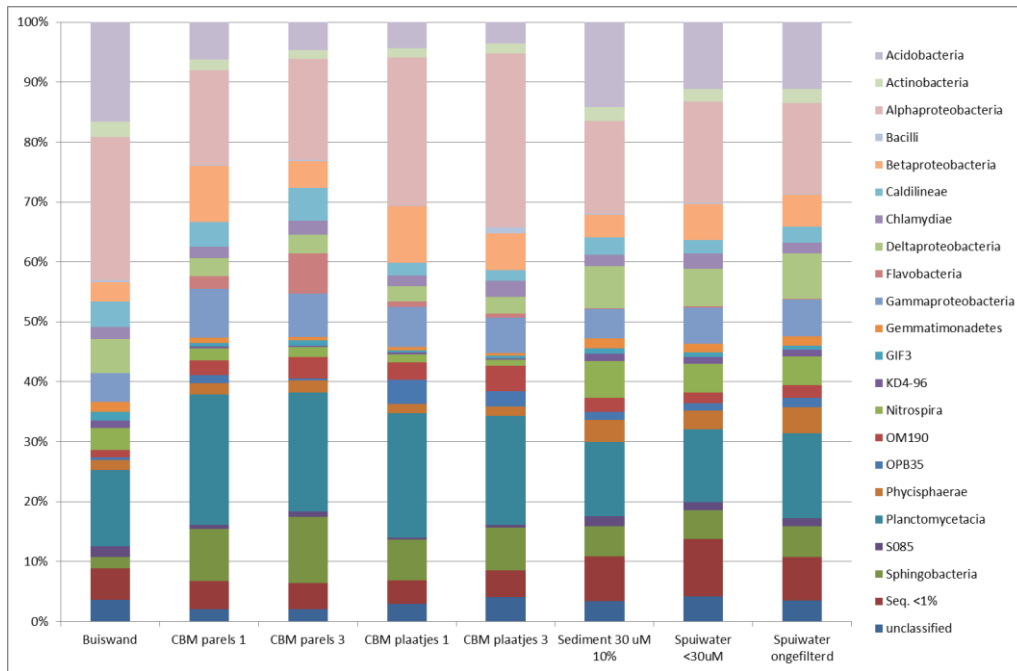
FIGUUR 14 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (> 1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN VAN DE CBM- EN SEDIMENT/BUISWAND MONSTERS VOOR KRALINGEN OP LOCATIE GEKROONDE HARINGPAD IN ROTTERDAM



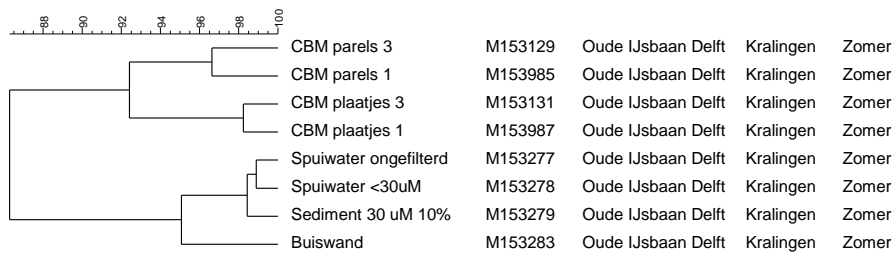
0\_Silva\_Class (<All Characters>)



FIGUUR 15 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (>1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN VAN DE CBM- EN SEDIMENT/BUISWAND MONSTERS VOOR KRALINGEN OP LOCATIE MALISINGEL IN DELFT

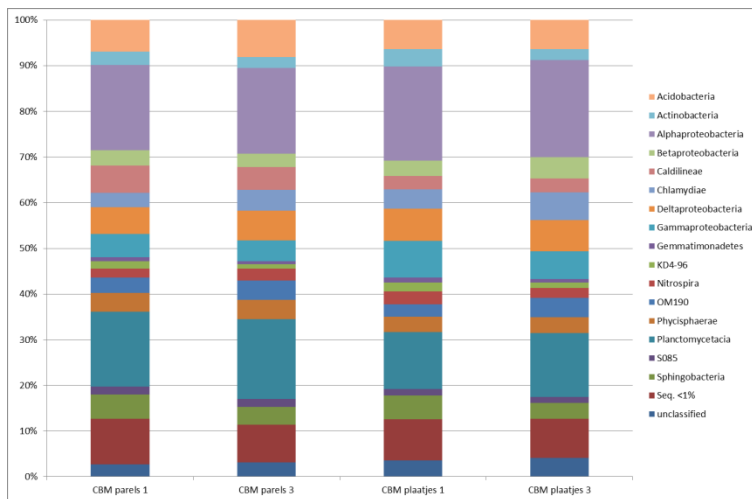


0\_Silva\_Class (<All Characters>)



FIGUUR 16 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (>1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN VAN DE CBM- EN SEDIMENT/BUISWAND MONSTERS VOOR KRALINGEN OP LOCATIE OUDE IJBAAN IN DELFT

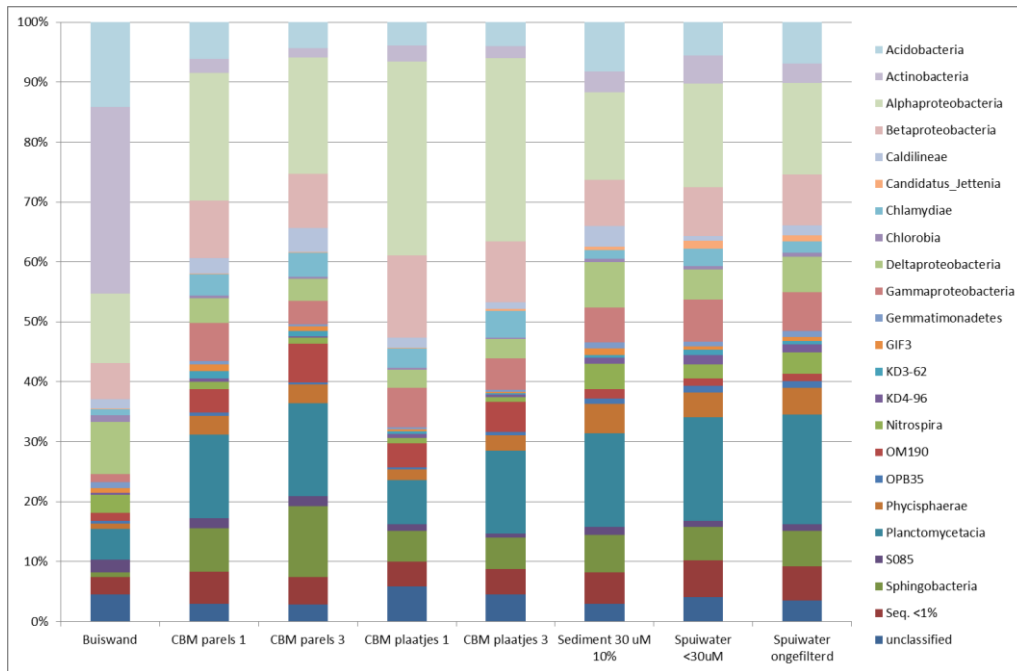




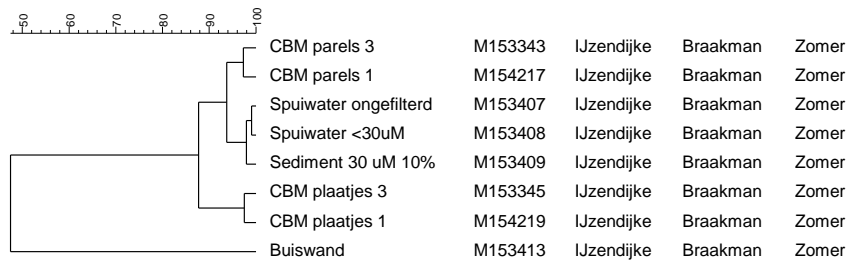
**0\_Silva\_Class (<All Characters>)**



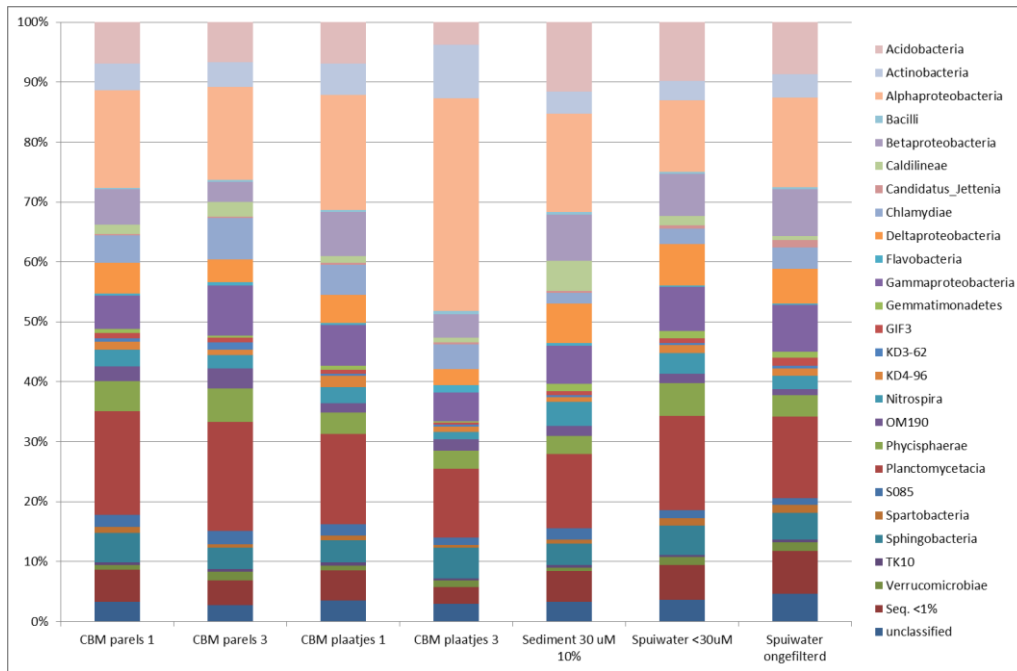
FIGUUR 17 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (> 1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN VAN DE CBM- EN SEDIMENT/BUISWAND MONSTERS VOOR BRAAKMAN OP LOCATIE HOEK



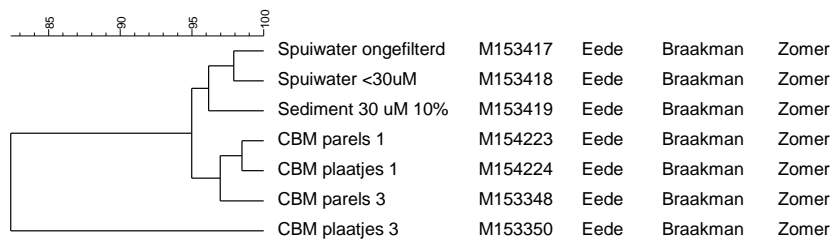
0\_Silva\_Class (<All Characters>)



FIGUUR 18 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (>1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN VAN DE CBM- EN SEDIMENT/BUISWAND MONSTERS VOOR BRAAKMAN OP LOCATIE IJZENDIJKE



0\_Silva\_Class (<All Characters>)



FIGUUR 19 BELANGRIJKSTE BACTERIEPOPULATIES (>1%) (BOVEN) EN DENDOGRAM (ONDER) VAN DE BACTERIËLE GEMEENSCHAPPEN VAN DE CBM- EN SEDIMENT/BUISWAND MONSTERS VOOR BRAAKMAN OP LOCATIE EEDE

## 4 Conclusies en aanbevelingen

### 4.1 Conclusies

De analyse van de NGS gegevens van de beschikbare monsters geven een aantal belangrijke indicaties ten aanzien van de bacteriepopulaties in het leidingnet en de betekenis voor de microbiologische processen in het leidingnet. Om de verschillende onderzoeksvragen opgenomen in dit rapport op een betrouwbare manier te beantwoorden is een aparte hierop gerichte meetcampagne noodzakelijk.

- De bacteriepopulatie in het drinkwater in de zomer verandert tijdens het verblijf in het distributienet (in de winter niet gemeten) en wijkt af van de populaties in de andere niches (sediment en buiswand). Bemonstering van het water vond plaats vanuit een continu doorstroomt punt aan de CBM vóórdat het water de biofilm cuvetten doorstroomde; invloed hiervan op de bacteriepopulatie is mogelijk maar onwaarschijnlijk.
- De microbiologische processen in het leidingnet in de zomer, die zich op grond van de ATP gehalten voornamelijk optreden in sediment en in de biofilm op de buiswand, resulteert niet in een overeenkomst bacteriepopulaties in beide niches. Waarschijnlijk is de uitwisseling tussen die niches klein, zoals ook in andere studies is waargenomen (Vitens onderzoek, Roeselers et al., 2015)).
- Uit de gemeten verandering van de ATP-verdeling tussen sediment en biofilm op de buiswand als functie van de verblijftijd in het leidingnet blijkt eveneens dat de microbiologische condities in het leidingnet als functie van de verblijftijd in de zomer veranderen. Hetzelfde geldt voor de relatief grote afwijking van de bacteriepopulaties in sediment (fijn = spuiwater en groot = sediment uit planktonnet) en biofilm op de buiswand tussen de monsterlocaties in het leidingnet van zowel Kralingen als Braakman op verschillende verblijftijden van het pompstations;
- De bacteriepopulaties in de verschillende watermonsters blijken onderling sterker te verschillen dan de bacteriepopulaties in de afzonderlijke niches met de hoogste bacteriedichtheden, het sediment (fijn en groot) en de buiswand.
- De bacteriepopulaties in de biofilm in de CBM is zowel plaatjes als glasparels sterk afwijkend ten opzichte van de bacteriepopulaties in het fijne en grotere sediment en ook ten opzichte van de biofilm op de buiswand.
- De onderscheidende bacteriepopulaties in de verschillende niches (water, biofilm buiswand en sediment) op de verschillende locaties in het leidingnet laat duidelijk zien dat er in het distributienet sprake is van (ten minste) drie verschillende microbiële niches.
- Ondanks de beperking van de beschikbare monsters geeft de NGS analyse inzicht in de dynamiek van de bacteriepopulaties in de verschillende niches in leidingnet en de mogelijke verbanden tussen de verschillende niches waarin bacteriën aanwezig zijn (water, sediment (fijn, groot) en biofilm op de buiswand). Er is nog een relatief kleine steekproef uitgevoerd waardoor de uitspraken over de biologische processen in het leidingnet nog niet algeheel geldend kunnen zijn.

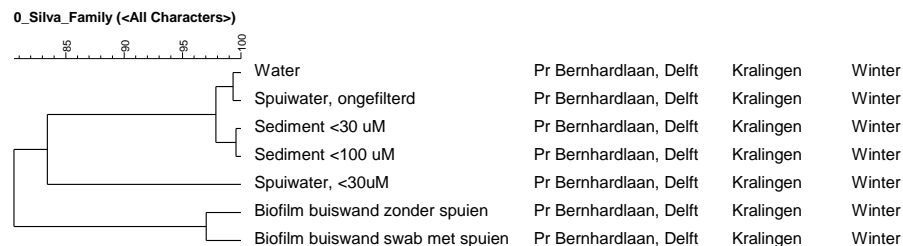
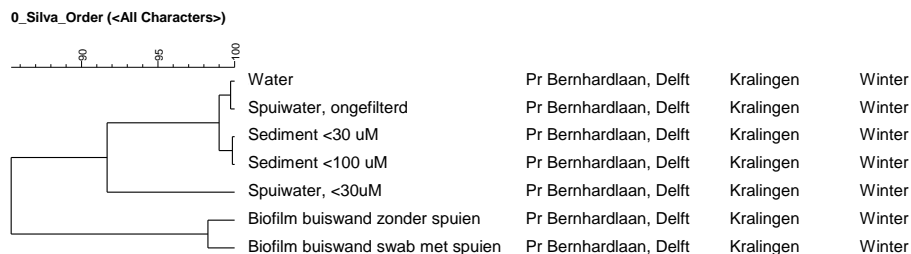
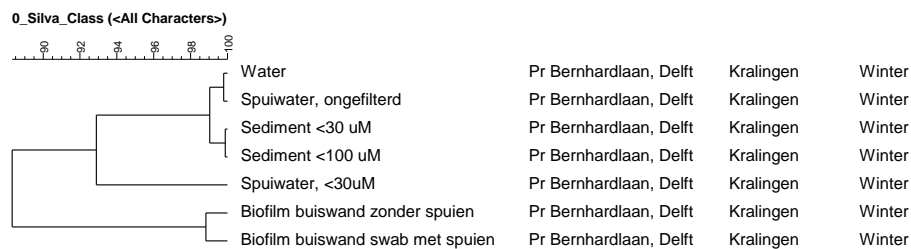
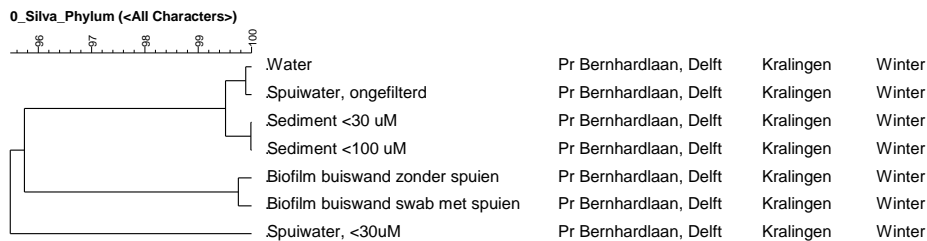
De kracht van NGS analyses is om op zeer gedetailleerd niveau bacteriepopulaties met elkaar te kunnen vergelijken om zo overeenkomsten en verschillende en hiermee niche te onderscheiden. Hierbij is wel van belang om de proefopzet zo te ontwerpen dat er

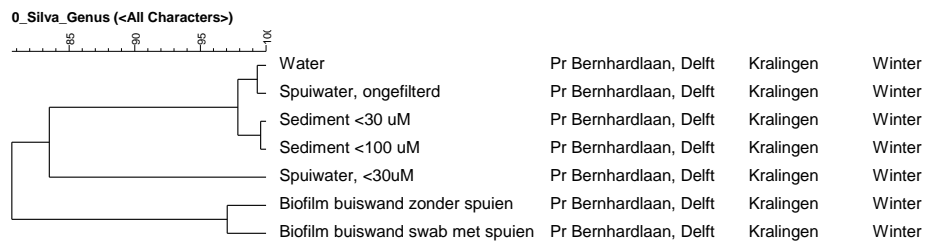
voldoende monsters worden genomen om de verschillende onderzoeksvragen met enige zekerheid te kunnen beantwoorden.

#### 4.2 Aanbevelingen voor verder onderzoek

- Aanvullend onderzoek om de vraag te kunnen beantwoorden of er verschuivingen/veranderingen plaats vinden in de bacteriepopulaties in het drinkwater tijdens transport in het distributienet en of dit gelijk is tijdens de zomer en winterperiode? Hiervoor is een beperkte meetcampagne nodig.
- Aanvullende onderzoek om de resultaten in dit onderzoek verder te onderbouwen dat de bacteriepopulaties in de spui- en sedimentmonsters sterk overeenkomen en dat deze in overeenkomst en verschil met de biofilm varieert. Hiervoor kunnen de monsters van 2015 en aanvullende metingen in 2016 worden gebruikt waarbij een andere en betere primerset wordt gebruikt.

# Bijlage I Dendrogrammen van de bacteriële gemeenschappen berekend op verschillende taxonomische niveaus





FIGUUR: DENDOGRAMMEN VAN DE DNA MONSTERS VAN DE PR BERNHARDLAAN BEREKEND OP VERSCHILLENDE TAXONOMISCHE NIVEAUS

## Bijlage II Monsters voor DNA-isolatie

<b>Drinkwater "af pompstation"</b>
Drinkwater op locatie (Standpijp, CBM)
<b>Buiswand swab</b>
Spuiwater ongefilterd
Spuiwater <30 µM
Sediment <30 µM
Sediment <100 µM
CBM monsters plaatjes (BVS)
CBM monsters parels (BAS)

Overzicht locaties en herkomst water-, biofilm- en sedimentmonsters geanalyseerd tijdens het onderzoek tijdens de winter en zomerperiode

NR	KWR_NR	Datum	VZ-gebied	Adres	Periode <sup>4</sup>	Omschrijving
60	M144275	25-11-2014	Kralingen	Pr. Bernhardlaan Delft	Koud	Drinkwater
65	M144280	25-11-2014	Kralingen	Pr. Bernhardlaan Delft	Koud	Biofilm buiswand swab <sup>1</sup>
66	M144282	25-11-2014	Kralingen	Pr. Bernhardlaan Delft	Koud	Biofilm buiswand swab <sup>2</sup>
61	M144276	25-11-2014	Kralingen	Pr. Bernhardlaan Delft	Koud	Spuiwater ongefilterd
62	M144277	25-11-2014	Kralingen	Pr. Bernhardlaan Delft	Koud	Spuiwater <30µm
63	M144278	25-11-2014	Kralingen	Pr. Bernhardlaan Delft	Koud	Sediment <30 µm 10%
64	M144279	25-11-2014	Kralingen	Pr. Bernhardlaan Delft	Koud	Sediment <100 µm 10%
68	M144301	26-11-2014	Kralingen	Avenue Concordia R'dam	Koud	Drinkwater
73	M144306	26-11-2014	Kralingen	Avenue Concordia R'dam	Koud	Biofilm buiswand swab <sup>1</sup>
69	M144302	26-11-2014	Kralingen	Avenue Concordia R'dam	Koud	Spuiwater ongefilterd
70	M144303	26-11-2014	Kralingen	Avenue Concordia R'dam	Koud	Spuiwater <30µm
71	M144304	26-11-2014	Kralingen	Avenue Concordia R'dam	Koud	Sediment <30 µm 10%
72	M144305	26-11-2014	Kralingen	Avenue Concordia R'dam	Koud	Sediment <100 µm 10%



1	M153104	24-08-2015	Kralingen	Pompstation	Warm	Reinwater "af pompstation"
2	M153109	26-08-2015	Kralingen	Donizetttilaan R'dam	Warm	Watermonster CBM
3	M153110	26-08-2015	Kralingen	Donizetttilaan R'dam	Warm	Buiswand
14	M153190	26-08-2015	Kralingen	Donizetttilaan R'dam	Warm	Spuiwater ongefilterd
15	M153191	26-08-2015	Kralingen	Donizetttilaan R'dam	Warm	Spuiwater <30µm
16	M153192	26-08-2015	Kralingen	Donizetttilaan R'dam	Warm	Sediment <30 µm 10%
6	M153114	24-08-2015	Kralingen	Donizetttilaan R'dam	Warm	CBM pannels 3
7	M153116	24-08-2015	Kralingen	Donizetttilaan R'dam	Warm	CBM plaatjes 3
46	M153970	05-10-2015	Kralingen	Donizetttilaan R'dam	Warm	CBM pannels 1
47	M153972	05-10-2015	Kralingen	Donizetttilaan R'dam	Warm	CBM plaatjes 1
4	M153112	26-08-2016	Kralingen	Gekroonde Haringpad R'dam	Warm	Watermonster CBM
5	M153113	26-08-2015	Kralingen	Gekroonde Haringpad R'dam	Warm	Buiswand
17	M153206	26-08-2015	Kralingen	Gekroonde Haringpad R'dam	Warm	Spuiwater ongefilterd
17	M153207	26-08-2015	Kralingen	Gekroonde Haringpad R'dam	Warm	Spuiwater <30µm
19	M153208	26-08-2015	Kralingen	Gekroonde Haringpad R'dam	Warm	Sediment <30 µm 10%
8	M153119	24-08-2015	Kralingen	Gekroonde Haringpad R'dam	Warm	CBM pannels 3
9	M153121	24-08-2015	Kralingen	Gekroonde Haringpad R'dam	Warm	CBM plaatjes 3
48	M153975	05-10-2015	Kralingen	Gekroonde Haringpad R'dam	Warm	CBM pannels 1
49	M153977	05-10-2015	Kralingen	Gekroonde Haringpad R'dam	Warm	CBM plaatjes 1
20	M153264	01-09-2015	Kralingen	Malisingel dDelft	Warm	Watermonster CBM
21	M153265	01-09-2015	Kralingen	Malisingel dDelft	Warm	Spuiwater ongefilterd
22	M153266	01-09-2015	Kralingen	Malisingel dDelft	Warm	Spuiwater <30µm
23	M153267	01-09-2015	Kralingen	Malisingel dDelft	Warm	Sediment <30 µm 10%
12	M153134	24-08-2015	Kralingen	Malisingel dDelft	Warm	CBM pannels 3
13	M153136	24-08-2015	Kralingen	Malisingel dDelft	Warm	CBM plaatjes 3
50	M153980	05-10-2015	Kralingen	Malisingel dDelft	Warm	CBM pannels 1

51	M153982	05-10-2015	Kralingen	Malisingel dDelft	Warm	CBM plaatjes 1
24	M153276	01-09-2015	Kralingen	Oude ijsbaan Delft	Warm	Watermonster CBM
28	M153283	01-09-2015	Kralingen	Oude ijsbaan Delft	Warm	Buiswand
25	M153277	01-09-2015	Kralingen	Oude ijsbaan Delft	Warm	Spuiwater ongefilterd
26	M153278	01-09-2015	Kralingen	Oude ijsbaan Delft	Warm	Spuiwater <30µm
27	M153279	01-09-2015	Kralingen	Oude ijsbaan Delft	Warm	Sediment <30 µm 10%
10	M153129	24-08-2015	Kralingen	Oude ijsbaan Delft	Warm	CBM parels 3
11	M153131	24-08-2015	Kralingen	Oude ijsbaan Delft	Warm	CBM plaatjes 3
52	M153985	05-10-2015	Kralingen	Oude ijsbaan Delft	Warm	CBM parels 1
53	M153987	05-10-2015	Kralingen	Oude ijsbaan Delft	Warm	CBM plaatjes 1
82	M150461	04-03-2015	Braakman	Sluis	Koud	Drinkwater
81	M150268	04-03-2015	Braakman	Sluis <sup>4</sup>	Koud	Biofilm buiswand swab
83	M150462	04-03-2015	Braakman	Sluis	Koud	Spuiwater ongefilterd
84	M150463	04-03-2015	Braakman	Sluis	Koud	Spuiwater <30µm
85	M150464	04-03-2015	Braakman	Sluis	Koud	Sediment <30 µm 10%
86	M150465	04-03-2015	Braakman	Sluis	Koud	Sediment <100 µm 10%
36	M153404	08-09-2015	Braakman	Pompstation	Warm	Reinwater "af pompstation"
35	M153403	08-09-2015	Braakman	Philipe-Hoek <sup>5</sup>	Warm	Buiswand
29	M153338	01-09-2015	Braakman	Hoek <sup>5,6</sup>	Warm	CBM parels 3
30	M153340	01-09-2015	Braakman	Hoek <sup>5,6</sup>	Warm	CBM plaatjes 3
54	M154212	13-10-2015	Braakman	Hoek <sup>5,6</sup>	Warm	CBM parels 1
55	M154214	13-10-2015	Braakman	Hoek <sup>5,6</sup>	Warm	CBM plaatjes 1
37	M153406	08-09-2015	Braakman	IJzendijke	Warm	Watermonster CBM
41	M153413	08-09-2015	Braakman	IJzendijke	Warm	Buiswand
38	M153407	08-09-2015	Braakman	IJzendijke	Warm	Spuiwater ongefilterd
39	M153408	08-09-2015	Braakman	IJzendijke	Warm	Spuiwater <30µm

40	M153409	08-09-2015	Braakman	Ijzendijke	Warm	Sediment <30 µm 10%
31	M153343	01-09-2015	Braakman	Ijzendijke	Warm	CBM parels 3
32	M153345	01-09-2015	Braakman	Ijzendijke	Warm	CBM plaatjes 3
56	M154217	13-10-2015	Braakman	Ijzendijke	Warm	CBM parels 1
57	M154219	13-10-2015	Braakman	Ijzendijke	Warm	CBM plaatjes 1
42	M153416	08-09-2015	Braakman	Eede	Warm	Watermonster CBM
43	M153417	08-09-2015	Braakman	Eede	Warm	Spuiwater ongefilterd
44	M153418	08-09-2015	Braakman	Eede	Warm	Spuiwater <30µm
45	M153419	08-09-2015	Braakman	Eede	Warm	Sediment <30 µm 10%
33	M153348	01-09-2015	Braakman	Eede	Warm	CBM parels 3
34	M153350	01-09-2015	Braakman	Eede	Warm	CBM plaatjes 3
58	M154223	13-10-2015	Braakman	Eede	Warm	CBM parels 1
59	M154224	13-10-2015	Braakman	Eede	Warm	CBM plaatjes 1
75	M150253	18-02-2015	Ouddorp	Herkingen	Koud	Drinkwater
80	M150260	18-02-2015	Ouddorp	Herkingen	Koud	Biofilm buiswand swab
76	M150254	18-02-2015	Ouddorp	Herkingen	Koud	Spuiwater ongefilterd
77	M150255	18-02-2015	Ouddorp	Herkingen	Koud	Spuiwater <30µm
78	M150256	18-02-2015	Ouddorp	Herkingen	Koud	Sediment <30 µm 10%
79	M150257	18-02-2015	Ouddorp	Herkingen	Koud	Sediment <100 µm 10%

Opmerkingen:

BIJ MALISINGEL EN EEDE ONTBREKEN BUISWAND (DNA MONSTERS NIET GENOMEN);

PHILIPPE EN HOEK: BEIDEN VLAK NA POMPSTATION BRAAKMAN

## Bijlage III NGS analyse

Tabel: Aantal geanalyseerde DNA-sequenties (reads) per monster

KWR nr	Herkomst	Adres	Totaal seq's
M144275	Water	Pr Bernhardlaan, Delft	34117
M144276	Spuiwater, ongefilterd	Pr Bernhardlaan, Delft	40377
M144277	Spuiwater, <30uM	Pr Bernhardlaan, Delft	39340
M144278	Sediment <30 uM	Pr Bernhardlaan, Delft	41051
M144279	Sediment <100 uM	Pr Bernhardlaan, Delft	39210
M144280	Biofilm buiswand zonder spuien	Pr Bernhardlaan, Delft	36695
M144282	Biofilm buiswand swab met spuien	Pr Bernhardlaan, Delft	38121
M144284	Spuiwater <30uM gedesintegreerd	Pr Bernhardlaan, Delft	36921
M144301	Water	Avenue Concordia, Rotterdam	42600
M144302	Spuiwater ongefilterd	Avenue Concordia, Rotterdam	42430
M144303	Spuiwater, <30uM	Avenue Concordia, Rotterdam	49100
M144304	Spuiwater <30uM gedesintegreerd	Avenue Concordia, Rotterdam	44139
M144305	Sediment <30 uM	Avenue Concordia, Rotterdam	41541
M144306	Sediment <100 uM	Avenue Concordia, Rotterdam	43199
M144309	Biofilm buiswand swab	Avenue Concordia, Rotterdam	40597
M150253	Water	Herkingen	44285
M150254	Spuiwater ongefilterd	Herkingen	44902
M150255	Spuiwater, <30uM	Herkingen	38843
M150256	Sediment <30 uM	Herkingen	44935
M150257	Sediment <100 uM	Herkingen	39648
M150260	Biofilm buiswand swab	Herkingen	33642
M150268	Biofilm buiswand swab	Sluis	35312
M150461	Water	Sluis	44111
M150462	Spuiwater ongefilterd	Sluis	40253
M150463	Spuiwater, <30uM	Sluis	39642
M150464	Sediment <30 uM	Sluis	37019
M150465	Sediment <100 uM	Sluis	41368
M153104	Reinwater Kralingen	Kralingen	102991
M153109	Watermonster CBM	Donizettilaan Rotterdam	90109
M153110	Buiswand	Donizettilaan Rotterdam	69721
M153112	Watermonster CBM	Gekroonde Haringpad Rotterdam	66104
M153113	Buiswand	Gekroonde Haringpad Rotterdam	66447
M153114	CBM parels 3	Donizettilaan Rotterdam	98646
M153116	CBM plaatjes 3	Donizettilaan Rotterdam	126380
M153119	CBM parels 3	Gekroonde Haringpad Rotterdam	95168
M153121	CBM plaatjes 3	Gekroonde Haringpad Rotterdam	111402
M153129	CBM parels 3	Oude IJbaan Delft	79559
M153131	CBM plaatjes 3	Oude IJbaan Delft	125815
M153134	CBM parels 3	Malisingel Delft	99100
M153136	CBM plaatjes 3	Malisingel Delft	123632
M153190	Spuiwater ongefilterd	Donizettilaan Rotterdam	74601
M153191	Spuiwater <30uM	Donizettilaan Rotterdam	96913
M153192	Sediment 30 uM 10%	Donizettilaan Rotterdam	80708

M153206	Spuiwater ongefilterd	Gekroonde Haringpad Rotterdam	75210
M153207	Spuiwater <30uM	Gekroonde Haringpad Rotterdam	89665
M153208	Sediment 30 uM 10%	Gekroonde Haringpad Rotterdam	101865
M153264	Watermonster CBM	Malisingel Delft	85365
M153265	Spuiwater ongefilterd	Malisingel Delft	82025
M153266	Spuiwater <30uM	Malisingel Delft	84740
M153267	Sediment 30 uM 10%	Malisingel Delft	5011
M153276	Watermonster CBM	Oude IJbaan Delft	73389
M153277	Spuiwater ongefilterd	Oude IJbaan Delft	95566
M153278	Spuiwater <30uM	Oude IJbaan Delft	70565
M153279	Sediment 30 uM 10%	Oude IJbaan Delft	84556
M153283	Buiswand	Oude IJbaan Delft	92760
M153338	CBM parels 3	Hoek	99310
M153340	CBM plaatjes 3	Hoek	85638
M153343	CBM parels 3	IJzendijke	94534
M153345	CBM plaatjes 3	IJzendijke	59432
M153348	CBM parels 3	Eede	80593
M153350	CBM plaatjes 3	Eede	61873
M153403	Buiswand	Philipine	103818
M153404	Reinwater Braakman	Braakman	99251
M153406	Watermonster CBM	IJzendijke	24516
M153407	Spuiwater ongefilterd	IJzendijke	79441
M153408	Spuiwater <30uM	IJzendijke	82421
M153409	Sediment 30 uM 10%	IJzendijke	79936
M153413	Buiswand	IJzendijke	86202
M153416	Watermonster CBM	Eede	76778
M153417	Spuiwater ongefilterd	Eede	76978
M153418	Spuiwater <30uM	Eede	83386
M153419	Sediment 30 uM 10%	Eede	69745
M153970	CBM parels 1	Donizetilaan Rotterdam	84307
M153972	CBM plaatjes 1	Donizetilaan Rotterdam	67140
M153975	CBM parels 1	Gekroonde Haringpad Rotterdam	99160
M153977	CBM plaatjes 1	Gekroonde Haringpad Rotterdam	74432
M153980	CBM parels 1	Malisingel Delft	98548
M153982	CBM plaatjes 1	Malisingel Delft	83673
M153985	CBM parels 1	Oude IJbaan Delft	90121
M153987	CBM plaatjes 1	Oude IJbaan Delft	91644
M154212	CBM parels 1	Hoek	86575
M154214	CBM plaatjes 1	Hoek	61992
M154217	CBM parels 1	IJzendijke	82721
M154219	CBM plaatjes 1	IJzendijke	66129
M154223	CBM parels 1	Eede	76317
M154224	CBM plaatjes 1	Eede	44249
Totaal			5992271

