

BTO 2018.044 | Maart 2018

BTO rapport

Toepassingsmogelijkheden
van: Metatranscriptomics,
Microbial profiling en
MinION sequencing

BTO

Toepassingsmogelijkheden van: Metatranscriptomics,
Microbial profiling en MinION sequencing

BTO 2018.044 | Maart 2018

Opdrachtnummer

400695/051

Projectmanager

Bart Schalkwijk

Opdrachtgever

BTO - Verkennend onderzoek

Kwaliteitsborger(s)

Paul van der Wielen

Auteur(s)

Leo Heijnen

Verzonden aan

De case studie voor dit onderzoek is, in samenwerking met Agata Donocik en Stephan van de Wetering, uitgevoerd bij de drinkwaterzuivering Nuland van Brabant Water. De financiering voor het uitvoeren van de algemeen biologische en chemische parameters is gedaan door Brabant Water.

Jaar van publicatie
2018

Meer informatie
Leo Heijnen
T 030-6069743
E leo.heijnen@kwrwater.nl

Keywords: MinION, NGS, DNA, RNA, Microbial profiling, metatranscriptomics, Next Generation Sequencing

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl



BTO 2018.044 | Maart 2018 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden vervaelvoudigd, 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.

BTO Managementsamenvatting

Toepassingsmogelijkheden van: Metatranscriptomics, Microbial profiling en MinION sequencing

Auteur(s) Leo Heijnen

In de drinkwaterzuivering is de rol van de microbiologie bij de verschillende biochemische zuiveringsprocessen groot maar de invloed van micro-organismen op deze processen is vaak nog een “black box”. Mogelijkheden om deze processen te monitoren maken optimalisatie en gerichte sturing van de zuivering mogelijk en zullen resulteren in kwaliteitsverbetering.

Met nieuwe “Next Generation Sequencing” (NGS) technologieën is het steeds eenvoudiger om inzicht te krijgen in de samenstelling van het DNA of RNA van de microbiële populatie en de biochemische processen die door de populatie kunnen worden uitgevoerd. In dit verkennend onderzoek zijn de toepassingsmogelijkheden van nieuwe NGS technologieën (Metatranscriptomics, Microbial profiling en MinION sequencing) onderzocht. Metatranscriptomics analyses geven inzicht in de actieve biochemische processen maar de hoeveelheid biomassa in water is te gering is om deze analyses momenteel betrouwbaar te kunnen uitvoeren. Een case studie bij drinkwaterzuivering Nuland (Brabant Water) maakte duidelijk dat “Microbial profiling” inzicht geeft in de invloed van zuiveringsstappen op de samenstelling van de bacteriële populaties en de daarbij behorende processen. De toepassing van MinION sequencing is veelbelovend maar verdere optimalisatie van deze technologie is noodzakelijk.

MinION geminiaturiseerde DNA sequencer (Oxford Nanopore)



Jaar van publicatie
2018

Meer informatie
Leo Heijnen
T 030-6069743
E leo.heijnen@kwrwater.nl

Keywords: MinION, NGS, DNA, RNA, Microbial profiling, metatranscriptomics, Next Generation Sequencing

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl

KWR

Watercycle
Research
Institute

BTO 2018.044 | Maart 2018 © 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.

Belang: verbetering waterkwaliteit door optimalisatie en monitoring microbiologische processen

De uitdagingen op het gebied van drinkwaterkwaliteit liggen vooral op het vlak van kwaliteitsverbetering bij een deel van de productielocaties en het ontwikkelen van efficiënte strategieën voor het monitoren van zuiveringsprocessen. Verbeteren en optimalisatie van meetstrategieën geeft de mogelijkheid om snel inzicht te krijgen in (veranderingen van) de microbiologische waterkwaliteit en op basis daarvan processen te optimaliseren. Met verschillende nieuwe NGS technologieën is het mogelijk om een vrijwel compleet beeld te krijgen van de samenstelling van de microbiologische populatie (Microbial profiling) of de biochemische processen waarbij de micro-organismen betrokken zijn (Metatranscriptomics). Daarnaast zijn komen geminiaturiseerde systemen beschikbaar (o.a. MinION) die wellicht gebruikt kunnen worden voor NGS analyses op locatie waardoor efficiënte en gerichte sturing van zuiveringsprocessen bereikbaar wordt.

Aanpak: verkennen van de toepassingsmogelijkheden van Metatranscriptomics, Microbial profiling en MinION sequencing.

De toepassingsmogelijkheden van Metatranscriptomics zijn onderzocht door het uitvoeren van literatuuronderzoek. De toepassing van Microbial profiling, om daarmee inzicht te krijgen in de samenstelling van de microbiologische populaties na verschillende zuiveringsstappen en de bijbehorende biochemische processen, is onderzocht door deze technologie toe te passen op een case studie: de drinkwaterzuivering van Nuland. De mogelijkheden voor sequencing met de MinION geminiaturiseerde DNA-sequencer zijn onderzocht door analyses uit te voeren op kunstmatig samengestelde mengsels van verschillende bacteriesoorten ("Mock community") en de resultaten te vergelijken met de standaard analyses op de Illumina MiSeq sequencer.

Resultaten: Microbial profiling geeft inzicht in microbiologische processen; sequencing volledige 16S genen is mogelijk met MinION en toepassing Metatranscriptomics nog niet haalbaar.

Om te bepalen in hoeverre microbial profiling inzicht geeft in de microbiologische processen die plaats vinden bij de verschillende zuiveringsstappen is een case studie uitgevoerd in de drinkwaterzuivering van Nuland (Brabant Water). De resultaten van deze case studie laten zien dat Microbial profiling duidelijk inzicht geeft in de microbiële veranderingen die optreden en dat hiermee indicaties worden verkregen van de biochemische processen die plaats vinden. Voor beter inzicht in de biochemische processen is Metatranscriptomics meer geschikt. Maar, vanwege de beperkte hoeveelheid biomassa in water na zuiveringsprocessen zijn betrouwbare Metatranscriptomics analyses nog niet mogelijk. Hiervoor is het noodzakelijk om methoden te ontwikkelen waarmee micro-organismen snel en efficiënt uit water kunnen worden geconcentreerd zonder daarbij het transcriptoom te veranderen. Sequencing met MinION is relatief eenvoudig en de resultaten zijn veelbelovend. Het is met MinION in dit onderzoek mogelijk gebleken om de volledige lengte (ca. 1600 bp) van de 16S rRNA genen te sequencen. Verdere optimalisatie van MinION sequencing is nog wel noodzakelijk om de kwaliteit van de DNA-sequenties te verbeteren.

Jaar van publicatie
2018

Meer informatie
Leo Heijnen
T 030-6069743
E leo.heijnen@kwrwater.nl

Keywords: MinION, NGS, DNA, RNA, Microbial profiling, metatranscriptomics, Next Generation Sequencing

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl

KWR

Watercycle
Research
Institute

BTO 2018.044 | Maart 2018 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden vervoelvoudigd, 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.

Implementatie: optimalisatie en standaardisatie nodig voor toepassing van Microbial profiling en sequencing met MinION. Metatranscriptomics moet nog verder worden ontwikkeld.

Dit onderzoek laat zien dat:

- Microbial profiling bruikbaar is om inzicht te krijgen microbiologische veranderingen die plaats vinden tijdens zuiveringsprocessen.
 - Optimalisatie en standaardisatie en de introductie van kwaliteitscontroles (o.a. "Mock community") is noodzakelijk om te komen tot één procedure met bekende prestatiekenmerken. Een dergelijke procedure kan in de gehele drinkwatersector worden toegepast.
- Metatranscriptomics is momenteel nog niet toepasbaar.
- Sequencing met MinION is veelbelovend maar optimalisatie is nodig om te komen tot kwaliteitsverbetering.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Toepassingsmogelijkheden van Metatranscriptomics, Microbial profiling en MinION sequencing* (BTO-2018.044).

Jaar van publicatie
2018

Meer informatie
Leo Heijnen
T 030-6069743
E leo.heijnen@kwrwater.nl

Keywords: MinION, NGS, DNA,
RNA, Microbial profiling,
metatranscriptomics, Next
Generation Sequencing

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl

KWR Watercycle
Research
Institute

BTO 2018.044 | Maart 2018 © 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.

Jaar van publicatie
2018

Meer informatie
Leo Heijnen
T 030-6069743
E leo.heijnen@kwrwater.nl

Keywords: MinION, NGS, DNA,
RNA, Microbial profiling,
metatranscriptomics, Next
Generation Sequencing

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl



BTO 2018.044 | Maart 2018 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden veeleelvoudigd, 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.

Jaar van publicatie
2018

Meer informatie
Leo Heijnen
T 030-6069743
E leo.heijnen@kwrwater.nl

Keywords: MinION, NGS, DNA,
RNA, Microbial profiling,
metatranscriptomics, Next
Generation Sequencing

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl



BTO 2018.044 | Maart 2018 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden veeleelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

Inhoud

Inhoud	7
1 Inleiding	8
1.1 Achtergrond	8
1.2 Onderzoeksdoelen	9
2 Toegepaste methoden	11
2.1 Microbial profiling	11
2.2 Bemonstering bij pompstation Nuland	13
3 Resultaten en Discussie	15
3.1 Toepassingsmogelijkheden van metatranscriptomics: literatuuronderzoek	15
3.2 Case studie: pompstation Nuland	19
4 Conclusies en aanbevelingen	42
4.1 Metatranscriptomics	42
4.2 Microbial profiling op DNA en RNA	43
4.3 Sequentieanalyse met MinION	43
5 Literatuur	45
Bijlage I algemene parameters	48
Bijlage II dominante OTU's in drinkwaterzuivering Nuland	49
Complete OTU tabellen:	55

1 Inleiding

1.1 Achtergrond

Voor de drinkwaterbereiding in Nederland spelen micro-organismen in de biologische zuiveringsprocessen een sleutelrol bij de biologische omzetting van o.a. organisch koolstof, ammonium, methaan, ijzer en/of mangaan. Deze omzettingen vinden plaats onder invloed van specifieke micro-organismen tijdens filtratieprocessen zoals zandfiltratie en actieve-koolfiltratie. Ondanks jarenlang onderzoek naar deze microbiologische processen, zijn er nog steeds productielocaties waar de verwijdering of omzetting van biologisch afbreekbare verbindingen in de filters onvoldoende plaatsvindt. Dit kan resulteren in de productie van water dat minder biologisch stabiel is waardoor nagroei van ongewenste bacteriën in het distributienet kan optreden (o.a. opportunistische ziekteverwekkers en *Aeromonas*). Met de huidige methoden kan maar zeer beperkt inzicht verkregen worden in de microbiologische processen die plaatsvinden tijdens de zuivering. Dit inzicht is vaak afgeleid van biologische stabiliteitsmetingen voor en na een zuiveringsproces of kwantificatie van specifieke bacteriesoorten met kweek of qPCR. Het grootste deel van de micro-organismen die in deze filters aanwezig zijn, blijft echter onbekend. Een groot deel van de biologische activiteit in de filters is, vooral in relatie tot afbraak van organisch koolstof, daarom nog een “black-box”.

Methoden die inzicht geven in de microbiologische processen kunnen mogelijk worden toegepast om deze processen gericht te sturen en te optimaliseren. De verwachting is dat dit zal leiden tot (i) een effectievere bedrijfsvoering (optimalisatie van bv. inlooptijd filters, spoelregime, regeneratie) waardoor kostenbesparing mogelijk is en (ii) een verbetering van de biologische stabiliteit van het behandelde water.

Next-Generation Sequencing (NGS) is een revolutionaire DNA-technologie waarmee het mogelijk is geworden om zeer gedetailleerd inzicht te krijgen in de aanwezigheid en activiteit van de microbiologische populaties. NGS kan worden ingezet voor het karakteriseren van microbiologische populaties door de samenstelling en volgorde (sequentie) van individuele moleculen van het 16S rRNA gen te bepalen (“Microbial profiling-DNA”). De sequentie van het 16S rRNA gen wordt algemeen toegepast als taxonomisch gen en is daardoor goed bruikbaar voor het identificeren van de bacteriegroepen in een populatie tot verschillende taxonomische niveaus (bv phylum, orde, familie, genus), zodat de samenstelling van de bacteriepopulatie kan worden gekarakteriseerd. Door de beschikbare kennis over de biochemische eigenschappen van bacteriële groepen geeft deze karakterisatie ook enig inzicht in de biochemische processen die potentieel onder invloed van de aanwezige bacteriën kunnen plaats vinden. Het is ook mogelijk om “microbial profiling” op het, in de bacteriële cellen aanwezige, 16S rRNA uit de bacteriële populatie uit te voeren (“Microbial profiling-RNA”). Doordat de concentratie 16S rRNA in actieve cellen hoger is dan in inactieve cellen (Li et al. 2017), zal het uitvoeren van microbial profiling op 16S rRNA inzicht geven in de samenstelling van vooral het actieve deel van de microbiologische populatie. Zeer recent zijn ook toepassingen beschreven waarbij de NGS technologie wordt toegepast voor het “inzoomen” op de actieve vorm van het genetisch materiaal, het zogenaamde messenger RNA (mRNA). Het mRNA bevat de genetische informatie voor de vorming van eiwitten en enzymen die nodig zijn om stoffen af te breken en celprocessen te laten

verlopen. Met de toepassing van NGS voor het sequencen van mRNA (Metatranscriptomics) is het mogelijk om bijvoorbeeld inzicht te krijgen in de actieve biochemische processen.

De volgende generatie van sequentieanalyse, na de NGS analyse in het laboratorium, is de ontwikkeling van eenvoudige geminiaturiseerde NGS apparatuur (zoals de MinION van de firma Oxford Nanopore) waarmee NGS-analyses mogelijk zelfs “op locatie” kunnen worden uitgevoerd. Het is te verwachten dat deze apparatuur doorontwikkeld zal worden tot toepassingen waarmee het mogelijk zou moeten zijn om snel en op locatie inzicht te krijgen in de microbiologische processen die plaats vinden tijdens bepaalde zuiveringsstappen.

1.2 Onderzoeksdoelen

Het doel van dit verkennend onderzoek (VO) binnen het BTO is om inzicht te krijgen in de toepasbaarheid van Microbial profiling-DNA, “Microbial profiling-RNA”, Metatranscriptomics en sequencing met MinION voor het bestuderen van biochemische processen die plaats vinden onder invloed van micro-organismen tijdens de drinkwaterbereiding is het volgende onderzoek uitgevoerd:

- *Microbial profiling-DNA:*
 - o Voor het uitvoeren van Microbial profiling op DNA van het 16S rRNA gen is bij KWR al ervaring aanwezig en zijn protocollen en apparatuur beschikbaar. Daarnaast is software beschikbaar voor het uitvoeren van de bioinformatica-analyses om daarmee de samenstelling van de aanwezige bacteriepopulatie in watermonsters te identificeren. Bij deze analyses vindt sequentieanalyse plaats van een fragment met een lengte van ca. 300 bp. van het 16S rRNA gen. In dit verkennend onderzoek zal worden onderzocht in hoeverre Microbial profiling op DNA inzicht geeft in de biochemische processen die in het zuiveringsproces of water plaats vinden.
- *Microbial profiling-RNA*
 - o In dit onderzoek wordt een protocol ontwikkeld voor het uitvoeren van microbial profiling op 16S rRNA en dit protocol zal worden toegepast op watermonsters na verschillende zuiveringsstappen waarop ook Microbial profiling-DNA wordt uitgevoerd. Aansluitend zullen de resultaten van deze beide analyses met elkaar worden vergeleken.
- *Metatranscriptomics*
 - o De toepassing van Metatranscriptomics analyses is volledig nieuw voor het microbiologische onderzoek in water. Het is daarom onduidelijk of er mogelijkheden zijn voor toepassing en daarom zal eerst een inventarisatie plaatsvinden van de in de wetenschappelijke literatuur aanwezige kennis. Op basis daarvan zal worden bepaald in hoeverre de ontwikkeling van protocollen binnen dit VO haalbaar is.
- *Sequentieanalyse met MinION*
 - o De MinION zal in dit onderzoek worden gebruikt voor sequentieanalyse van complete “full length” 16S rRNA genen en de resultaten zullen worden vergeleken met Microbial profiling-DNA

In dit onderzoek zullen de volgende stappen worden gezet:

- Literatuuronderzoek t.b.v. de ontwikkeling van protocollen voor het uitvoeren van Metatranscriptomics; Microbial profiling-RNA en sequentieanalyse van 16S rRNA sequenties op MinION

- Afhankelijk van de resultaten van het literatuuronderzoek zullen protocollen worden ontwikkeld voor de uitvoering van Metatranscriptomics; Microbial profiling-RNA; en sequentieanalyse van 16S rRNA gensequenties op MinION.
- De ontwikkelde protocollen zullen worden toegepast op één onderzoekssituatie in de praktijk ("case-studie"): pompstation Nuland (Brabant Water).

1.2.1 Case studie: pompstation Nuland

Voor het onderzoeken van de toepassingsmogelijkheden van bovenstaande DNA/RNA-technologieën worden analyses uitgevoerd op watermonsters afkomstig van pompstation Nuland met als doel om te achterhalen of het (i) mogelijk is beter inzicht te krijgen in de metabole processen die plaats vinden in de snelfilters (ii) of het mogelijk is om de MinION te gebruiken om inzicht te krijgen in de samenstelling van bacteriepopulaties in drinkwater. Er wordt gekozen voor pompstation Nuland omdat de verkregen informatie kan worden gebruikt om:

- Te achterhalen in hoeverre het mengen van middeldiep en diep gezuiverd grondwater leidt tot groei van bepaalde bacteriesoorten
- De analyses inzicht geven welke processen in de verschillende snelfilters plaatsvinden

2 Toegepaste methoden

2.1 Microbial profiling

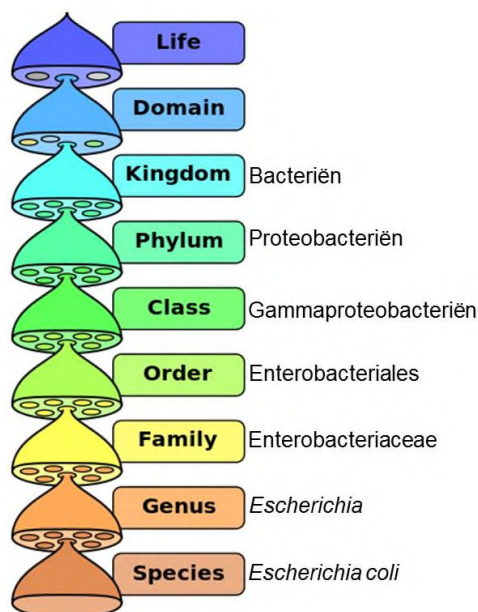
2.1.1 Isolatie van DNA en RNA

Voor het isoleren van DNA en RNA uit de watermonsters is een volume van ca. 1 liter water gefiltreerd over polycarbonaat membraanfilters met een poriegrootte van 0,2 µm. Voor het isoleren van een mengsel van DNA en RNA uit de, op het filter geconcentreerde micro-organismen, is de Power Microbiome Kit van de firma MoBio gebruikt. Deze kit is bedoeld voor isolatie van RNA maar het is ook mogelijk om een mengsel van RNA en DNA te isoleren. Dit mengsel van DNA en RNA is gebruikt voor microbial profiling op DNA en de resultaten zijn vergeleken met resultaten verkregen na het gebruik van de Powerbiofilm kit voor isolatie van DNA. De RNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research) is gebruikt om selectief het DNA af te breken en het RNA te zuiveren vanuit het DNA/RNA mengsel. Het gezuiverde RNA is vervolgens gebruikt voor het genereren van microbial profiles op het 16S rRNA.

2.1.2 Microbial profiling met Illumina MiSeq

Bij de NGS analyses met de Illumina MiSeq is in dit onderzoek sequentieanalyse van een deel van het 16S rRNA gen toegepast. Het 16S rRNA gen is aanwezig in alle bacteriën en delen van de sequentie van dit gen zijn bij alle bacteriën gelijk (geconserveerde regio's), terwijl de sequentie van andere delen van dit gen sterk varieert tussen verschillende bacteriegroepen (variabele regio's). De DNA-sequentie van deze variabele regio's wordt gebruikt voor het identificeren van de aanwezige bacteriën. Door gebruik te maken van synthetische DNA-moleculen (primers) welke specifiek binden aan een geconserveerde regio van het 16S rRNA gen is het mogelijk om m.b.v. PCR (Polymerase Chain Reaction) een fragment van het 16S rRNA gen te vermeerderen dat voorkomt bij alle bacteriesoorten. Het gebruik van primers die daarbij binden aan een geconserveerde regio maar flankeren aan een variabele regio van het 16S rRNA gen maakt het mogelijk om PCR-fragmenten te genereren die, tussen de primers, een variabel gebied van het 16S rRNA gen bevatten. Met NGS is het vervolgens mogelijk om de DNA-sequentie te bepalen van een mengsel van een groot aantal (max. ca. 15.000.000 in één MiSeq run) individuele PCR-fragmenten (amplicon) van het 16S rRNA gen. De DNA-sequenties van de individuele PCR fragmenten wordt m.b.v. software vergeleken met sequenties van 16S rRNA genen uit databases en op basis van deze vergelijking ingedeeld in bacteriële groepen op verschillende taxonomische niveaus. Een voorbeeld van de taxonomische indeling voor de bacteriesoort *Escherichia coli* is weergegeven in Figuur 1. Figuur 1: Taxonomische indeling van organismen met *E. coli* als voorbeeld. *E. coli* is daarbij de soortnaam die behoort tot het Geslacht (Genus) *Escherichia*, dat weer tot de Familie Enterobacteriaceae hoort, wat deel uitmaakt van de Orde Enterobacteriales. Dit Orde is onderdeel van de Klasse Gamma-Proteobacteriën van het Phylum Proteobacteriën, dat uiteindelijk onderdeel is van het Rijk Bacteriën. Doordat met deze aanpak slechts een deel van de DNA-sequentie van het 16S rRNA gen wordt bepaald, is het niet mogelijk om de sequenties tot op het niveau van "species" (soort) te identificeren. Identificatie van een groot deel van de sequenties is mogelijk tot op het niveau van familie en een kleiner deel tot op het niveau van genus (geslacht).

FIGUUR 1: TAXONOMISCHE INDELING VAN ORGANISMEN MET E. COLI ALS VOORBEELD



2.1.2.1 Genereren van 16S rRNA specifieke genfragmenten voor Illumina Miseq

Voor het identificeren van de bacteriën in een populatie wordt eerst een deel van het 16S rRNA gen vermenigvuldigd m.b.v. PCR. Voor deze vermenigvuldiging is primerpaar 515F-806R (Caporaso et al. 2012) gebruikt. Met dit primerpaar wordt een fragment van de v4 regio van het 16S rRNA gen gegenereerd met een lengte van ca. 291 bp. De toegepaste primers zijn verlengd met Illumina sequenties (adapters) waarmee binding aan de flowcell en de vorming van clusters op de flowcell plaats vindt. Voor het amplificeren van het specifieke DNA fragment is gebruik gemaakt van het enzym KAPA Hifi (KAPABiosystems). Dit enzym bevat proofreading activiteit waardoor het aantal fouten dat wordt geïntroduceerd tijdens de PCR reacties wordt beperkt. Tijdens een tweede PCR stap worden de verkregen PCR fragmenten van elk individueel monster voorzien van een unieke index-sequentie. Na elke PCR stap is de lengte van ieder PCR fragment gecontroleerd d.m.v. agarosegelelektroforese. De concentratie van de individuele PCR fragmenten is bepaald met de QuBit en equimolaire hoeveelheden van de PCR fragmenten (afkomstig van individuele monsters) zijn gemengd. De DNA-sequenties van individuele 16S rRNA genmoleculen uit het fragmentmengsel is bepaald met de Illumina MiSeq sequencer. Na het bepalen van de DNA-sequenties van ca. 15.000.000 sequenties van individuele DNA-moleculen worden de index-sequenties gebruikt voor het koppelen van DNA-sequenties aan de monsters waaruit de sequenties afkomstig zijn.

2.1.2.2 Taxonomische identificatie van 16S rRNA gensequenties afkomstig van Illumina MiSeq

Om te bepalen welke bacteriële groepen in de monsters aanwezig zijn, is gebruik gemaakt van het programma MOTHUR (Schloss et al. 2009). Dit programma zorgt eerst voor verbetering van de sequentiedata door eerst een aantal stappen uit te voeren waarin eventuele fouten uit de sequentiedata worden verwijderd, vervolgens wordt een programma toegepast waarmee chimere sequenties (artefacten die t.g.v. de PCR-reacties kunnen ontstaan) worden verwijderd. Na deze verbeteringsstappen worden sequenties ingedeeld in "Operational Taxonomic Units" (OTU's) waarbij alle 16S rRNA gensequenties met een sequentieovereenkomst van minimaal 97% ingedeeld worden binnen één OTU. Ten slotte gaat het programma in een database op zoek naar 16S rRNA gensequenties van

geïdentificeerde bacteriën die overeenkomen met de sequenties van de OTU's uit de dataset en gebruikt deze vergelijking voor taxonomische identificatie van de 16S rRNA gensequenties. Voor de taxonomische identificatie kan gebruik gemaakt worden van verschillende referentiealignments en taxonomische indelingen (Cole et al. 2009, DeSantis et al. 2006, Quast et al. 2013, Yilmaz et al. 2014). Bij dit onderzoek is gebruik gemaakt van de referentie-alignment en taxonomische indeling van Silva (Yilmaz et al. 2014). Voor het maken van verwantschapsbomen en PCoA plots om de verwantschap tussen bacteriële gemeenschappen weer te geven, is gebruik gemaakt van "microbiome analyst" (Dhariwal et al. 2017) op de website: <http://www.microbiomeanalyst.ca>).

2.1.3 Microbial profiling met MinION

Microbial profiling met de MinION is uitgevoerd op vrijwel "full length" 16S rRNA genen na amplificatie met primers met de volgende sequenties:

27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

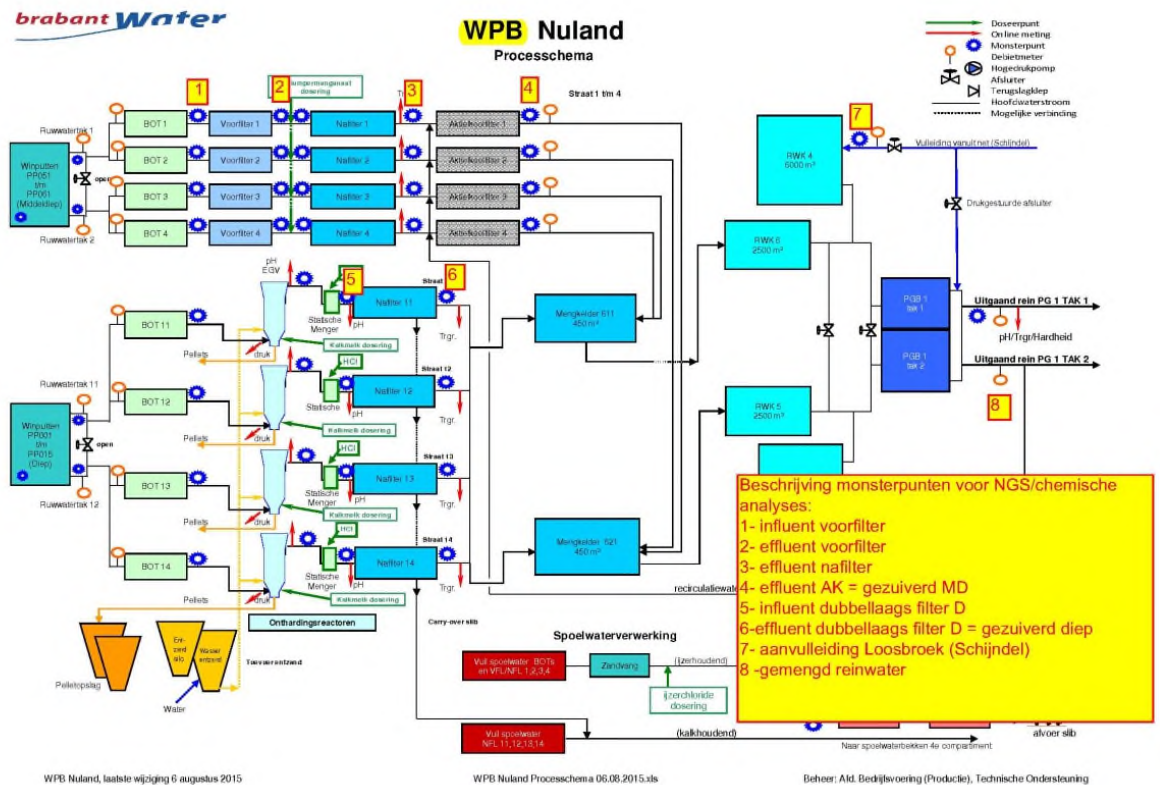
1492R: CGGTTACCTTGTACGACTT

Voor amplificatie van sequenties van het 16S rRNA gen is gebruik gemaakt van de 16S rapid barcoding kit van Oxford Nanopore. Deze kit bevat 27F en 1492R primers welke verlengd zijn met 12 verschillende barcode sequenties. Met deze primers is het mogelijk om amplicons te genereren afkomstig van 12 verschillende monsters waarbij de 16S rRNA gensequenties van elk van de 12 monsters wordt voorzien van een specifieke barcode. De sequentieanalyse is uitgevoerd op een mengsel van amplicons afkomstig van 12 monsters. De sequenties van de barcodes zijn gebruikt voor het onderscheiden van sequenties van de verschillende monsters. De sequentieanalyses zijn uitgevoerd op een versie 9.5 "Spot on" flowcell van de Minlon.

2.2 Bemonstering bij pompstation Nuland

Op 15, 23 en 29 maart 2017 zijn watermonsters verzameld bij pompstation Nuland. De watermonsters zijn afkomstig na verschillende zuiveringsstappen bij pompstation Nuland. Het ruwe water bij pompstation Nuland is afkomstig van twee waterstromen: winning van middeldiep grondwater (de monsterpunten 1, 2, 3 en 4 van Figuur 2) en winning van diep grondwater (5 en 6 van Figuur 2). Na verschillende zuiveringsstappen wordt het gezuiverde grondwater aangevuld met water wat wordt aangevoerd via een aanvoerleiding afkomstig vanuit een reinwaterkelder van waterzuivering Loosbroek. Van het door pompstation Nuland gedistribueerde water is 42,5% afkomstig van diep grondwater, 48,3% afkomstig van middeldiep grondwater en 8,6% van aanvoerleiding Loosbroek. In Figuur 2 zijn de bemonsterde locaties (1 t/m 8) weergegeven in het processchema van ps Nuland.

FIGUUR 2: SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN DRINKWATERZUIVERING NULAND



Op het water afkomstig van deze locaties zijn verschillende chemische en algemeen microbiologische analyses uitgevoerd. Een overzicht van de uitgevoerde analyses is weergegeven in Tabel 1. Naast de metingen zoals weergegeven in Tabel 1 is ook "Microbial profiling" op DNA en RNA uitgevoerd op alle monsters verzameld op de drie dagen (15, 23 en 29 maart 2017) afkomstig van acht locaties in de zuivering van Nuland. Om inzicht te krijgen in de reproduceerbaarheid van microbial profiling zijn de analyses op de monsters van 15 maart in drievoud uitgevoerd waarbij twee DNA-extracties zijn uitgevoerd op de monsters en vervolgens twee analyses zijn uitgevoerd op één DNA-monster en de andere analyse op het andere DNA monster.

3 Resultaten en Discussie

3.1 Toepassingsmogelijkheden van metatranscriptomics: literatuuronderzoek

Het uitvoeren van metatranscriptomics analyses is nieuw en er zijn in de wetenschappelijke literatuur nog geen toepassingen gevonden waarin metatranscriptomics voor onderzoek van drinkwater is beschreven. Hierdoor zijn geen standaardprotocollen beschikbaar en is eerst onderzoek uitgevoerd om te bepalen of i) het uitvoeren van metatranscriptomics analyses op drinkwatermonsters haalbaar is en ii) welke aanpak dan het beste gevolgd kan worden.

Bij metatranscriptomics wordt NGS toegepast voor het identificeren van de sequenties (samenstelling en volgorde van de bouwstenen van RNA: A, C, G en U) van het messenger RNA (mRNA) van de microbiologische gemeenschap ("transcriptoom"). Dit mRNA bevat de genetische informatie voor de vorming van eiwitten waaronder enzymen die nodig zijn om stoffen af te breken en celprocessen te laten verlopen. De aanwezigheid en concentratie van mRNA moleculen geeft dus een indruk van de mate waarin bepaalde eiwitten actief worden gevormd en daarmee een indicatie voor de mate waarin bepaalde microbiële processen actief plaats vinden. Met NGS is het mogelijk om in één experiment de sequenties van een zeer groot aantal fragmenten te bepalen zodat het mogelijk is om een overzicht te genereren van de relevante processen die plaatsvinden in een (water)monster (Wang et al. 2009).

Er zijn toepassingen beschreven van microbiële metatranscriptomics in aquatische milieus (Frias-Lopez et al. 2008, Gifford et al. 2013, Gifford et al. 2011, McCarren et al. 2010, Pascault et al. 2015) en bodem (Carvalhais et al. 2012, Carvalhais and Schenk 2013) maar zoals eerder beschreven zijn er nog geen toepassingen van metatranscriptomics beschreven voor de analyse van watermonsters met betrekkelijk weinig biomassa zoals het geval is voor drinkwater of water tijdens zuiveringsprocessen.

Om te bepalen welke technische uitdagingen er zijn voor het uitvoeren van metatranscriptomics voor het bepalen van het "transcriptoom" in (drink)watermonsters is literatuuronderzoek uitgevoerd.

De technische aanpak bestaat uit de volgende onderdelen:

1. Monstername: concentreren en conserveren
2. Isolatie van mRNA
3. Omzetting van RNA naar DNA (cDNA synthese)
4. Sequentieanalyse
5. Interpretatie van gegenereerde data: software en databases

Voor het uitvoeren van deze vijf onderdelen is in de wetenschappelijke literatuur gezocht naar beschrijvingen van mogelijkheden voor het uitvoeren van deze onderdelen.

3.1.1 Monstername: concentreren en conserveren

Om een zo goed mogelijk beeld te krijgen van het transcriptoom in een watermonster dat op locatie wordt genomen, is het van belang om speciale eisen te stellen aan de monstername die afwijken van de eisen die worden gesteld aan het nemen van monsters voor DNA-analyses. Bij DNA-analyses hebben alleen deling of afsterving van cellen (enige) invloed op de samenstelling van het DNA van de microbiologische populatie. Hierdoor is het mogelijk om een watermonster op locatie te nemen en vervolgens (gekoeld) te transporteren naar het laboratorium en daar binnen 24 uur het monster te filtreren en het filter (met de micro-organismen) bij -20°C te bewaren in een buffer totdat het DNA wordt geïsoleerd. Door de lage temperatuur en de geringe tijd tussen monstername en invriezen van de filters voor

isolatie van DNA, zal deze aanpak van monstername weinig invloed hebben op de samenstelling van de bacteriepopulatie en daarmee op de samenstelling van het DNA.

Voor microbiële metatranscriptomics is de situatie anders, door de metabole processen die plaatsvinden in de cellen van micro-organismen is de mRNA populatie in de cel niet stabiel. De samenstelling van de mRNA populatie kan snel veranderen als reactie op veranderende externe omstandigheden. Er zijn situaties bekend waarbij mRNA moleculen worden aangetoond met een halfwaardetijd van minder dan één minuut (Carvalhais et al. 2012, Deutscher 2006). Daarnaast worden halfwaardetijden van mRNA moleculen beïnvloed door het organisme waarin het mRNA zich bevindt en de omgeving waarin het organisme zich bevindt (Pascual et al. 2015). Om een representatief beeld te krijgen van het transcriptoom is het van belang om handelingen, die invloed hebben op de samenstelling van het transcriptoom, te beperken tot handelingen waarmee binnen korte tijd de samenstelling van het transcriptoom wordt geconserveerd. Aangezien verlaging van temperatuur aanleiding kan geven tot de vorming van mRNA moleculen welke coderen voor stress eiwitten (Keto-Timonen et al. 2016), is het waarschijnlijk niet voldoende is om de mRNA populatie te stabiliseren door gekoeld transport. Dit betekent dat concentratie van de microbiële populatie op locatie moet plaatsvinden, gevolgd door snelle conservering van het transcriptoom om daarmee een beeld te krijgen van de samenstelling van het transcriptoom zoals dat in het water aanwezig is. Voor NGS analyses van mRNA is daarbij de beschikbaarheid van vrij hoge concentraties RNA noodzakelijk. Van het aanwezige RNA in micro-organismen bestaat verreweg het grootste deel van het RNA uit ribosomaal RNA (rRNA) en bestaat slechts een zeer kleine fractie uit mRNA. Het is dan ook van belang om voldoende biomassa te concentreren, waardoor isolatie van voldoende RNA, en aansluitend analyse van het mRNA, mogelijk is.

Dit betekent dat een geschikte methode voor monstername bestaat uit de volgende stappen:

- Een concentratiestap waarmee in korte tijd de micro-organismen uit een voldoende groot volume kan worden geconcentreerd.
- Een conserveringsstap waarmee de samenstelling van de mRNA wordt "vastgelegd".

Voor de analyse van mRNA met NGS is een relatief grote hoeveelheid RNA nodig (Pascual et al. 2015) en persoonlijke communicatie met Tom van den Bogert, Baseclear, Leiden). Voor de analyse van het transcriptoom uit watermonsters met weinig biomassa (o.a. drinkwater en water tijdens zuiveringsprocessen) is te verwachten dat het concentreren van een groot volume water nodig is om aan deze hoeveelheid RNA te komen. In de onderzochte publicaties wordt het concentreren van de micro-organismen uit een groot volume water gedaan door het uitvoeren van meerdere filtraties waarmee eerst filtraties worden uitgevoerd door filters met een poriegrootte van $>1\mu\text{m}$ om de grotere deeltjes uit het water te verwijderen, waarna de micro-organismen vervolgens worden geconcentreerd op een filter met kleinere poriën ($0,2\mu\text{m}$). Een dergelijke aanpak heeft belangrijke nadelen:

- Het uitvoeren van meerdere membraanfiltraties "op locatie" is bewerkelijk en neemt relatief veel tijd in beslag waardoor deze aanpak lastig uit te voeren is en veranderingen in het transcriptoom t.g.v. de concentratiestap te verwachten zijn.
- Tijdens de eerste filtratiestap (poriegrootte van $>1\mu\text{m}$) worden de grotere deeltjes uit het water verwijderd. Hiermee worden ook de aan deeltjes gebonden bacteriën verwijderd, zodat met deze aanpak RNA wordt geïsoleerd waarmee geen volledig beeld zal worden gevormd van het transcriptoom.

Als alternatief voor de concentrering van watermonsters kan gedacht worden aan de volgende opties:

- Het toepassen van Sterivex filters met poriegrootte van $0,22\mu\text{m}$ (Millipore: <http://www.merckmillipore.com/NL/en/product/Sterivex%E2%84%A2-Filter->

[Units,MM_NF-C3235?bd=1](#)). Met Sterivex filters is het volgens de leverancier van de filters mogelijk om grotere volumes te concentreren waarbij ook de grotere deeltjes worden geconcentreerd. Vanwege de beperkte omvang van de Sterivex filters (met een filteroppervlak van 10 cm²) is wel de vraag in hoeverre in alle situaties een voldoende groot volume in korte tijd kan worden geconcentreerd.

- Het toepassen van Hemoflow filters. Met Hemoflow filters is het mogelijk om deeltjes uit grote volumes water, met hoge opbrengst, te concentreren. Bij het gebruik van Hemoflow filters als cross-flow filters (zoals door KWR veel wordt toegepast) is te verwachten dat het langdurig rondpompen van het water zorgt voor introductie van lucht in het water en mogelijk ook voor verandering van de watertemperatuur. Er is te verwachten dat deze veranderingen ook invloed zullen hebben op het transcriptoom. Mogelijk dat met het gebruik van Hemoflow filters als “dead end” filter in beperkte tijd voldoende water kan worden geconcentreerd.

Conservering van het RNA

Om het transcriptoom, zoals dat in het water aanwezig is, te conserveren is het van belang om maatregelen te nemen om het transcriptoom te stabiliseren. Het snel invriezen van de filters in vloeibare N₂ is een optie die wordt gebruikt. Vanwege transport van het monster naar het laboratorium is deze optie, i.v.m. veiligheidsissues, lastig uitvoerbaar. Als alternatief kunnen commercieel verkrijgbare oplossingen zoals RNALater (Qiagen), Lifeguard (MoBio) of Longmire buffer (Williams et al. 2016) gebruikt worden. De chemicaliën uit de oplossing (o.a. ammoniumsulfaat) dringen de cel binnen en zorgen in de cel voor denaturatie van eiwitten waardoor de biochemische processen (en ook de vorming en afbraak van mRNA) worden stilgelegd. Praktisch gezien is, vanwege de hoge concentratie chemicaliën in deze conserveringsbuffers, het niet mogelijk om deze methoden op een groter volume water toe te passen (zoals een hemoflow-concentraat) maar is het noodzakelijk de organismen uit het water te concentreren tot een minimaal volume (< 1ml) en vervolgens het transcriptoom te conserveren. Bij toepassing van Sterivex of Hemoflow filters is dit alleen mogelijk als de filters gebruikt worden als “Dead-end” filter zodat geen “restvolume” in het filter achterblijft.

3.1.2 Isolatie van RNA en selectie van mRNA

Om een goed beeld te krijgen van de samenstelling van het transcriptoom is het van belang om een methode voor het isoleren van RNA te selecteren waarmee het RNA van alle micro-organismen met dezelfde efficiëntie wordt geïsoleerd. Naast mRNA bevatten (micro-) organismen ook ribosomaal RNA (rRNA: 5S/16S/23S rRNA bij bacteriën en 5/5,8S/18S/28S rRNA bij eukaryoten zoals dieren, planten, protozoa, schimmels en gisten) en t(transfer)RNA. In cellen is de concentratie mRNA slechts een klein deel van de totale concentratie RNA. Het grootste deel van het RNA vormt rRNA, voor bacteriën geldt dat ca. >80% van het geïsoleerde RNA bestaat uit rRNA en tRNA (van Vliet 2010). Dit zorgt ervoor dat bij het willekeurig sequencen van de totale populatie RNA moleculen vooral sequentie-informatie wordt verkregen van de aanwezige rRNA moleculen en minder van de mRNA moleculen. Sequentie-informatie van de populatie rRNA moleculen geeft waardevolle informatie over de actieve fractie van de aanwezige groepen micro-organismen, maar geeft vrijwel geen (of slechts indirecte) informatie over de biochemische processen die door micro-organismen worden uitgevoerd. Daarom is het van belang om voldoende sequentiedata te genereren zodat ook data beschikbaar komt van de, minder dominante, mRNA populatie. Om de sequentieanalyse meer te richten op het mRNA is het mogelijk om de geïsoleerde populatie totaal-RNA te verrijken voor mRNA. Doordat slechts een klein deel van de RNA populatie bestaat uit mRNA en relatief veel RNA nodig is voor het genereren van voldoende sequenties m.b.v. NGS is het van belang om veel RNA te isoleren uit een watermonster. Het is daardoor waarschijnlijk

noodzakelijk om een enzymatische vermeerderingsstap uit te voeren, zodat de RNA concentratie wordt verhoogd.

Isolatie van RNA uit water

Voor isolatie van RNA uit water t.b.v. metatranscriptomics worden in de wetenschappelijke literatuur verschillende mogelijkheden beschreven en zijn er diverse commercieel verkrijgbare producten beschikbaar. Bij veel van beschreven methoden wordt gebruik gemaakt van toxische chemicaliën (zoals phenol, chloroform en β -mercaptoethanol) waardoor speciale veiligheidsmaatregelen moeten worden toegepast en isolaties moeten worden uitgevoerd in een zuurkast. Van de firma Biozym is een isolatiekit beschikbaar (ZR Soil/Fecal RNA MicroPrep) waarmee isolatie van 10 μ g RNA uit feces of grondmonsters mogelijk is en waarbij de opwerking niet hoeft plaats te vinden in een zuurkast.

Verrijken van bacterieel mRNA

Bij het analyseren van mRNA populaties afkomstig van eukaryote cellen wordt gebruik gemaakt van de eigenschap dat mRNA moleculen zijn voorzien van een poly-A staart (lange rij A-nucleotiden aan het uiteinde van mRNA moleculen). Deze poly-A staart kan, door gebruik te maken van een vaste drager (zoals magnetische beads) met hieraan synthetische poly-T DNA moleculen gekoppeld, gebruikt worden om de mRNA moleculen selectief uit de totale populatie RNA te isoleren. Aangezien bacteriële mRNA moleculen onder normale omstandigheden niet zijn voorzien van een poly-A staart (Deutscher 2003), is deze aanpak niet mogelijk voor de isolatie van mRNA van bacteriën. Voor het verrijken van mRNA uit de totale populatie van het geïsoleerde RNA van bijvoorbeeld bacteriën zijn wel methoden beschikbaar waarmee andere RNA-typen (rRNA en tRNA) zoveel mogelijk kunnen worden verwijderd (van Vliet 2010).

- Methoden waarbij exonucleases worden gebruikt om rRNA moleculen af te breken vanwege de aanwezigheid van monofosfaat aan het 5'-uiteinde.
 - o mRNA-ONLY prokaryotic mRNA isolation kit van EPICENTRE Biotechnologies: <http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/mrna-only-prokaryotic-mrna-isolation-kit.pdf>
- Het gebruik van selectieve synthetische DNA-moleculen ("capture probes") die specifiek binden aan 16S en 23S rRNA moleculen uit de populatie voor het verwijderen van 16S en 23S rRNA.
 - o MICROBExpress voor verwijderen van 16S en 23S bacterieel rRNA: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1905>
 - o MICROBEnrich voor verwijderen van eukaryoot 18S en 26S rRNA. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1901?CID=search-product>
- Methoden (zoals MICROBEnrich en MICROBExpress van Ambion) waarbij "capture probes" worden gebruikt voor selectie van alleen het RNA afkomstig van bacteriën uit een populatie van RNA van een mengsel van bacteriën en eukaryoten.
 - o mRNA- ONLY prokaryotic mRNA isolation kit van EPICENTRE Biotechnologies: <http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/mrna-only-prokaryotic-mrna-isolation-kit.pdf>
 - o MICROBEnrich voor verwijderen van eukaryoot 18S en 26S rRNA. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1901?CID=search-product>
- Zuivering op basis van de grootte van de RNA moleculen waarbij grote rRNA moleculen worden verwijderd en kleine mRNA moleculen niet worden verwijderd.
 - o RiboMinus™ Transcriptoom Isolation Kit: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K155004>

Benodigde concentratie RNA

Doordat slechts een klein deel van de totale populatie RNA bestaat uit mRNA is het noodzakelijk om een vrij grote hoeveelheid RNA te isoleren uit watermonsters. In een aantal van de wetenschappelijk publicaties (waar oppervlaktewater of bodem wordt geanalyseerd) wordt een hoeveelheid van ca. 5 µg genoemd. In pilotexperimenten zal worden onderzocht in hoeverre het mogelijk is om een dergelijke hoeveelheid RNA te isoleren uit een groot volume watermonster.

Als het niet mogelijk blijkt om voldoende RNA te isoleren uit een groot volume watermonster dan zal het nodig zijn om de hoeveelheid RNA te vermeerderen d.m.v. enzymatische vermenigvuldiging ("in-vitro transcriptie") m.b.v. een kit zoals de MessageAmp-II-Bacteria Kit: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1790>. Het toepassen van een dergelijke methode heeft het risico dat deze vermenigvuldiging grote invloed heeft op de samenstelling van het oorspronkelijke transcriptoom (introductie van "bias").

3.1.3 Omzetten van RNA naar DNA

Voor het analyseren van sequenties is het noodzakelijk om het RNA eerst om te zetten naar DNA. Voor deze omzetting wordt gebruik gemaakt van het enzym "Reverse Transcriptase" (RT), met dit enzym is het mogelijk om RNA als template te gebruiken voor het maken van een DNA-copy (copy-DNA, cDNA). Er zijn diverse commercieel verkrijgbare producten beschikbaar. Er lijkt geen voorkeur te zijn voor het gebruik van reagentia van één specifieke leverancier.

3.1.4 Sequentie analyse voor Metatranscriptomics

In watermonsters is een diverse populatie mRNA moleculen te verwachten. Om een goed beeld te krijgen van het microbiome in water is het daardoor noodzakelijk om veel sequentiedata te genereren zodat de informatie niet beperkt blijft tot alleen de meest dominante mRNA's van het transcriptoom. Voor dergelijke analyses wordt in de wetenschappelijke literatuur het gebruik van de Illumina HiSeq beschreven. Met dit systeem is het mogelijk om in één experiment 100 keer meer sequenties te bepalen dan met de, bij KWR beschikbare, Illumina MiSeq. Het uitvoeren van analyses op een HiSeq is mogelijk bij speciale service providers zoals Baseclear (Leiden). De geschatte kosten hiervoor zijn € 15.000 waarmee voldoende sequentiedata wordt gegenereerd voor de analyse van ca. 10 monsters.

3.1.5 Conclusies n.a.v. literatuuronderzoek metatranscriptomics

Op basis van het literatuuronderzoek is geconcludeerd dat te verwachten is dat het uitvoeren van metatranscriptomics analyses op (drink)watermonsters (met weinig biomassa) op dit moment nog veel haken en ogen kent en daardoor moeilijk uitvoerbaar is. Enerzijds is te verwachten dat het moeilijk is om voldoende RNA te isoleren waardoor grote volumes moeten worden geconcentreerd en anderzijds zal het concentreren van grote volumes invloed hebben op het metatranscriptoom. Daarnaast zijn de kosten voor het genereren van voldoende sequentiedata momenteel nog hoog. Er is daarom gekozen om geen metatranscriptomics analyses uit te voeren binnen deze case studie en de mogelijkheden van Metatranscriptomics analyses verder te onderzoeken binnen het TKI project "Microbial profiling bij duininfiltratie".

3.2 Case studie: pompstation Nuland

Om de toepassingsmogelijkheden van Microbial profiling-DNA en Microbial profiling-RNA te onderzoeken zijn deze methoden toegepast op een case studie bij pompstation Nuland (Brabant Water).

Bij pompstation Nuland wordt drinkwater geproduceerd uit drie waterstromen: één stroom afkomstig van winningen waarbij water wordt onttrokken uit middeldiep grondwater (stroom nr. 1, 2, 3, 4 in Figuur 2); één stroom afkomstig van diepe grondwaterwinningen (stroom nr. 5 en 6 in Figuur 2) en dit water wordt aangevuld met drinkwater van de aanvoleiding "Loosbroek". Van het geleverde drinkwater is 42,5% afkomstig van het diepe grondwater, 48,3% van het middeldiepe grondwater en 9,2% van de aanvoleiding Loosbroek. Op basis van eerdere onderzoeken van deze zuivering zijn er indicaties dat de waterkwaliteit negatief wordt beïnvloed door het mengen van middeldiep met diep grondwater (van der Wielen 2013, van der Wielen and van der Kooij 2008). Mogelijk dat door deze menging groeilimities in de afzonderlijke watertypen worden opgeheven, waardoor groei van specifieke bacteriegroepen optreedt, dat resulteert in een verminderde waterkwaliteit. Daarnaast geven de microbial profiles in combinatie met (bio)chemische parameters mogelijk inzicht in de bacteriële processen die plaats vinden tijdens de verschillende zuiveringsstappen en de microbiële veranderingen die optreden bij het mengen van de verschillende waterstromen.

3.2.1 Algemene biologische en chemische parameters

Op 15, 23 en 29 maart 2017 zijn watermonsters verzameld van verschillende stadia van de drinkwaterzuivering in Nuland. In een deel van deze monsters is de concentratie Methaan, Ijzer, Mangaan, Ammonium, Ortho-fosfaat en TOC (Totaal Organisch Carbon) bepaald en in alle verzamelde monsters is de concentratie ATP (als maat voor de concentratie actieve biomassa) bepaald. De resultaten van deze metingen zijn samengevat in Tabel 1.

TABEL 1: METHAAN, IJZER, MANGAAN, AMMONIUM, ORTHO-FOSFAAT, TOC, EN ATP CONCENTRATIES

Locatie (herkomst: figuur 2)	Locatie code	Datum	Methaan (µg/l)	Ijzer (mg/l)	Mangaan (µg/l)	Ammonium (mg NH ₄ -N/l)	Ortho-fosfaat (µg PO ₄ -P/l)	TOC (mg C/l)	ATP (pg/ml)
Influent voorfilter (Middeldiep grondwater: 1)	NULA-BO-2301	15-03 23-03 29-03							3.8 4.2 4.9
Effluent voorfilter (Middeldiep grondwater: 2)	NULA-VF-4101	15-03 23-03 29-03							5.6 4.8 5.1
Effluent nafiliter (Middeldiep grondwater: 3)	NULA-NF-4201	15-03 23-03 29-03							4.7 2.0 2.6
Effluent actief kool (Middeldiep grondwater: 4)	NULA-KF-4301	15-03 23-03 29-03					5.0 9.0 7.0	5.7 4.7 5.0	3.0 2.9 4.9
Influent dubbellaags filter D (Diep grondwater: 5)	NULA-VF-3811	15-03 23-03 29-03	12.0 9.0 14.0	0.5 0.4 0.4	10.0 7.8 8.1	0.4 0.4 0.5			56.0 37.0 39.0
Effluent dubbellaags filter D (Diep grondwater: 6)	NULA-NF-4011	15-03 23-03 29-03	5.0 < 5 6.0	0.1 0.0 0.0	0.6 < 0,60 < 0,60	< 0,015 < 0,015 < 0,015	8.0 24.0 21.0	1.8 1.9 1.9	4.5 4.9 3.8
Aanvoleiding Loosbroek (Aanvoleiding: 7)	NULA-RW-0911	15-03 23-03 29-03					115.0 92.0 112.0	1.5 1.7 1.6	2.0 2.2 2.2
Gemengd reinwater (Reinwater: 8)	NULA-RW-1993	15-03 23-03 29-03					6.0 15.0 25.0	3.1 3.1 3.0	6.1 7.4 5.0

Bovenstaande metingen maken het volgende duidelijk:

- Methaan, ijzer, ammonium en mangaan
 - o De concentratie van deze parameters is in het diepe grondwater voor het dubbellaags filter D hoger dan na dit filter. Dit dubbellaags filter zorgt dus voor verwijdering van een groot deel van het methaan, ijzer, ammonium en mangaan.
- Ortho-fosfaat
 - o De concentratie ortho-fosfaat is laag in het middeldiepe grondwater na actieve-koolfiltratie.
 - o De concentratie ortho-fosfaat is hoger in het diepe grondwater na het dubbellaags filter D en aanmerkelijk hoger in het water van de aanvoleiding van Loosbroek.
 - o In het gemengde reinwater is de concentratie laag.

- TOC
 - o De concentratie TOC is hoger in het middeldiepe grondwater na actieve koolfiltratie dan in het diepe grondwater na dubbellaags filter D en in het water van aanvuleiding Loosbroek.
- ATP
 - o De concentratie ATP is vooral hoog in het diepe grondwater vóór het dubbellaags filter D. Het is niet te verwachten dat veel van deze actieve biomassa afkomstig is uit het diepe grondwater, mogelijk dat de beluchtingstorens en onthardingsreactoren, die voor het dubbellaags filter zijn, bijdragen aan een toename van ATP. De ATP-concentratie wordt verlaagd door het dubbellaags filter D.

Het middeldiepe grondwater wordt na actieve koolfiltratie gemengd met het diepe grondwater (na dubbellaags filter D) en met het water van aanvuleiding Loosbroek waarbij de mengverhouding 48,3% middeldiep grondwater, 42,5% diep grondwater en 9,2% aanvuleiding Loosbroek is. Op basis van deze mengverhouding is berekend welke concentratie Ortho-fosfaat, TOC en ATP in het reine water te verwachten is en in hoeverre deze verwachting afwijkt van de gemeten concentraties. Het resultaat van deze berekening is weergegeven in Tabel 2.

TABEL 2 GEMETEN EN, OP BASIS VAN MENGVERHOUDINGEN, BEREKENDE CONCENTRATIE ORTHO-FOSFAAT, TOC EN ATP

Locatie	Datum	Ortho-fosfaat (µg PO ₄ -P/l)		TOC (mg C/l)		ATP (pg/ml)	
		Gemeten	Mengverhouding	Gemeten	Mengverhouding	Gemeten	Mengverhouding
Gemengd reinwater	15-03	6,0	16,6	3,1	3,4	6,1	3,6
	23-03	15,0	23,9	3,1	3,1	7,4	3,8
	29-03	25,0	23,4	3,0	3,2	5,0	4,1
	Gem	15,3	21,3	3,1	3,2	6,2	3,9

Deze analyses laten zien dat er in het gemengde reine water minder Ortho-fosfaat gemeten wordt dan er op basis van mengen van de drie waterstromen te verwachten is. Mogelijk dat er in het laatste traject nog ortho-fosfaat wordt omgezet of neerslaat met andere stoffen (bijvoorbeeld ijzer). De concentratie TOC in het reine water komt overeen met de concentratie die op basis van menging van de drie waterstromen te verwachten is. De concentratie ATP is in het reine water hoger (1,6X) dan de concentratie die te verwachten zou zijn op basis van alleen menging. Dit suggereert dat menging van de drie waterstromingen zorgt voor een (beperkte) toename (groei) van de actieve biomassa.

3.2.2 Microbial profiling: DNA

Voor het uitvoeren van Microbial profiling op DNA heeft sequentieanalyse plaatsgevonden van een fragment met een lengte van ca. 300 bp. van het 16S rRNA gen. Met deze analyse wordt inzicht verkregen in de samenstelling van de bacteriële gemeenschap en de verschillen tussen de bacteriële gemeenschappen. Door microbial profiling uit te voeren op DNA wordt geen inzicht verkregen in de activiteit van de bacteriën in de populatie. Door de aanwezigheid van één of meerdere 16S rRNA genen in elke bacteriecel (actief en inactief) zal ook het inactieve deel van de populatie met microbial profiling op DNA zichtbaar worden gemaakt. In dit verkennend onderzoek is onderzocht in hoeverre microbial profiling op DNA inzicht geeft in de veranderingen van de microbiologie en de daaraan gerelateerd biochemische processen die in de zuiveringsprocessen en water plaatsvinden.

3.2.2.1 Reproduceerbaarheid microbial profiling van DNA

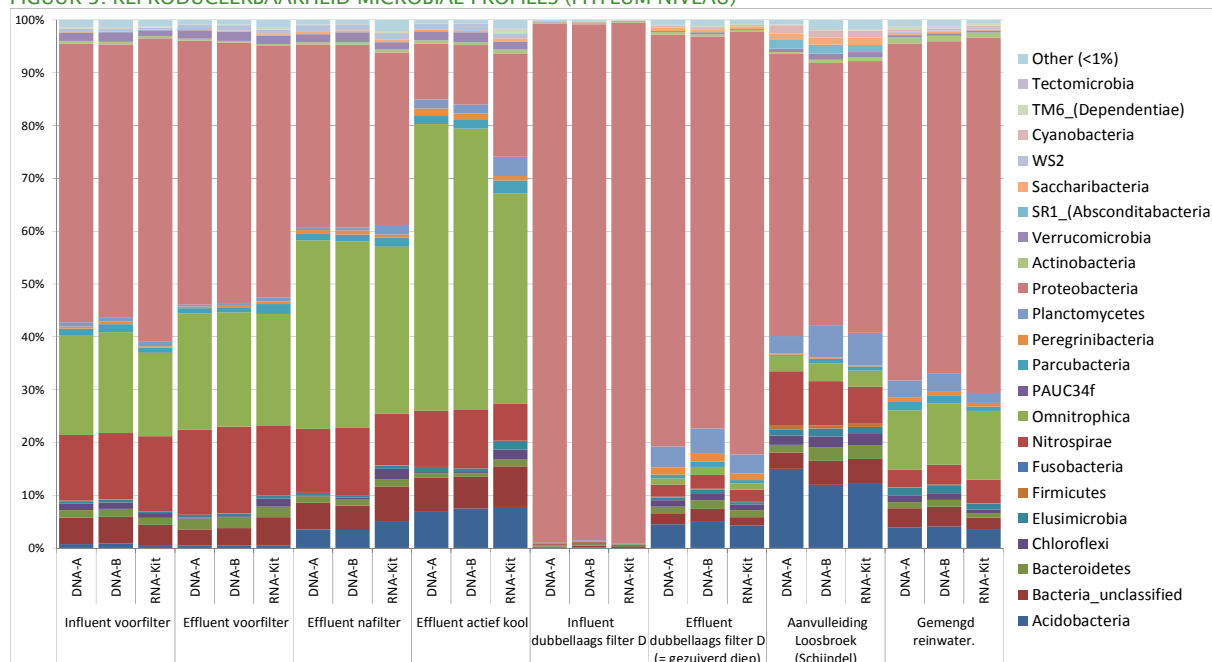
Om een indruk te krijgen van de reproduceerbaarheid van de toegepaste NGS methode zijn, op de eerste serie monsters (van 15 maart), analyses in drievoud uitgevoerd. Twee analyses zijn uitgevoerd op één DNA-monster en de derde analyse is uitgevoerd op een extra DNA-monsters waarbij het DNA is geïsoleerd met de isolatiekit voor RNA ("Power Microbiome"). Van de toegepaste methode voor isoleren van RNA wordt door de producent van de isolatiekit geclaimd dat deze ook geschikt is voor de isolatie van DNA. Aangezien in dit onderzoek de resultaten van Microbial profiling op DNA en Microbial profiling op RNA worden vergeleken heeft het de voorkeur om met één isolatiemethode zowel DNA als RNA te isoleren. Het aantal sequenties wat is gegenereerd op deze monsters voor microbial profiling op DNA is weergegeven in Tabel 3.

TABEL 3: AANTAL SEQUENTIES PER MONSTER, EERSTE SERIE, VERSCHILLENDE ISOLATIES

Locatie	Monsternr.	Isolatiekit	aantal sequenties
Influent voorfilter	27825_DNA_A	DNA	47282
	27825_DNA_B	DNA	86665
	27834_DNA	RNA	59449
Effluent voorfilter	27826_DNA_A	DNA	34234
	27826_DNA_B	DNA	51272
	27835_DNA	RNA	51326
Effluent nafilter	27827_DNA_A	DNA	21113
	27827_DNA_B	DNA	27927
	27836_DNA	RNA	33761
Effluent actief kool	27828_DNA_A	DNA	11659
	27828_DNA_B	DNA	24885
	27837_DNA	RNA	34917
Influent dubbellaags filter D	27824_DNA_A	DNA	53788
	27824_DNA_B	DNA	86380
	27833_DNA	RNA	9243
Effluent dubbellaags filter D	27829_DNA_A	DNA	46493
	27829_DNA_B	DNA	83016
	27838_DNA	RNA	58286
Aanvulling Loosbroek	27831_DNA_A	DNA	10369
	27831_DNA_B	DNA	29031
	27840_DNA	RNA	26235
Gemengd reinwater.	27830_DNA_A	DNA	42157
	27830_DNA_B	DNA	54928
	27839_DNA	RNA	37960

Vervolgens zijn van deze monsters microbial profiles gegenereerd op phylum niveau. Met deze analyses wordt een overzicht verkregen van de samenstelling van en de verschillen tussen de bacteriële populaties op relatief laag taxonomisch niveau (Figuur 3).

FIGUUR 3. REPRODUCEERBAARHEID MICROBIAL PROFILES (PHYLUM NIVEAU)



Alle groepen die minder dan 1% van de gehele populatie uitmaken zijn in één groep weergegeven "Other (<1%)".

Bovenstaande analyses maken duidelijk dat op phylumniveau weinig variatie is in de microbial profiles bij duplo analyses (twee identieke analyses op één DNA-monster: DNA-A en DNA-B) en dat ook de microbial profiles welke worden gegenereerd met DNA geïsoleerd met de "Power Microbiome" kit, weinig verschillen ten opzichte van de microbial profiles afkomstig van DNA geïsoleerd met de standaard methode. Aansluitend is ook een vergelijking van deze profiles uitgevoerd op OTU-niveau en zijn de resultaten samengevat in een verwantschapsboom (Figuur 5). Ook deze vergelijking laat zien vergelijkbare resultaten worden verkregen bij gebruik van de verschillende DNA-isolatiemethoden en het uitvoeren van meerdere analyses op DNA uit hetzelfde monster. Voor de vervolgstappen in dit onderzoek is daarom gekozen om DNA isolaties uit te voeren met de "Power Microbiome" kit voor RNA en hierop microbial profiling analyses op zowel DNA als RNA uit te voeren.

3.2.2.2 Vergelijking van de bacteriële populaties in pompstation Nuland

Op DNA van alle verzamelde monsters zijn NGS analyses uitgevoerd waarbij sequenties zijn gegenereerd van ca 300bp van het 16S rRNA gen en vervolgens zijn met het programma MOTHUR (Schloss et al. 2009) de sequenties verder geanalyseerd. Aangezien in paragraaf 3.2.1 is vastgesteld dat de microbial profiles van meerdere analyses van hetzelfde monster (van de monsterserie van 15 maart) vergelijkbaar zijn is ervoor gekozen om de drie herhaalde analyses te beschouwen als één analyse waarbij de geïdentificeerde sequenties uit de drie analyses bij elkaar zijn opgeteld. In

Tabel 4 is het aantal sequenties weergegeven waarop de microbial profiling analyses zijn uitgevoerd.

TABEL 4: AANTAL SEQUENTIES PER MONSTER

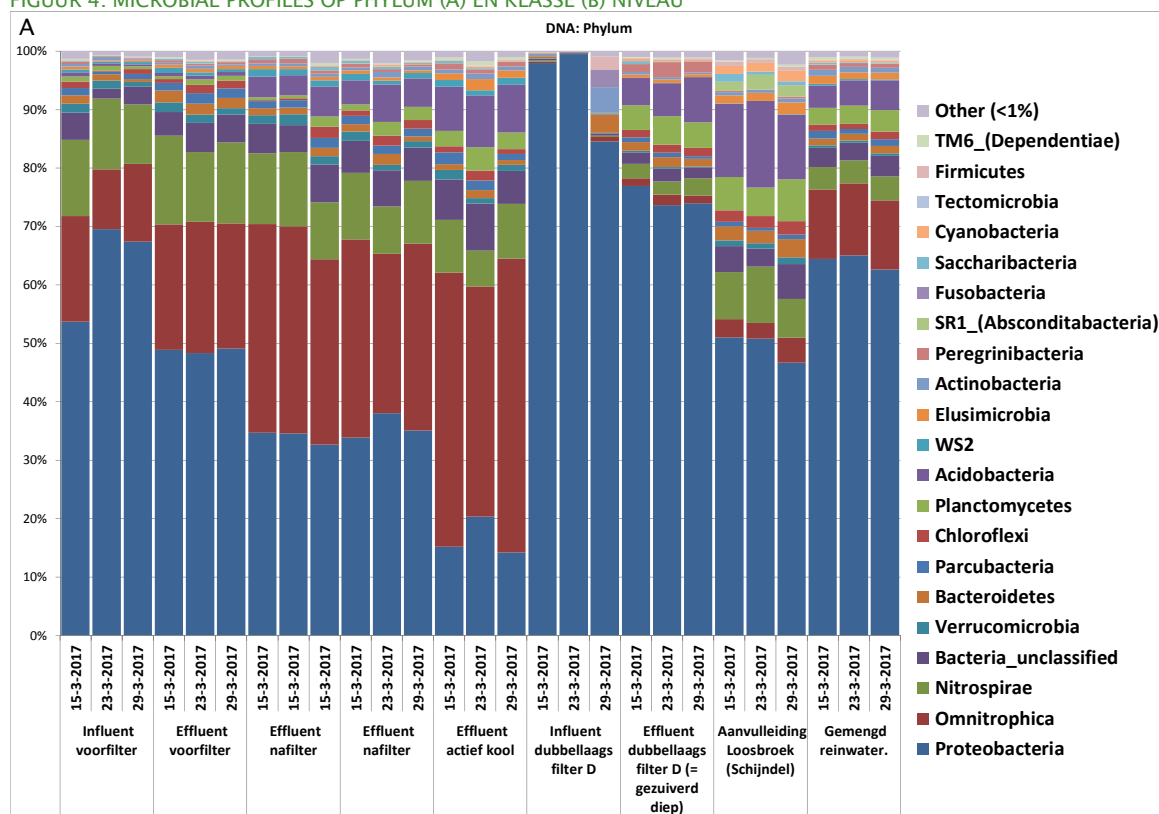
Locatie	Locatie code	Datum	Monster Nummer	Aantal Sequenties
Influent voorfilter	NULA-BO-2301	15-03-17	27825_DNA_A 27825_DNA_B 27834_DNA	193396*
		23-03-17	28445_DNA	56412
		29-03-17	28772_DNA	68102
Effluent voorfilter	NULA-VF-4101	15-03-17	27826_DNA_A 27826_DNA_B 27835_DNA	138832*
		23-03-17	28446_DNA	57394
		29-03-17	28773_DNA	52936
Effluent nafilter	NULA-NF-4201	15-03-17	27827_DNA_A 27827_DNA_B 27836_DNA	82801*
		23-03-17	28447_DNA	42951
		29-03-17	28774_DNA	46333
Effluent actief kool	NULA-KF-4301	15-03-17	27828_DNA_A 27828_DNA_B 27837_DNA	71461*
		23-03-17	28448_DNA	38121
		29-03-17	28775_DNA	28516
Influent dubbellaags filter D	NULA-VF-3811	15-03-17	27824_DNA_A 27824_DNA_B 27833_DNA	149411*
		23-03-17	28444_DNA	54627
		29-03-17	28771_DNA	5297
Effluent dubbellaags filter D	NULA-NF-4011	15-03-17	27829_DNA_A 27829_DNA_B 27838_DNA	187795*
		23-03-17	28449_DNA	71155
		29-03-17	28776_DNA	45489
Aanvulling Loosbroek	NULA-RW-0991	15-03-17	27831_DNA_A 27831_DNA_B 27840_DNA	65635*
		23-03-17	28451_DNA	18280
		29-03-17	28778_DNA	36687
Gemengd reinwater	NULA-RW-1993	15-03-17	27830_DNA_A 27830_DNA_A 27839_DNA	135045*
		23-03-17	28450_DNA	44318
		29-03-17	28777_DNA	42151

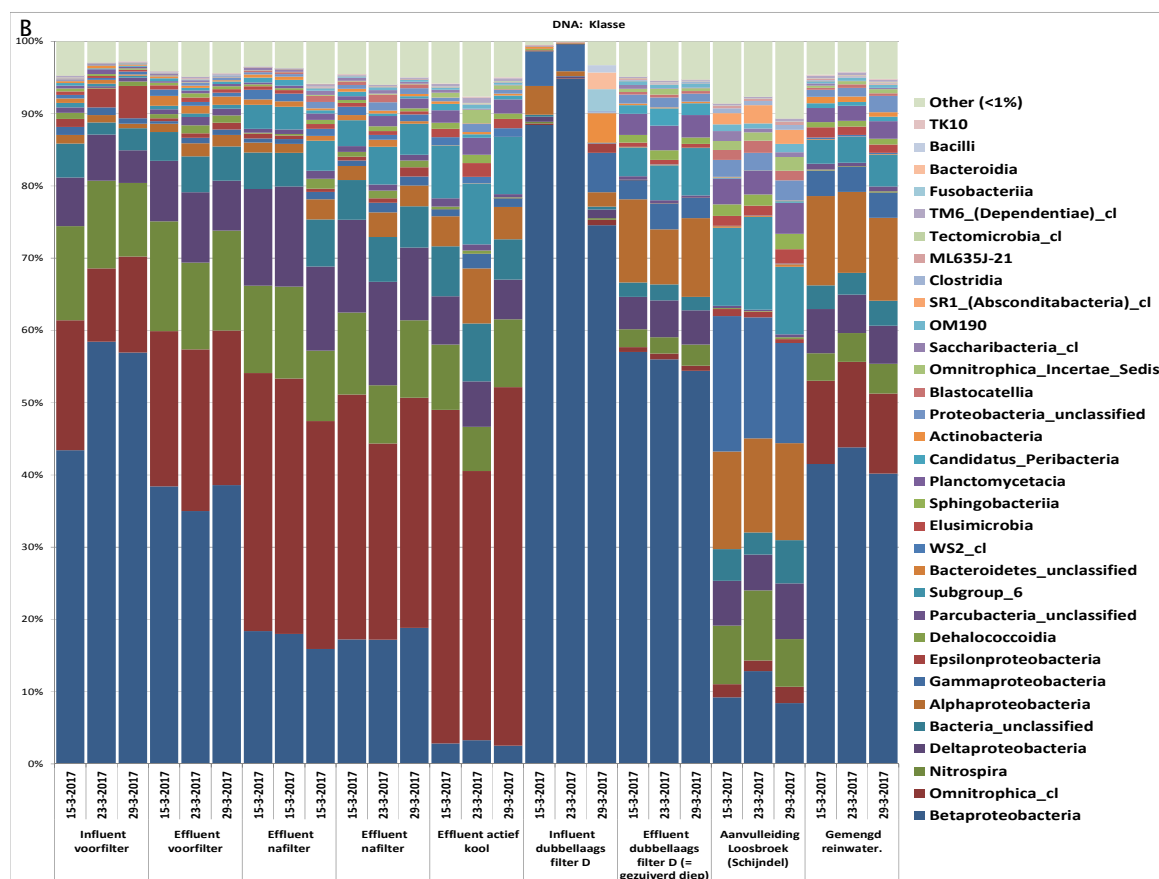
*Afkomstig van drie NGS analyses

Het aantal sequenties dat per monster met één NGS analyse is verkregen varieert sterk (van 5297 tot 71155) met gemiddeld 41418 sequenties per monster. Lage aantallen sequenties, zoals voor het monster influent dubbellaags filter D, 29-3-2017, zorgen ervoor dat mogelijk geen volledig beeld wordt verkregen van de samenstelling van de populatie waardoor de zeldzamere bacteriën in de populatie niet zullen worden gedetecteerd. Het is nu nog onduidelijk waardoor deze variatie wordt veroorzaakt. Mogelijk dat de meting van de concentratie DNA na de PCR, die nodig is om het 16S rRNA genfragment te vermeerderen,

niet voldoende nauwkeurig is waardoor variabele hoeveelheden DNA of DNA met variabele kwaliteit wordt gesequenced. Vervolgonderzoek is nodig om duidelijk te krijgen waardoor deze variatie optreedt en vast te stellen hoeveel sequenties minimaal nodig zijn om een volledig beeld te krijgen van de samenstelling van de bacteriële populaties. Verdere standaardisering van de methode is nodig om deze variaties zoveel mogelijk te voorkomen. Om een globale indruk te krijgen over de samenstelling van de bacteriologische gemeenschap in het water na verschillende zuiveringsstappen van pompstation Nuland zijn er figuren gemaakt waarin de dominante bacteriegroepen (met meer dan 1% van alle sequenties) zijn weergegeven op het niveau van phylum (Figuur 4a) en klasse (Figuur 4b).

FIGUUR 4. MICROBIAL PROFILES OP PHYLUM (A) EN KLASSE (B) NIVEAU





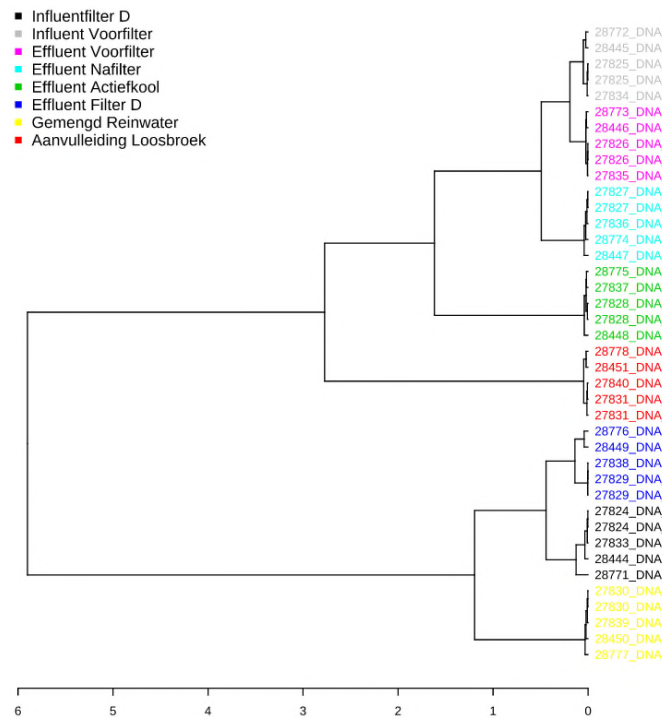
Alle groepen die minder dan 1% van de gehele populatie uitmaken zijn in één groep weergegeven (Other (<1%))

Bovenstaande figuren geven een eerste indicatie dat:

- De variatie in de bacteriesamenstelling op phylum- of klassenniveau in het water tussen de drie verschillende monsternamedata (met tussenpozen van 1 week) beperkt is.
- In het zuiveringstraject van het middeldiepe grondwater verandert de samenstelling van de bacteriepopulatie van het water na iedere zuiveringsstap, maar deze veranderingen zijn niet heel groot. Bij elke zuiveringsstap neemt het percentage sequenties behorende tot het phylum Omnitrphica (klasse: Omnitrphica_cl) toe en de proteobacteriën (klasse: betaproteobacteriën) af.
- In het diepe grondwater behoren vrijwel alle bacteriën (tot het phylum proteobacteriën (klasse: betaproteobacteriën).
- Het dubbellaags filter D heeft veel invloed op de bacteriële populatie: het aandeel proteobacteriën neemt af.

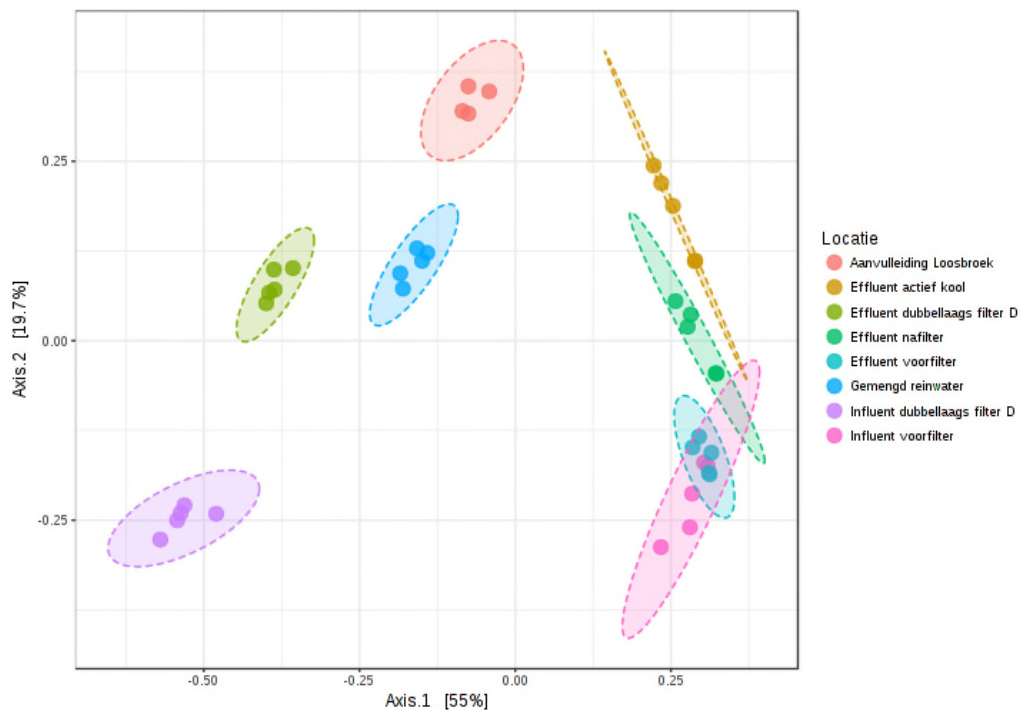
De vergelijking van de volledige bacteriële populaties op OTU-niveau in alle monsters afkomstig van acht monsterlocaties bij pompstation Nuland en verzameld op drie monsternamedata is weergegeven in Figuur 5 (verwantschapsboom van de populaties: dendrogram) en Figuur 6 (Principal component analysis: PCoA plot). Bij de verwantschapsboom wordt de mate van verwantschap tussen de bacteriële populaties in de watermonsters weergegeven in een stamboom waarbij de afstand die moet worden afgelegd via de takken van de boom de mate van verwantschap tussen monsters representeert. Bij de PCoA analyse wordt elke individuele populatie in de plot weergegeven als bolletje waarbij de afstand tussen de bolletjes de verwantschap tussen verschillende populaties weergeeft (grote afstand = veel verschil).

FIGUUR 5. VERWANTSCHAPSBOOM VAN BACTERIELE POPULATIES IN ALLE GEANALYSEERDE MONSTERS



FIGUUR 6. PCOA plot van bacteriele populaties in alle geanalyseerde monsters

[PERMANOVA] R-squared: 0.9325; p-value < 0.001



Met deze analyses wordt bevestigd dat:

- Er weinig verschil is in de samenstelling van de bacteriegemeenschap tussen de verschillende monsternamedata.

- De bacteriële populaties in het diepe-, middeldiepe grondwater en het water van aanvuileiding Loosbroek duidelijk verschillend zijn.
- In de middeldiepe zuivering heeft het voorfilter weinig invloed op de samenstelling van de bacteriepopulatie in het water, terwijl de invloed van het nafilter en actieve kool op de samenstelling van de bacteriepopulatie groter is.
- De samenstelling van de bacteriepopulatie in het diepe grondwater voor het dubbellaags filter D is duidelijk anders zijn dan de bacteriesamenstelling na het dubbellaags filter D.
 - o Het dubbellaags filter heeft dus relatief veel invloed op de samenstelling van de bacteriepopulatie.
- Via de aanvuileiding Loosbroek een bacteriepopulatie wordt aangevoerd die sterk verschillend is van de populaties in het gezuiverde diepe en middeldiepe grondwater.

3.2.2.3 Detailvergelijking van de bacteriologische populaties in pompstation Nuland

Bovenstaande analyses maken duidelijk dat er verschillen zijn tussen de bacteriële populaties in water afkomstig na verschillende zuiveringsstappen van pompstation Nuland maar geven nog geen goed inzicht in de microbiologische verschillen die er zijn en de mogelijke effecten die te verwachten zijn op de biochemische processen die bij de verschillende zuiveringsprocessen in de zuivering plaatsvinden. Om hier inzicht in te krijgen, is de dataset op OTU-niveau verder bestudeerd, in de aangehechte Excel worksheet (aan het einde van bijlage II) zijn de in de monsters aangetoonde OTU's en het percentage van de sequenties behorende tot elke OTU weergegeven en in bijlage II staan de meest dominante OTU's (OTU's die deel uit maken van meer dan 1% van de gehele populatie) per bemonsterde locatie weergegeven.

Bij de analyse op OTU-niveau vallen de volgende zaken op:

Water afkomstig van de middeldiepe grondwaterwinning

- In het ruwe middeldiepe grondwater (Influent voorfilter) zijn vooral OTU's van bacteriën behorende tot het geslacht *Gallionella* dominant (>42% van de populatie). *Gallionella* bacteriën zijn vaak zeer dominant in ijzer- en zuurstofhoudend grondwater. Er is bekend dat deze bacteriën in staat zijn om ijzer te oxideren en ze kunnen een belangrijke rol spelen bij de biologische ontijzering tijdens de drinkwaterzuivering (de Vet et al. 2011). Hoewel de concentratie ijzer niet is gemeten in het ruwe middeldiepe grondwater in dit onderzoek, heeft eerder onderzoek laten zien dat de ijzerconcentratie van het middeldiepe grondwater 8,0 mg Fe/l is. De dominante aanwezigheid van *Galionella* in het influent en effluent van het voorfilter, laten zien dat een deel van de ontijzering in het voorfilter van de middeldiepe zuivering biologisch verloopt.
- De dominantie van *Gallionella* bacteriën neemt af tijdens de volgende zuiveringsstappen en *Gallionella* komt vrijwel niet meer voor na actieve koolfiltratie. Deze afnemende dominantie van *Galionella* wordt veroorzaakt doordat de ontijzering over het algemeen plaatsvindt in het voorfilter van de zuivering.
- In het gezuiverde middeldiepe grondwater (effluent actieve kool) komen vooral veel onbekende bacteriën voor waarvan een groot deel behoort tot het phylum van *Omnitrophica* (voorheen phylum OP3 genoemd). Bacteriën behorende tot dit phylum worden vaak aangetroffen in drinkwater maar de eigenschappen van deze bacteriegroep zijn nog niet bekend.

Water afkomstig van de diepe grondwaterwinning

- In het ruwe diepe grondwater (influent dubbellaags filter D) zijn *Gallionella* bacteriën minder dominant aanwezig (2,8%) dan in het ruwe middeldiepe grondwater. Dit correspondeert met de relatief lage concentratie ijzer in dit water (0,5 mg/l).
- Een zeer groot deel van de bacteriën in het ruwe diepe grondwater behoort tot de familie van de *Commamonadaceae* (>78%). Leden van deze bacteriefamilie komen algemeen voor in waterige milieus waaronder grond- en drinkwater en bevatten over het algemeen bacteriesoorten die heterotroof groeien (oxideren afbreekbaar organisch koolstof met zuurstof).
- Bacteriën behorende tot het geslacht *Crenothrix* zijn ook vrij dominant (ca. 4% van de populatie). Van bacteriën behorende tot dit geslacht is bekend dat ze betrokken zijn bij de afbraak van methaan (Oswald et al. 2017, Stoecker et al. 2006). Mogelijk dat *Crenothrix* ook in deze zuivering betrokken is bij methaanafbraak, dat overeenkomt met de waargenomen afname van de methaanconcentratie na het dubbellaags filter D (Tabel 1). Overigens is ook aangetoond dat bacteriën die behoren tot het geslacht *Crenothrix* acetaat kunnen omzetten (Stoecker et al. 2006), waardoor het ook mogelijk is dat deze bacteriën korte organische moleculen afbreken in de zuivering.
- Daarnaast zijn bacteriën behorende tot het geslacht van *Nitrosomonas* dominant in het ruwe diepe grondwater. *Nitrosomonas* bacteriën zijn betrokken bij de afbraak van ammonium en specifieke detectie van het amoA gen van ammoniumoxideerders in het water na iedere zuiveringsstap van ps Nuland heeft laten zien dat bacteriën behorende tot de *Nitrosomonas* verantwoordelijk zijn voor omzetting van ammonium (van der Wielen et al. 2009).

Water afkomstig van aanvulleiding Loosbroek

- In het water afkomstig van aanvulleiding Loosbroek zijn vooral bacteriën van het geslacht *Nitrospira* dominant (ca. 6%). Een deel van de bacteriën die tot het geslacht *Nitrospira* behoren zijn in staat om nitriet tot nitraat te oxideren, terwijl een ander deel van de bacteriën behorende tot *Nitrospira* ammonium volledig kunnen oxideren naar nitraat (van Kessel et al. 2015). *Nitrospira* worden vaker aangetoond als dominante bacteriën in drinkwater zonder chloor (Martiny et al. 2005). Daarnaast is ook *Gallionella* dominant (ca. 4%) in dit water.

Het uitgaande reine water van pompstation Nuland is samengesteld uit gezuiverd diep grondwater (Effluent dubbellaagsfilter D; 42,5%), gezuiverd middeldiep grondwater (Effluent actief koolfilter; 48,3%) en water van aanvulleiding Loosbroek (9,2%). Hoewel er geen data beschikbaar is over de concentratie bacteriën in deze drie waterstromen zijn er basis van ATP metingen (Tabel 1) geen grote verschillen te verwachten in de bacterieconcentraties in deze waterstromen. Als er na het mengen van de verschillende waterstromen geen microbiologische processen optreden die aanleiding geven tot veranderingen van de microbiologische populatie in het gemengde reine water dan is te verwachten dat de samenstelling van het reine water wordt bepaald door de bacteriële populaties in- en de mengverhouding van de drie waterstromen. In Tabel 5 is een overzicht gegeven van de meest dominante bacteriegroepen in het reine water en de mate van dominantie van deze bacteriegroepen in de drie waterstromen.

TABEL 5. BACTERIEGROEPEN, WEERGEGEVEN ALS PERCENTAGE VAN DE TOTALE BACTERIEPOPULATIE, IN GEZUIVERD DIEP, GEZUIVERD-MIDDELDIEP EN WATER VAN AANVULLEIDING LOOSBROEK DIE DOMINANT ZIJN IN GEMENGD REINWATER

Orde/Familie/Geslacht	Effluent actief	Effluent Dubbellaags	Aanvulleiding	Gemengd Rein
-----------------------	-----------------	----------------------	---------------	--------------

	kool	filter D	Loosbroek	
Burkholderiales/Comamonadaceae/Comamonadaceae_unclassified	0,0449	28,8	0,155	14,9
Burkholderiales/Comamonadaceae/Polaromonas	0,0036	0,0043	0,0124	5,67
Burkholderiales/Comamonadaceae/Comamonadaceae_unclassified	0,0275	6,24	0,255	4,61
Burkholderiales/Oxalobacteraceae/Massilia	0,0065	4,07	0,0075	3,68
Nitrosomonadales/Gallionellaceae/Candidatus_Nitrotoga	0,0036	0,0003	0,0788	3,22
Nitrosomonadales/Nitrosomonadaceae/Nitrosomonas	0,0138	5,03	0,0373	2,38
Omnitrophica/Omnitrophica/Candidatus-Omnitrophica	9,39	0,0092	0,0124	2,00
Rhizobiales/MNG7/MNG7	0,371	0,408	0,710	1,76
TRA3-20/TRA3-20/TRA3-20	0,0369	0,0013	0,0017	1,74
Burkholderiales/Comamonadaceae/Comamonadaceae_unclassified	0,0072	6,35	0,153	1,70
Omnitrophica/Omnitrophica/Candidatus-Omnitrophica (OP3)	3,29	0,0010	0,0025	1,33
Alphaproteobacteria/Alphaproteobacteria/Alphaproteobacteria_unclassified	0,0036	2,39	0,438	1,04

De globale vergelijking tussen de bacteriële populaties in de drie waterstromen met de bacteriële populatie in het gemengde reine water laat zien dat dominantie van een deel van de bacteriegroepen in het reine water overeen komt met de dominantie die te verwachten is op basis van de mengverhouding van de drie waterstromen. Er zijn echter drie bacteriegeslachten die vrijwel niet (<0,08%) voorkomen in de drie afzonderlijke waterstromen maar wel dominant zijn in het gemengde reine water: *Polaromonas* (5,7%); *Candidatus_Nitrotoga* (3,2%) en TRA3-20 behorende tot de betaproteobacteriën (1,7%). Dit geeft aan dat deze bacteriegroepen zich vermeerderen in het water nadat het diepe- en middeldiep grondwater en het water van aanvulling Loosbroek zijn gemengd. Het is waarschijnlijk dat deze bacteriegroepen een bijdrage leveren aan de verhoging van de concentratie ATP in het gemengde reine water (Tabel 1). Deze resultaten zijn een indicatie dat door menging van de drie waterstromen de groeicondities voor bacteriën veranderen, waardoor bepaalde bacteriegroepen (waaronder dus *Polaromonas*, *Candidatus_Nitrotoga* en TRA3-20) kunnen gaan groeien.

Van *Polaromonas* bacteriën is bekend dat deze algemeen voorkomen in kraanwater (Kampfer et al. 2006), in staat zijn om te vermeerderen in oligotroof gebotteld mineraalwater (Lesaulnier et al. 2017) en de bacteriële populatie op koolfilters domineren (Magic-Knezev et al. 2009). *Candidatus_Nitrotoga* bacteriën zijn in staat om nitriet te oxideren en om bij lage temperatuur te vermeerderen (Alawi et al. 2007). *Candidatus_Nitrotoga* en TRA3-20 zijn (nog) niet kweekbaar en zijn momenteel nog "candidaat" genera waardoor veel biochemische eigenschappen van deze bacteriën nog onbekend zijn.

3.2.3 Microbial profiling: RNA

Bij het uitvoeren van Microbial profiling op RNA vindt sequentieanalyse plaats van een fragment met een lengte van ca. 300 bp. van het 16S ribosomaal RNA. De verwachting is dat het 16S rRNA vooral in actieve cellen wordt aangemaakt waardoor verhoogde concentraties rRNA zullen worden waargenomen in het actieve deel van de microbiële gemeenschap. Microbial profiling op DNA geeft inzicht in de mate van abundantie van verschillende bacteriële groepen in de populatie terwijl te verwachten is dat de mate van abundantie bij microbial profiling op RNA wordt beïnvloed door de zowel de abundantie als de activiteit van de bacteriegroep.

Voor het uitvoeren van microbial profiling op RNA is in dit onderzoek een protocol ontwikkeld voor het isoleren van RNA, het omzetten van RNA naar DNA (reverse transcriptie, RT) en vervolgens is de standaardmethode (zoals voor microbial profiling op DNA) gebruikt voor amplificatie (PCR) en sequencing van een fragment van het 16S RNA. Het ontwikkelde protocol is vervolgens toegepast op monsters afkomstig van pompstation Nuland na verschillende zuiveringsstappen en de resultaten zijn vergeleken met microbial profiling op DNA van dezelfde monsters.

3.2.3.1 Identificatie van de actieve bacteriële populaties in pompstation Nuland

Om inzicht te krijgen in de verschillen tussen de resultaten van microbial profiling op DNA en RNA is van het verschillende zuiveringstrajecten de dominantie van de tien meest dominante OTU's uit de DNA-profielen vergeleken met de dominantie van deze OTU's in het RNA profiel. De resultaten van deze analyses zijn samengevat in Tabel 6 (middeldiepe grondwater), Tabel 7 (diepe grondwater) en Tabel 8 (aanvulling Loosbroek en gemengde reine water). De vergelijking van de dominante bacteriën op basis van DNA met de dominante bacteriën op basis van RNA laat zien dat er verschillen zijn tussen de DNA- en RNA-profielen, die hieronder verder worden beschreven.

TABEL 6. VERGELIJKING DNA EN RNA PROFILES ZUIVERING MIDDELDIEPE GRONDWATER NULAND: 10 MEEST DOMINANTE OTU'S IN DE DNA PROFILES

		Influent voorfilter				Effluent voorfilter	
		DNA	RNA			DNA	RNA
Familie	Geslacht	%	%	Familie	Geslacht	%	%
Gallionellaceae	Gallionella	39.7	70.4	Gallionellaceae	Gallionella	25.8	55.4
Gallionellaceae	Gallionella	3.35	8.57	Gallionellaceae	Gallionella	4.54	6.84
Nitrospiraceae	uncultured	3.24	0.57	Omnitrophica_fa (OP3)	Omnitrophica_ge (OP3)	4.46	0.59
Omnitrophica_fa (OP3)	Omnitrophica_ge (OP3)	2.88	0.23	Nitrospiraceae	uncultured	3.55	0.97
Nitrospiraceae	uncultured	2.51	0.32	Nitrospiraceae	uncultured	2.29	0.47
Helicobacteraceae	Sulfuricurvum	2.10	0.57	Bacteriovoracaceae	Bacteriovorax	2.14	1.86
Nitrospiraceae	uncultured	1.85	0.25	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonas	1.78	2.49
Omnitrophica_fa (OP3)	Omnitrophica_ge (OP3)	1.43	0.10	Gallionellaceae	Candidatus_Nitrotoga	1.76	2.76
Bacteriovoracaceae	Bacteriovorax	1.41	0.95	Nitrospiraceae	uncultured	1.71	0.39
Nitrospiraceae	uncultured	1.38	0.48	Nitrospiraceae	uncultured	1.71	0.72
		Effluent nafiliter				Effluent actief kool	
		DNA	RNA			DNA	RNA
Familie	Geslacht	%	%	Familie	Geslacht	%	%
Gallionellaceae	Gallionella	11.5	34.7	Omnitrophica_fa (OP3)	Omnitrophica_ge (OP3)	9.39	3.73
Omnitrophica_fa (OP3)	Omnitrophica_ge (OP3)	6.66	0.65	Omnitrophica_fa (OP3)	Omnitrophica_ge (OP3)	3.95	1.18
Bacteriovoracaceae	Bacteriovorax	3.51	6.46	Omnitrophica_fa (OP3)	Omnitrophica_ge (OP3)	3.29	0.90
Bacteriovoracaceae	Bacteriovorax	2.68	3.59	Nitrospiraceae	uncultured	3.04	3.87
Omnitrophica_fa (OP3)	Omnitrophica_ge (OP3)	2.65	0.11	Omnitrophica_fa (OP3)	Omnitrophica_ge (OP3)	2.99	0.85
Nitrospiraceae	uncultured	2.59	1.97	Omnitrophica_fa (OP3)	Omnitrophica_ge (OP3)	2.23	0.87
Omnitrophica_fa (OP3)	Omnitrophica_ge (OP3)	2.37	0.27	Omnitrophica_fa (OP3)	Omnitrophica_ge (OP3)	1.91	0.62
Omnitrophica_fa (OP3)	Omnitrophica_ge (OP3)	2.08	0.09	Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	1.75	0.62
Nitrospiraceae	uncultured	1.72	0.56	Omnitrophica_fa (OP3)	Omnitrophica_ge (OP3)	1.69	0.57
Nitrospiraceae	uncultured	1.58	0.40	Syntrophaceae	Desulfobacca	1.68	1.40

Zoals in 3.2.2.3 al is beschreven zijn bacteriën van het geslacht *Gallionella* zeer dominant (ca. 43%) in het ruwe middeldiepe grondwater (influent voorfilter) en neemt de dominantie van *Gallionella* bij elke zuiveringsstap af tot minder dan 1% na actieve-koolfiltratie. De

dominantie van het 16S rRNA van *Gallionella* bacteriën is nog groter dan van het DNA (Tabel 6). Het overgrote deel (ca. 79%) van het RNA in het ruwe middeldiepe grondwater is afkomstig van *Gallionella* en ook na het voorfilter en na het nafilter is het 16S rRNA van *Gallionella* bacteriën het meest dominante RNA. Daarnaast is het 16S rRNA van *Gallionella* bacteriën in het water na deze zuiveringsstappen ook dominanter dan het DNA van *Gallionella*. Deze resultaten duiden op verhoogde activiteit van dit bacteriegeslacht, wat wordt veroorzaakt doordat de verhoogde concentraties ijzer biologisch worden geoxideerd. De dominantie van het 16S rRNA gen van bacteriën behorende tot het phylum van Omnitrophica (OP3) neemt toe in de zuivering van ca. 16% in het influent van het voorfilter tot ca. 44% in het effluent van het actieve-koolfilter. Het 16S rRNA van Omnitrophica (OP3) is echter veel minder dominant dan het DNA van dit bacteriephylum maar neemt ook toe van ca. 1% het influent van het voorfilter tot ca. 16% in het effluent van het actieve-koolfilter. Het percentage DNA van bacteriën behorend tot de Nitrospiraceae familie is in het ruwe water, na het voorfilter en na het nafilter hoger dan het percentage RNA van deze bacteriefamilie. Na actieve koolfiltratie is het percentage RNA van Nitrospiraceae vergelijkbaar met het percentage DNA. Dit geeft aan dat Nitrospiraceae actief zijn in de actieve-koolfilters en dat nitrificatie blijkbaar plaats vindt in deze filters.

TABEL 7 VERGELIJKING DNA EN RNA PROFILES ZUIVERING DIEPE GRONDWATER NULAND: 10 MEEST DOMINANTE OTU'S IN DE DNA PROFILES

Familie	Geslacht	Influent dubbellaags filter D		Familie	Geslacht	Effluent dubbellaags filter D	
		DNA %	RNA %			DNA %	RNA %
Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	37,70	34,19	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	28,82	30,89
Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	15,86	16,77	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	6,24	10,46
Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	12,48	8,54	Oxalobacteraceae	Massilia	4,07	6,48
Oxalobacteraceae	Massilia	11,48	9,88	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	6,35	6,33
Crenothrixaceae	Crenothrix	3,99	17,87	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonas	5,03	4,56
Nitrosomonadaceae	Nitrosomonas	3,87	0,82	Comamonadaceae	Ideonella	1,30	2,54
Gallionellaceae	Gallionella	2,79	2,32	Gallionellaceae	Candidatus_Nitrotoga	0,82	2,41
Rickettsiales_Incertae_Sedis	Candidatus_Odysella	1,57	0,77	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonas	0,03	1,84
Comamonadaceae	Ideonella	1,48	0,86	Methylophilaceae	Methylophilaceae_unclassified	0,57	1,80
Methylophilaceae	Methylothera	0,96	0,37	LWSR-14	LWSR-14_ge	1,28	1,73

Onbekende Comamonadaceae bacteriën zijn zeer dominant in zowel de DNA- als de RNA-profielen in het influent en effluent van het dubbellaags filter van de diepe zuivering (Tabel 7). Verschillen tussen DNA en RNA zijn te zien bij bacteriën van het geslacht *Crenothrix* in het influent van dubbellaags filter D: het 16S rRNA van dit geslacht is dominanter dan het DNA. Het 16S rRNA gen afkomstig van het geslacht *Nitrosomonas* is dominanter aanwezig dan het 16S rRNA in het influent van het dubbellaags filter, maar dit is omgekeerd in het effluent. Blijkbaar zijn nitrificerende bacteriën wel aanwezig in het influent, maar zijn ze voornamelijk actief in het dubbellaagse filter (waar ook de omzetting van ammonium plaatsvindt).

TABEL 8. VERGELIJKING DNA EN RNA PROFILES IN WATER VAN AANVULLEIDING LOOSBROEK EN IN HET GEMENGDE REINE WATER: 10 MEEST DOMINANTE OTU'S IN DE DNA PROFILES

Familie	Geslacht	Aanvulling Loosbroek		Familie	Geslacht	Gemengd Reinwater	
		DNA %	RNA %			DNA %	RNA %
Nitrospiraceae	Nitrospira	4,56	3,45	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	14,87	21,07
Methylococcaceae	uncultured(99)	4,45	9,85	Comamonadaceae	Polaromonas	5,67	8,67
Gallionellaceae	Gallionella	3,93	9,85	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	4,61	6,35
Methylococcaceae	Methyloglobulus	3,58	0,71	Oxalobacteraceae	Massilia	3,68	9,23
Subgroup_6_fa	Subgroup_6_ge	2,71	0,97	Gallionellaceae	Candidatus_Nitrotoga	2,22	2,72
Alphaproteobacteria_Incertae_Sedis	Alphaproteobacteria_Incertae_Sedis	1,93	0,20	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonas	3,38	3,66
Subgroup_6_unclassified	Subgroup_6_unclassified	1,90	1,20	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	2,00	0,65
SR1_(Absconditabacteria)_fa	SR1_(Absconditabacteria)_ge	1,78	0,32	MNG7	MNG7_ge	1,76	0,89
Subgroup_6_fa	Subgroup_6_ge	1,47	0,00	TRA3-20_fa	TRA3-20_ge	1,74	1,69
Subgroup_6_fa	Subgroup_6_ge	1,36	0,68	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	1,70	2,30
Methylococcales_unclassified	Methylococcales_unclassified	1,27	12,08	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	1,33	0,43

In het water van aanvulleiding Loosbroek zijn relatief veel verschillen tussen de DNA- en RNA-profielen van het 16S waargenomen (Tabel 8). Het percentage RNA-sequenties afkomstig van Methylococcaceae, *Gallionella* en Methylococcales is hoger dan het percentage DNA-sequenties van deze groepen. Van veel van de andere (veelal onbekende) bacteriegroepen is het percentage DNA-sequenties hoger dan het percentage RNA-sequenties in de populatie. In het gemengde reine water zijn de verschillen tussen de DNA- en RNA-profielen kleiner.

Bovenstaande analyses maken duidelijk dat er verschillen zichtbaar worden door microbial profiling uit te voeren op DNA of RNA. Het is te verwachten dat deze verschillen het gevolg zijn van verschillen in activiteit van de, in de profielen gedetecteerde, bacteriën. Dit betekent dat dominant aanwezige bacteriën vastgesteld met 16S rRNA genen (op basis van DNA) niet altijd de bacteriën hoeven te zijn die ook het meest actief zijn in het watermonster. Om betrouwbare conclusies te kunnen trekken over de actieve bacteriegroepen tijdens dit soort filtratieprocessen is het dus van belang om naast het DNA ook het RNA te meten.

3.2.4 Microbial profiling met MinION

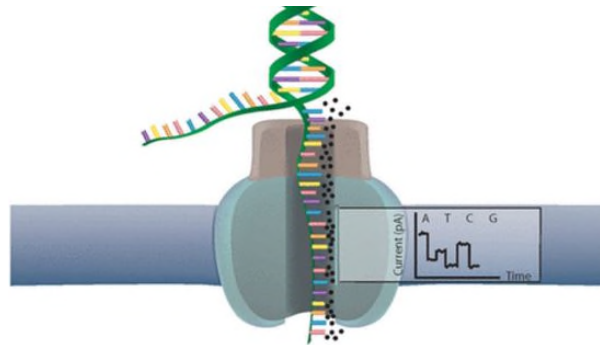
De MinION is een geminiaturiseerd systeem (Figuur 7) van de firma Oxford Nanopore waarmee het mogelijk is om op een redelijk eenvoudige manier sequentieanalyses uit te voeren.

FIGUUR 7. MINION VAN OXFORD NANOPORE



Dit systeem werkt fundamenteel anders dan de Illumina Miseq (Sequencing met Illumina Miseq is kort uitgelegd in: (Heijnen 2016)) en die bij bovenstaande experimenten (paragraaf 3.2.2 en 3.2.3) is gebruikt. Bij de MinION wordt voor het bepalen van de DNA-sequentie van individuele moleculen gebruik gemaakt van biologische membranen met hierin poriën (nanopores). Tijdens het analyseproces wordt een elektrische spanning gebruikt om individuele DNA moleculen door een nanopore te leiden (Figuur 8). Doordat elke bouwsteen van het DNA molecuul (4 nucleotiden: A, C, G, T) een eigen samenstelling en omvang heeft, zorgt het passeren van elk nucleotide voor een verandering van de weerstand over de nanopore en daardoor voor een verandering van de stroomsterkte door de nanopore (<https://nanoporetech.com/applications/dna-nanopore-sequencing>).

FIGUUR 8. SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN EEN NANOPORE



De MinION heeft als groot voordeel dat het klein en redelijk eenvoudig te gebruiken is, waardoor het zelfs onder moeilijke omstandigheden (bijvoorbeeld landelijke gebieden in de tropen) in het veld gebruikt kan worden (Quick et al. 2016). Daarnaast is de sequentieanalyse niet beperkt tot korte DNA-fragmenten (ca. 200-500 bp met Illumina) maar is het met MinION mogelijk om de sequentie te bepalen van lange DNA-fragmenten. Het sequencen van lange fragmenten heeft bij toepassing van microbial profiling door sequentieanalyse van het 16S rRNA gen het grote voordeel dat het mogelijk wordt om de sequentie te bepalen van het gehele 16S rRNA gen ("full length": ca. 1500 bp) en niet van een fragment van ca. 290 bp zoals dat bij Illumina sequencing wordt gedaan. Het sequencen van "full length" 16S rRNA genen maakt het in principe mogelijk om beter onderscheid te maken tussen de sequenties van verschillende bacteriën, waardoor identificatie tot op het niveau van "soort" (Figuur 1: "species") voor veel sequenties mogelijk is. Ter vergelijking, het onderscheidend vermogen bij het sequencen van korte fragmenten met de Illumina MiSeq blijft beperkt tot het niveau van familie of geslacht. Een onderscheidend vermogen tot op soortniveau heeft als belangrijk voordeel dat met de microbial profiles meer informatie wordt gegenereerd over de in een bacteriepopulatie aanwezige bacteriegroepen. Dit kan betekenen dat betere conclusies getrokken kunnen worden over de biochemische eigenschappen van de aangetoonde bacteriën of de aanwezigheid van pathogenen. Als voorbeeld kan hierbij genoemd worden dat het aantonen van het geslacht *Legionella* weinig informatie geeft over de mate van pathogeniteit, doordat een groot deel van de *Legionella*-soorten niet ziekteverwekkend zijn. Het aantonen van de soort *Legionella pneumophila* geeft echter wel een belangrijke aanwijzing voor de aanwezigheid van pathogene bacteriën.

Een nadeel van het gebruik van MinION voor microbial profiling is het relatief kleine aantal sequenties dat per analyse kan worden bepaald en het relatief grote aantal fouten in de door de MinION bepaalde sequenties. Het aantal fouten per 100 bp sequentie ("error rate") is beduidend hoger dan bij het gebruik van veel andere DNA sequencers zoals de Illumina MiSeq. Bij de Illumina MiSeq wordt de sequentie van elk fragment twee keer bepaald waardoor de error rate erg laag wordt en is het mogelijk om een deel van de fouten via software op te lossen. Hierdoor is de uiteindelijke error rate onder optimale omstandigheden minder dan 0,01% (https://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP). Bij de MinION is, vanwege verbetering van de software en de kwaliteit van de nanopores in de membranen, de error rate sterk verminderd van 26,7% in 2015 (generatie 7.3 technologie) naar 14,5% in 2017 (generatie 9.0 technologie) (Jain et al. 2017).

3.2.4.1 Sequentieanalyse met MinION bij KWR

Om sequentieanalyse met de MinION mogelijk te maken is een MinION sequencer door KWR aangeschaft en zijn aanpassingen gedaan aan de computerhardware en de beveiligingsinstellingen, waardoor het mogelijk wordt om met hoge snelheid grote hoeveelheden data van de MinION op de computer op te slaan. Voor het optimaliseren van de instellingen en het operationeel krijgen van de MinION software was veel tijd en assistentie nodig van de leverancier en systeembeheerder Simac zodat een werkbare situatie is gecreëerd. Het was door deze onvoorziene omstandigheden niet mogelijk om binnen het project verschillende experimenten uit te voeren, maar uiteindelijk is het gelukt om in één run DNA sequenties te analyseren waarbij het aantal geanalyseerde DNA-sequenties werd beperkt door een technisch probleem met het systeem (lekkage). Hierdoor is alleen een analyse uitgevoerd op een bacteriële testsuspensie (paragraaf 3.2.4.2) en was het dus niet mogelijk om binnen dit project analyses uit te voeren op de monsters afkomstig van de "case studie" van drinkwaterzuivering Nuland. Inmiddels is duidelijk welke maatregelen in toekomstige experimenten genomen moeten worden om lekkage te voorkomen, waardoor de verwachting is dat in vervolgonderzoek uitgebreidere analyses zonder problemen mogelijk zullen zijn.

3.2.4.2 Bacterial profiling met MinION van een testsuspensie

Om te onderzoeken welke mogelijkheden er momenteel zijn voor het uitvoeren van microbial profiling op, middels PCR vermeerderde amplicons van "full length" 16S rRNA genen (ca. 1600 bp) met het MinION systeem, zijn analyses uitgevoerd op een bacteriesuspensies met bekende samenstelling (zogenaamde mock communities). Deze suspensies zijn verkregen door mengsels te maken van goed gekarakteriseerde bacteriestammen. De resultaten van deze MinION sequentieanalyses zijn vervolgens vergeleken met microbial profiles welke zijn gegenereerd met de "standaardmethode voor sequenzen", dat wil zeggen het sequenzen van amplicons van ca. 300 bp van het 16S rRNA gen met de Illumina MiSeq. De bacteriesuspensie is samengesteld door cellen van 16 bacteriestammen te mengen en hier vervolgens de twee verschillende sequentieanalyses op uit te voeren. Het uiteindelijke doel van het samenstellen van deze bacteriemengsels is de ontwikkeling van een goed gekarakteriseerd mengsel van bacteriestammen (de mock community) die routinematig toegepast zal gaan worden als kwaliteitscontrole voor microbial profiling experimenten. Analyses op een dergelijke mock community maken het mogelijk om inzicht te krijgen in de kwaliteit van alle uitgevoerd stappen van de analyse (van DNA isolatie tot interpretatie met software). Voor het maken van de gemengde celsuspensies zijn eerst suspensies gemaakt van de individuele stammen en is de concentratie in deze suspensies bepaald m.b.v. flowcytometrie. Vervolgens zijn twee verschillende mengsels samengesteld (genaamd mock 1 en mock 2) met hierin de cellen van de 16 stammen die in verschillende verhoudingen zijn gemengd. In **Tabel 9** is de samenstelling van mock 1 en mock 2 op basis van flow cytometrische tellingen weergegeven.

TABEL 9: STAMMENSAMENSTELLING VAN MOCK COMMUNITIES

Samenstelling stammenmengsel	% van de cellen	
	Mock 1	Mock 2
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6,25	0,23
<i>Aeromonas veronii</i>	6,25	22,5
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6,25	2,25
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6,25	2,25
<i>Burkholderia multivorans</i>	6,25	22,5
<i>Herminiimonas glaciei</i>	6,25	22,5
<i>Escherichia coli</i>	6,25	0,23
<i>Legionella pneumophila</i>	6,25	22,5
<i>Clostridium</i> sp	6,25	2,25
<i>Enterococcus faecium</i>	6,25	0,02
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	6,25	0,23
<i>Citrobacter freundii</i>	6,25	0,23
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6,25	0,02
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,25	2,25
<i>Rahnella aquatilis</i>	6,25	0,02
<i>Staphylococcus warneri</i>	6,25	0,23

Van deze mock communities zijn microbial profiles verkregen na sequencing van de amplicons met de standaardmethode die gebruikt maakt van de Illumina MiSeq. Een samenvatting van de resultaten van deze analyses is weergegeven in Tabel 10.

TABEL 10: MICROBIAL PROFILES VAN MOCK COMMUNITIES MET ILLUMINA MISEQ

Samenstelling stammenmengsel	Identificatie NGS (Illumina)					Aantal seq's: 96412		97178	
	Phylum	Class	Orde	Familie	Geslacht	% van de cellen		% van de sequenties	
						Mock 1	Mock 2	Mock 1	Mock 2
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	6,25	0,23	22,65	15,16
<i>Aeromonas veronii</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	6,25	22,50	22,65	15,16
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	6,25	2,25	9,63	13,33
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	6,25	2,25	7,00	12,04
<i>Burkholderia multivorans</i>	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	6,25	22,50	1,07	17,38
<i>Herminiimonas glaciei</i>	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	<i>Herminiimonas</i>	6,25	22,50	0,73	11,95
<i>Escherichia coli</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i> , <i>Shigella</i>	6,25	0,23	4,89	1,36
<i>Legionella pneumophila</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Legionellaceae	<i>Legionella</i>	6,25	22,50	0,28	5,22
<i>Clostridium</i> sp	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	<i>Clostridium</i> , <i>Xl</i>	6,25	2,25	1,01	1,43
<i>Enterococcus faecium</i>	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	6,25	0,02	3,81	0,04
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	6,25	0,23	8,51	1,39
<i>Citrobacter freundii</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacteriaceae_unclassified</i>	6,25	0,23	27,55	19,58
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Yersinia</i>	6,25	0,02	5,09	0,10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacteriaceae_unclassified</i>	6,25	2,25	3,68	0,12
<i>Rahnella aquatilis</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacteriaceae_unclassified</i>	6,25	0,02	3,68	0,12
<i>Staphylococcus warneri</i>	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	6,25	0,23	3,46	0,06

Het resultaat van deze analyses laat zien dat het DNA van vrijwel alle bacteriestammen uit de mock communities wordt gedetecteerd in de microbial profiles en geïdentificeerd tot op het niveau van geslacht. Voor vrijwel alle sequenties (99,2 en 99,4% voor respectievelijk Mock 1 en Mock 2) is de identificatie volgens verwachting. Alleen bij het identificeren van vier stammen welke behoren tot de familie van de *Enterobacteriaceae* (grijs geaccentueerd in Tabel 10) en bij de stam die in de collectie de naam *Staphylococcus warneri*, traden moeilijkheden op bij het identificeren tot geslachteniveau. De vermeende *S. warneri* werd bijvoorbeeld geïdentificeerd als *Micrococcus*. Het is bekend dat de taxonomie en naamgeving van een deel van de bacteriesoorten die tot de Enterobacteriaceae behoren niet geheel eenduidig is, waardoor problemen te verwachten zijn met de identificatie van leden van deze bacteriefamilie. Daarnaast heeft eerder onderzoek laten zien dat leden van het geslacht *Staphylococcus* en *Micrococcus* moeilijk te onderscheiden zijn (Kookken et al. 2012). Verdere identificatie door sequentieanalyse van het volledige 16S rRNA gen (met behulp van kloneren en Sanger sequencing) van de individuele bacteriestammen die aan de mock

communities zijn toegevoegd, geeft waarschijnlijk meer zekerheid over de precieze soortensamenstelling van de mock communities.

Het percentage van de sequenties behorende bij de verschillende geslachten komt niet in alle gevallen overeen met het percentage cellen dat van de verschillende bacteriestammen dat aan de mock communities is toegevoegd (Tabel 10). Deze verschillen kunnen het gevolg zijn van variaties die kunnen optreden door:

- Onnauwkeurigheden bij de flowcytometrische tellingen waarbij “klontjes” van meerdere cellen worden geteld als één cel;
- De introductie van bias door variërende kopie-aantallen van het 16S rRNA gen bij verschillende bacteriegroepen;
- Experimentele variaties bij de NGS analyses door variërende efficiëntie van de DNA isolaties of variatie in de efficiëntie van de PCR-reacties.

In een vervolgstudie dat zal plaatsvinden in het thematisch BTO van 2018 t/m 2019, zal meer onderzoek gedaan worden naar de oorzaak van deze mogelijke verschillen en zullen geoptimaliseerde mock communities worden ontwikkeld om daarmee de kwaliteit van analyses te kunnen monitoren.

Op het DNA van de mock communities zijn ook NGS analyses uitgevoerd met de MinION. Bij het uitvoeren van microbial profiling met de MinION wordt door Oxford Nanopore een complete analyse “pipeline” (software en database) aangeboden waarmee de sequenties worden geanalyseerd en geïdentificeerd. Het is mogelijk maar niet eenvoudig om van deze optie af te wijken en dezelfde “pipeline” te gebruiken als voor de analyse van de MiSeq sequenties (MOTHUR, (Schloss et al. 2009)). Doordat een dergelijke analyse veel tijd en budget zal kosten, is voor dit onderzoek gekozen om de analyse uit te voeren met de standaard software van Oxford Nanopore, waarbij identificatie plaatsvindt met 80% zekerheid. In Figuur 9 is een voorbeeld van de output van de software na analyse van het mock 1 monster weergegeven op familieniveau. In Tabel 11 is het totaal aantal sequenties en het aantal sequenties dat door de software kon worden geclassificeerd weergegeven.

TABEL 11. AANTAL SEQUENTIES AFKOMSTIG VAN DE MOCK MONSTERS WAARVAN DE SEQUENTIE IS BEPAALD EN IDENTIFICATIE MOGELIJK WAS

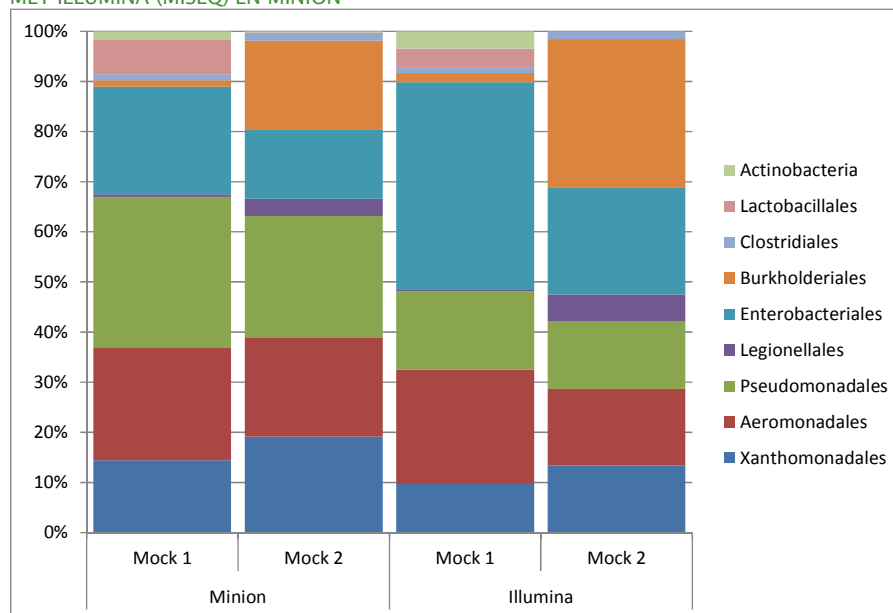
	Mock 1	Mock 2
Totaal aantal sequenties	3335	3049
Totaal aantal geïdentificeerde sequenties	1667	1719
% geïdentificeerde sequenties	50	56

FIGUUR 9. SAMENSTELLING VAN DE MICROBIOLOGIE IN HET MOCK 1 MONSTER OP FAMILIENIVEAU



Vervolgens zijn de analyses die werden uitgevoerd op de MinION vergeleken met de analyses die werden uitgevoerd op de Illumina MiSeq. In Figuur 10 is het resultaat van deze vergelijking weergegeven op het taxonomisch niveau van “orde”.

FIGUUR 10. SAMENSTELLING MOCK COMMUNITIES OP “ORDE” NIVEAU OP BASIS VAN SEQUENTIES BEPAALD MET ILLUMINA (MISEQ) EN MINION



Deze vergelijking laat zien dat de microbial profiles van mock communities, zoals die bepaald zijn door een sequentieanalyse met MinION of Illumina Miseq, op het niveau van “orde” redelijk goed op elkaar lijken. Alle bacteriële ordes worden met beide sequencemethoden aangetoond en de waargenomen verschillen zijn dus vooral het gevolg van verschillen in dominantie. Zo is bijvoorbeeld het aandeel sequenties van de Enterobacteriales met Illumina sequencing hoger dan met MinION sequencing, terwijl met MinION sequencing het aandeel sequenties van Pseudomonadales hoger is dan met Illumina sequencing. Het is waarschijnlijk dat deze verschillen vooral het gevolg zijn van de sequencing van een ander deel van het 16S rRNA gen (vrijwel het volledige 16S rRNA gen (ca. 1600 bp) met MinION sequencing en alleen een deel van het V4 regio van het 16S rRNA gen (300 bp) met Illumina sequencing), maar deze verschillen kunnen ook zijn veroorzaakt door de toepassing van een andere technologie voor het bepalen van de sequenties en het gebruik van andere software voor het identificeren van de sequenties. De mogelijkheid om langere fragmenten te sequencen met MinION maakt het in principe mogelijk om de sequenties in ieder geval tot op het niveau van geslacht (genus), maar meestal ook tot op

niveau van soort (species) te identificeren. Om een eerste indruk te krijgen over de mogelijkheden van MinION om de sequenties op een groter detailniveau te identificeren dan Illumina sequencing, zijn de geïdentificeerde sequenties in meer detail onderzocht en vergeleken met de geïdentificeerde sequenties met Illumina sequencing. De resultaten van deze vergelijking zijn samengevat in Tabel 12.

TABEL 12. VERGELIJKING SEQUENCING MOCK COMMUNITIES MET ILLUMINA EN MINION SEQUENCING

Samenstelling mock communities		% cellen		Illumina sequencing	% sequenties		MinION sequencing		% sequenties	
Orde	Soort in mock community	Mock 1	Mock 2	Geslacht	Mock 1	Mock 2	Geslacht	Soort	Mock 1	Mock 2
Aeromonadales	Aeromonas salmonicida	6,25	0,23	Aeromonas	22,65	15,16	Aeromonas	salmonicida	13,64	4,16
							Aeromonas	hydrophila	0,00	0,45
Aeromonadales	Aeromonas veronii	6,25	22,5				Aeromonas	veronii	1,46	8,60
							Aeromonas	caviae	0,00	0,18
							Aeromonas	eucrophila	0,00	0,18
							Aeromonas	jandaei	0,00	0,72
							Aeromonas	sobria	1,69	0,45
							Aeromonas	diversa	0,00	0,27
							Aeromonas	lacus	0,00	0,18
							Aeromonas	bivalvium	0,00	0,45
							Aeromonas	media	0,00	1,09
							Aeromonas	tecta	0,00	0,63
							Aeromonas	schubertii	0,00	0,18
							Aeromonas	cavernicola	0,00	0,18
							Aeromonas	molluscorum	0,46	0,00
							Aeromonas	piscium	7,78	1,81
Burkholderiales	Burkholderia multivorans	6,25	22,5	Burkholderiales	1,07	17,38	Burkholderia	multivorans	0,69	10,23
							Burkholderia	pseudomultivorans	0,00	1,09
							Burkholderia	cepacia	0,00	0,81
							Burkholderia	ambifaria	0,00	0,27
							Burkholderia	dolosa	0,00	0,18
							Burkholderia	lata	0,00	0,45
							Burkholderia	stabilis	0,00	1,09
							Burkholderia	cenocepacia	0,00	0,18
							Burkholderia	gladioli	0,00	0,18
							Burkholderia	vietnamiensis	0,00	0,54
Burkholderiales	Herminiimonas glaciei	6,25	22,5	Herminiimonas	0,73	11,95	Herminiimonas	saxobsidens	0,00	1,99
Enterobacteriaceae	Citrobacter freundii	6,25	0,23	Enterobacteriaceae	27,55	19,58	Citrobacter	freundii	13,33	0,72
				Enterobacteriaceae	3,69	0,12	Citrobacter	murlinae	2,77	0,72
							Citrobacter	youngae	0,62	0,00
							Citrobacter	braakii	4,47	0,81
							Citrobacter	werkmanii	0,62	0,00
Enterobacteriaceae	Enterobacter aerogenes	6,25	0,02				Enterobacter	aerogenes	1,00	0,00
Enterobacteriaceae	Escherichia coli	6,25	0,23	Escherichia	4,89	1,36			0,00	0,00
				Yersinia	5,09	0,1	Shigella	sonnei	0,69	0,00
							Yersinia	pestis	0,39	0,00
							Yersinia	ruckeri	0,46	0,00
									0,00	0,00
Enterobacteriaceae	Rahnella aquatilis	6,25	0,02				Klebsiella	pneumoniae	2,70	8,05
Enterobacteriaceae	Klebsiella pneumoniae	6,25	2,25				Klebsiella	varicola	1,39	2,08
Pseudomonadales	Acinetobacter radioresistens	6,25	0,23	Acinetobacter	8,51	1,39	Acinetobacter	radioresistens	15,87	2,17
Legionellales	Legionella pneumophila	6,25	22,5	Legionella	0,28	5,22	Legionella	pneumophila	0,46	1,81
Pseudomonadaceae	Pseudomonas fluorescens	6,25	2,25	Pseudomonas	7,00	12,04	Pseudomonas	fluorescens	0,54	0,90
							Pseudomonas	marginalis	2,16	4,62
							Pseudomonas	proteolitica	1,85	3,62
							Pseudomonas	trivialis	0,00	1,36
							Pseudomonas	graminis	0,00	2,08
							Pseudomonas	veronii	0,54	0,00
							Pseudomonas	asplenii	0,00	0,18
							Pseudomonas	extremaustralis	0,00	0,36
							Pseudomonas	rhodesiae	0,00	0,27
							Pseudomonas	azotoformans	0,00	0,18
							Pseudomonas	migulae	1,16	2,17
							Pseudomonas	gessardii	0,92	1,99
							Pseudomonas	poae	1,77	1,45
							Pseudomonas	libanensis	0,92	2,35
							Pseudomonas	brenneri	2,62	4,98
							Pseudomonas	brassicacearum	0,85	1,00
							Pseudomonas	panacis	1,39	3,08
Xanthomonadales	Stenotrophomonas maltophilia	6,25	2,25	Stenotrophomonas	9,63	13,33	Stenotrophomonas	maltophilia	1,69	2,26
							Stenotrophomonas	rhizophila	0,00	0,27
							Stenotrophomonas	pavanii	0,00	0,72
							Stenotrophomonas	humii	0,00	0,27
							Xanthomonas	arboricola	0,69	2,17
							Xanthomonas	pisi	1,54	3,44
							Xanthomonas	sacchari	1,16	2,26
							Xanthomonas	vasicola	0,69	1,09
							Xanthomonas	vesicatoria	0,00	0,36
							Xanthomonas	codiae	0,00	0,36
							Xanthomonas	cucurbitae	0,00	0,45
Micrococcales	Staphylococcus warneri	6,25	0,23	Micrococcus	3,46	0,06	Micrococcus	luteus	1,54	0,00
							Micrococcus	yunannensis	0,39	0,00
							Agrococcus	jenensis	0,00	0,18
Clostridiales	Clostridium sp.	6,25	2,25	Clostridium	1,01	1,43	Paraclostridium	bifementans	1,62	2,08
Lactobacillales	Enterococcus faecium	6,25	0,02	Enterococcus	3,81	0,04	Enterococcus	faecium	3,85	0,00
							Enterococcus	hirae	0,77	0,00
							Enterococcus	pseudoavium	0,39	0,00
							Enterococcus	durans	0,46	0,00
							Herbaspirillum	rubrisubalbicans	0,00	0,18
							Herbaspirillum	autotrophicum	0,00	0,36

De resultaten van Tabel 12 laten zien dat de meeste bacteriesoorten uit de mock community inderdaad tot op soortniveau kunnen worden geïdentificeerd bij sequentieanalyse van “full length” sequenties van het 16S rRNA gen met de MinION. In de meeste gevallen komt de identificatie overeen met de verwachting op basis van de samenstelling van de mock community. Er zijn echter een paar uitzonderingen. Zo is het vreemd dat sequenties van *Escherichia coli* niet, maar sequenties van andere bacteriesoorten van de *Enterobacteriaceae*, zoals *Shigella sonnei*, *Yersinia pestis* en *Yersinia ruckeri*, wel worden gedetecteerd in de mock communities, terwijl deze laatste drie bacteriesoorten niet zijn toegevoegd aan de mock community. Daarnaast wordt met MinION sequencing voor de meeste bacteriesoorten uit de mock community, naast de verwachte bacteriesoort, ook andere soorten van hetzelfde geslacht geïdentificeerd, maar die niet aan de mock community zijn toegevoegd. Bij de identificatie van bijvoorbeeld *Burkholderia multivorans* uit de mock community worden sequenties van *Burkholderia multivorans* als meest dominante sequenties gedetecteerd. daarnaast worden echter ook sequenties van negen andere soorten van het geslacht *Burkholderia* in de mock community aangetoond (Tabel 12). Bij de identificatie van sequenties van bacteriesoorten die tot andere geslachten behoren (zoals *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Stenotrophomonas* en *Enterococcus*) worden ook diverse additionele soorten geïdentificeerd, naast de toegevoegde soort. Het is tot slot ook opvallend dat bij de identificatie van *Legionella pneumophila* uit de mock community wel alleen sequenties van *Legionella pneumophila* worden aangetroffen. Deze resultaten geven aan dat de identificatie van de additionele soorten die niet zijn toegevoegd, maar wel zeer verwant zijn aan één van de toegevoegde soorten, waarschijnlijk het gevolg is van het relatief grote aantal fouten (“error rate”) in de afgelezen DNA-sequenties bij de sequentieanalyse met behulp van de MinION. Deze sequentiefouten zorgen bij een aantal bacteriegeslachten voor de identificatie van additionele bacteriesoorten doordat deze soorten maar weinig sequentieverschillen bevatten ten opzichte van de bacteriesoort die aan de mock community is toegevoegd. Hierdoor kan een beperkt aantal leesfouten tijdens de sequentieanalyse met de MinION zorgen voor een verkeerde naamgeving op soortniveau. Bij *L. pneumophila* werd dit niet waargenomen omdat bacteriesoorten die tot het geslacht *Legionella* behoren relatief veel sequentieverschillen op het 16S rRNA gen hebben. Deze resultaten laten dus tevens zien dat verdere optimalisatie van de MinION nodig is, voordat de MinION betrouwbaar kan worden toegepast om de bacteriesoortsamenstelling te bepalen van een watermonster op basis van 16S rRNA genen.

4 Conclusies en aanbevelingen

In dit verkennend onderzoek zijn de toepassingsmogelijkheden van een aantal nieuwe “Next generation sequencing” (NGS) technologieën verkend:

- Metatranscriptomics om inzicht te krijgen in de actieve microbiologische processen.
- Microbial profiling van RNA om inzicht te krijgen in de samenstelling van het actieve deel van de bacteriële populatie.
- Microbial profiling met de MinION geminiaturiseerde DNA-sequencer om inzicht te krijgen in de toepasbaarheid van deze nieuwe technologie waarmee relatief eenvoudig sequentieanalyses kunnen worden uitgevoerd.

Bij deze verkenning is in eerste instantie onderzocht welke stappen moeten worden gezet om deze nieuwe technologieën te kunnen uitvoeren en aansluitend zijn de technologieën uitgevoerd in een “case studie” bij de drinkwaterzuivering van productielocatie Nuland.

4.1 Metatranscriptomics

Met metatranscriptomics is het mogelijk om inzicht te krijgen in de actieve biochemische processen die plaats vinden in water. Bij metatranscriptomics worden sequenties van het messenger RNA (mRNA) van de microbiologische gemeenschap bepaald (“transcriptoom”). De aanwezigheid en concentratie van mRNA moleculen geeft een indruk van de mate waarin bepaalde eiwitten worden gevormd en geeft daarmee inzicht in de mate waarin bepaalde processen plaatsvinden.

Om te onderzoeken welke stappen moeten worden gezet om metatranscriptomics analyses uit te kunnen voeren op drinkwatermonsters is een literatuuronderzoek uitgevoerd. De belangrijkste bevindingen van dit literatuuronderzoek zijn:

- Het is noodzakelijk om een grote hoeveelheid RNA te isoleren, doordat slechts een zeer klein deel van al het RNA bestaat uit mRNA. Hierdoor is het ook noodzakelijk om een specifieke zuivering uit te voeren waarmee mRNA van het overige RNA (voornamelijk 16S rRNA) wordt gezuiverd;
- Door de grote hoeveelheid benodigd RNA is het noodzakelijk om de micro-organismen uit een groot volume water te concentreren voor de analyse van drinkwatergerelateerde monsters;
- Het transcriptoom is niet stabiel en kan snel veranderen door externe invloeden (bijvoorbeeld verandering van pH, temperatuur, nutriënten). Hierdoor is het noodzakelijk om het transcriptoom snel na monsternamen te stabiliseren/fixeren;
- Vanwege de te verwachten complexiteit van het metatranscriptoom is het noodzakelijk om veel sequentiedata te genereren om daarmee een goed beeld te krijgen van de samenstelling van het transcriptoom. Dit maakt de kosten voor het bepalen van het transcriptoom hoog.

Op basis van bovenstaande bevindingen is besloten om binnen de in dit rapport beschreven studie geen metatranscriptomics analyses uit te voeren. Om metatranscriptomics analyses betrouwbaar uit te kunnen voeren is de beschikbaarheid van een methode waarmee snel en efficiënt een groot volume water kan worden geconcentreerd noodzakelijk. Voor vervolgonderzoek wordt geadviseerd om stappen te zetten met de ontwikkeling van efficiënte concentratiemethoden. Mogelijk dat de toepassing van hemoflow filters als “dead-end” filters hierbij een optie zijn, maar dat moet verder worden onderzocht.

4.2 Microbial profiling op DNA en RNA

Microbial profiling is uitgevoerd op het geïsoleerde DNA en RNA. Het aantal sequenties wat voor elk monster werd bepaald was zeer variabel (van 5.297 tot 71.155 sequenties), dat betrouwbare interpretatie deels in de weg staat. Er wordt daarom aanbevolen om de methode in vervolgonderzoek verder te standaardiseren waardoor minder variatie optreedt.

4.2.1 Case studie drinkwaterzuivering Nuland

De uitgevoerde case studie maakt duidelijk dat microbial profiling gebruikt kan worden om verschillen in de microbiologie van de drie verschillende waterstromen (middeldiep/diep-grondwater en water van aanvulleiding Loosbroek) zichtbaar te maken. Daarnaast maken de analyses duidelijk welke microbiële veranderingen er optreden na de verschillende zuiveringsstappen. Tevens wordt inzicht verkregen wordt over de microbiële processen die plaatsvinden in de filters, zo is duidelijk geworden dat *Gallionella* waarschijnlijk een belangrijke rol spelen bij de ijzeroxidatie tijdens de zuivering. Doordat van een groot deel van de aangetoonde bacteriën weinig bekend is over de biochemische processen waar deze bacteriën bij betrokken zijn, is het inzicht over de microbiële processen niet compleet.

De resultaten laten zien dat de concentratie ATP enigszins toeneemt na het mengen van drie waterstromen. Deze toename van actieve biomassa na menging suggereert dat groei optreedt na menging van de watertypen in de reinwaterkelder. De microbial profiles laten zien dat de bacteriesamenstelling na menging niet hetzelfde is als op basis van de mengverhouding kan worden verwacht. Vooral bacteriën behorende tot de geslachten *Polaromonas*, *Candidatus_Nitrotoga* en TRA3-20 nemen toe na menging van de waterstromen. Uit de resultaten van de ATP- en sequentieanalyses kan dus worden geconcludeerd dat menging van deze watertypen leidt tot extra groei in het gemengde reinwater en mogelijk verklaart dat de relatief hoge nagroei in het distributiesysteem van productielocatie Nuland. Het onderzoek maakt echter niet duidelijk waarom de drie eerder genoemde bacteriegroepen zich vermeerderen in het gemengde reinwater. Om meer inzicht te krijgen in de oorzaak van deze vermeerdering kan mogelijk het uitvoeren van metagenomics of metatranscriptomics analyses meer inzicht geven, omdat met die analyses duidelijk wordt welke metabole processen worden uitgevoerd door de drie waargenomen bacteriegroepen.

4.3 Sequentieanalyse met MinION

Met het MinION systeem is het mogelijk om snel en eenvoudig DNA-sequenties te bepalen. Waar veel NGS systemen gebruikt kunnen worden voor het bepalen van de sequenties van korte DNA moleculen (Illumina MiSeq: max. 350 bp) is het met MinION mogelijk om ook de sequenties te bepalen van lange DNA-strengen (momenteel is 1.000.000 bp het "record"). Dit maakt het mogelijk om, bij toepassing voor "microbial profiling", de sequentie te bepalen op volledige ("full length") sequenties van het 16S rRNA gen waardoor identificatie van de aanwezige bacteriën in de populatie mogelijk wordt tot op soortniveau. Door identificatie op soortniveau kan met meer zekerheid informatie worden verkregen over de eigenschappen van de aangetoonde bacteriën.

De toepassing van MinION sequencing is uitgevoerd met sequencing op volledige 16S rRNA genen van een samengesteld mengsel van bekende bacteriën (mock community). De resultaten laten zien dat het met MinION inderdaad mogelijk is om sequentieanalyse uit te voeren op bijna de volledige lengte van het 16S rRNA gen (ca 1600 bp) en dat identificatie op soortniveau mogelijk is. Vanwege de hogere error rate met MinION sequencing verloopt de identificatie op soortniveau echter (nog) niet optimaal. De ontwikkelingen op het gebied van de MinION flowcellen en de software voor interpretatie van de data verlopen echter snel waardoor gedurende de looptijd van het in dit rapport beschreven project de error rate verder is verlaagd, waardoor momenteel nauwkeuriger identificatie mogelijk moet zijn dan

waargenomen in de hier beschreven studie. Daarnaast zijn er technieken ontwikkeld waarbij het mogelijk is om van elk DNA molecuul de sequentie meerdere keren te bepalen (Calus et al. 2018) en dat gebruikt kan worden om de error rate verder terug te dringen. De mogelijkheid om de sequenties te bepalen van lange DNA-moleculen kan ook voordelen hebben bij metagenomics analyses. Bij deze analyses beperkt de sequencing zich niet tot het 16S rRNA gen maar wordt de sequentie bepaald van al het aanwezige DNA. Hierdoor is het mogelijk om inzicht te krijgen in alle aanwezige genen. Daarom wordt aanbevolen om aanvullend onderzoek uit te voeren naar de toepassingsmogelijkheden van MinION voor metagenomics analyses. Vanwege de snelle doorontwikkeling van MinION is het ook van belang om op de hoogte te blijven van verdere ontwikkeling van het systeem die leiden een lagere error rate waardoor toepassing van MinION voor microbial profiling mogelijk wordt. Het gebruik van de mock community in dit onderzoek maakt duidelijk dat de beschikbaarheid van een goed gestandaardiseerde en gekarakteriseerde bacteriële gemeenschap van groot belang is voor het vergelijken, standaardiseren en optimaliseren van methoden. Momenteel worden de toepassingsmogelijkheden van microbial profiling nog vaak beperkt vanwege het ontbreken van een uniforme aanpak. In vervolgonderzoek wordt aanbevolen om een gestandaardiseerde methode te ontwikkelen die toegepast wordt in de Nederlandse en Vlaamse drinkwatersector waardoor onderzoeksresultaten goed kunnen worden vergeleken en uitgewisseld. De beschikbaarheid van een goed gedefinieerde mock community kan daarbij gebruikt worden om resultaten van verschillende experimenten te kunnen vergelijken.

5 Literatuur

- Alawi, M., Lipski, A., Sanders, T., Pfeiffer, E.M. and Spieck, E. (2007) Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. *Isme J* 1(3), 256-264.
- Calus, S.T., Ijaz, U.Z. and Pinto, A.J. (2018) NanoAmpli-Seq: A workflow for amplicon sequencing from mixed microbial communities on the nanopore sequencing platform. *bioRxiv*.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G. and Knight, R. (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *Isme J* 6(8), 1621-1624.
- Carvalhais, L.C., Dennis, P.G., Tyson, G.W. and Schenk, P.M. (2012) Application of metatranscriptomics to soil environments. *J Microbiol Methods* 91(2), 246-251.
- Carvalhais, L.C. and Schenk, P.M. (2013) Sample processing and cDNA preparation for microbial metatranscriptomics in complex soil communities. *Methods Enzymol* 531, 251-267.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M. and Tiedje, J.M. (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 37(Database issue), D141-D145.
- de Vet, W.W., Dinkla, I.J., Rietveld, L.C. and van Loosdrecht, M.C. (2011) Biological iron oxidation by *Gallionella* spp. in drinking water production under fully aerated conditions. *Water Res* 45(17), 5389-5398.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P. and Andersen, G.L. (2006) Greengenes: Chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible in ARB.
- Deutscher, M.P. (2003) Degradation of stable RNA in bacteria. *J Biol Chem* 278(46), 45041-45044.
- Deutscher, M.P. (2006) Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res* 34(2), 659-666.
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I.L., Agellon, L.B. and Xia, J. (2017) MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res*.
- Frias-Lopez, J., Shi, Y., Tyson, G.W., Coleman, M.L., Schuster, S.C., Chisholm, S.W. and Delong, E.F. (2008) Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(10), 3805-3810.
- Gifford, S.M., Sharma, S., Booth, M. and Moran, M.A. (2013) Expression patterns reveal niche diversification in a marine microbial assemblage. *Isme J* 7(2), 281-298.
- Gifford, S.M., Sharma, S., Rinta-Kanto, J.M. and Moran, M.A. (2011) Quantitative analysis of a deeply sequenced marine microbial metatranscriptome. *Isme J* 5(3), 461-472.
- Heijnen, L. (2016) NGS voor detectie van fecale besmettingen. BTO rapport 2016.026.
- Jain, M., Tyson, J., Loose, M., Ip, C., Eccles, D., O'Grady, J., Malla, S., Leggett, R., Wallerman, O., Jansen, H., Zalunin, V., Birney, E., Brown, B., Snutch, T., Olsen, H. and null, n. (2017) MinION Analysis and Reference Consortium: Phase 2 data release and analysis of R9.0 chemistry [version 1; referees: 1 approved, 2 approved with reservations].
- Kampfer, P., Busse, H.J. and Falsen, E. (2006) *Polaromonas aquatica* sp. nov., isolated from tap water. *Int J Syst Evol Microbiol* 56(Pt 3), 605-608.
- Keto-Timonen, R., Hietala, N., Palonen, E., Hakakorpi, A., Lindstrom, M. and Korkeala, H. (2016) Cold Shock Proteins: A Minireview with Special Emphasis on Csp-family of Enteropathogenic *Yersinia*. *Front Microbiol* 7, 1151.
- Kooker, J.M., Fox, K.F. and Fox, A. (2012) Characterization of *Micrococcus* strains isolated from indoor air. *Molecular and cellular probes* 26(1), 1-5.

- Lesaulnier, C.C., Herbold, C.W., Pelikan, C., Berry, D., Gerard, C., Le Coz, X., Gagnot, S., Niggemann, J., Dittmar, T., Singer, G.A. and Loy, A. (2017) Bottled aqua incognita: microbiota assembly and dissolved organic matter diversity in natural mineral waters. *Microbiome* 5(1), 126.
- Li, R., Tun, H.M., Jahan, M., Zhang, Z., Kumar, A., Fernando, D., Farenhorst, A. and Khafipour, E. (2017) Comparison of DNA-, PMA-, and RNA-based 16S rRNA Illumina sequencing for detection of live bacteria in water. *Scientific reports* 7(1), 5752.
- Magic-Knezev, A., Wullings, B. and Van der Kooij, D. (2009) *Polaromonas* and *Hydrogenophaga* species are the predominant bacteria cultured from granular activated carbon filters in water treatment. *J Appl Microbiol* 107(5), 1457-1467.
- Martiny, A.C., Albrechtsen, H.J., Arvin, E. and Molin, S. (2005) Identification of bacteria in biofilm and bulk water samples from a nonchlorinated model drinking water distribution system: detection of a large nitrite-oxidizing population associated with *Nitrospira* spp. *Appl Environ Microbiol* 71(12), 8611-8617.
- McCarren, J., Becker, J.W., Repeta, D.J., Shi, Y., Young, C.R., Malmstrom, R.R., Chisholm, S.W. and DeLong, E.F. (2010) Microbial community transcriptomes reveal microbes and metabolic pathways associated with dissolved organic matter turnover in the sea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(38), 16420-16427.
- Oswald, K., Graf, J.S., Littmann, S., Tienken, D., Brand, A., Wehrli, B., Albertsen, M., Daims, H., Wagner, M., Kuypers, M.M., Schubert, C.J. and Milucka, J. (2017) *Crenothrix* are major methane consumers in stratified lakes. *Isme J* 11(9), 2124-2140.
- Pascual, N., Loux, V., Derozier, S., Martin, V., Debroas, D., Maloufi, S., Humbert, J.F. and Leloup, J. (2015) Technical challenges in metatranscriptomic studies applied to the bacterial communities of freshwater ecosystems. *Genetica* 143(2), 157-167.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. and Glockner, F.O. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41(Database issue), D590-596.
- Quick, J., Loman, N.J., Duraffour, S., Simpson, J.T., Severi, E., Cowley, L., Bore, J.A., Koundouno, R., Dudas, G., Mikhail, A., Ouédraogo, N., Afrough, B., Bah, A., Baum, J.H.J., Becker-Ziaja, B., Boettcher, J.P., Cabeza-Cabrerizo, M., Camino-Sánchez, Á., Carter, L.L., Doerrbecker, J., Enkirch, T., Dorival, I.G., Hetzelt, N., Hinzmann, J., Holm, T., Kafetzopoulou, L.E., Koropogui, M., Kosgey, A., Kuisma, E., Logue, C.H., Mazzarelli, A., Meisel, S., Mertens, M., Michel, J., Ngabo, D., Nitzsche, K., Pallasch, E., Patrono, L.V., Portmann, J., Repits, J.G., Rickett, N.Y., Sachse, A., Singethan, K., Vitoriano, I., Yemanaberhan, R.L., Zekeng, E.G., Racine, T., Bello, A., Sall, A.A., Faye, O., Faye, O., Magassouba, N.F., Williams, C.V., Amburgey, V., Winona, L., Davis, E., Gerlach, J., Washington, F., Monteil, V., Jourdain, M., Bererd, M., Camara, A., Somlare, H., Camara, A., Gerard, M., Bado, G., Baillet, B., Delaune, D., Nebie, K.Y., Diarra, A., Savane, Y., Pallawo, R.B., Gutierrez, G.J., Milhano, N., Roger, I., Williams, C.J., Yattara, F., Lewandowski, K., Taylor, J., Rachwal, P., J. Turner, D., Pollakis, G., Hiscox, J.A., Matthews, D.A., Shea, M.K.O., Johnston, A.M., Wilson, D., Hutley, E., Smit, E., Di Caro, A., Wölfel, R., Stoecker, K., Fleischmann, E., Gabriel, M., Weller, S.A., Koivogui, L., Diallo, B., Keita, S., Rambaut, A., Formenty, P., Günther, S. and Carroll, M.W. (2016) Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* 530(7589), 228-232.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. and Weber, C.F. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75(23), 7537-7541.
- Stoecker, K., Bendinger, B., Schoning, B., Nielsen, P.H., Nielsen, J.L., Baranyi, C., Toenshoff, E.R., Daims, H. and Wagner, M. (2006) *Cohn's Crenothrix* is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7), 2363-2367.
- van der Wielen, P. (2013) Effect van bedrijfsvoering zuivering en distributiesysteem op biologische stabiliteit bij ps Nuland. BTO 2013.201(s).
- van der Wielen, P. and van der Kooij, D. (2008) Effect van de zuivering op de biologische stabiliteit van het drinkwater van ps Nuland. "Onderzoek 2007 en 2008". KWR 08.092.
- van der Wielen, P.W., Voost, S. and van der Kooij, D. (2009) Ammonia-oxidizing bacteria and archaea in groundwater treatment and drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 75(14), 4687-4695.

- van Kessel, M.A., Speth, D.R., Albertsen, M., Nielsen, P.H., Op den Camp, H.J., Kartal, B., Jetten, M.S. and Lucker, S. (2015) Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* 528(7583), 555-559.
- van Vliet, A.H. (2010) Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. *FEMS Microbiol Lett* 302(1), 1-7.
- Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10(1), 57-63.
- Williams, K.E., Huyvaert, K.P. and Piaggio, A.J. (2016) No filters, no fridges: a method for preservation of water samples for eDNA analysis. *BMC Res Notes* 9, 298.
- Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W. and Glockner, F.O. (2014) The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res* 42(Database issue), D643-648.

Bijlage I algemene parameters

I.1 ATP

Locatie code	NULA-BO-2301			NULA-VF-4101			NULA-NF-4201			NULA-KF-4301			NULA-VF-3811			NULA-NF-4011			NULA-RW-0991			NULA-RW-1993		
Locatie	Influent voorfilter			Effluent voorfilter			Effluent nafilter			Effluent actief kool			Influent dubbellaags filter D			Effluent dubbellaags filter D			Aanvulleiding Loosbroek			Gemengd reinwater		
Datum	15-03	23-03	29-03	15-03	23-03	29-03	15-03	23-03	29-03	15-03	23-03	29-03	15-03	23-03	29-03	15-03	23-03	29-03	15-03	23-03	29-03	15-03	23-03	29-03
ATP (pg/ml)	3,8	4,2	4,9	5,6	4,8	5,1	4,7	2	2,6	3	2,9	4,9	56	37	39	4,5	4,9	3,8	2	2,2	2,2	6,1	7,4	5
SD	0	0,15	0,15	0,59	1	0,44	1,9	0,59	0,15	0,44	0,74	2,5	0,44	1,9	0,44	2,5	0,59	0,59	0,15	0,3	0,15	0	7,4	0,3

I.2 Chemische Parameters

	nul AKF 4301			nul AVF 3811			nul anF 4011			nul ARW 0911			nul ARW 1993		
	Effluent actief kool			Influent dubbellaags filter D			Effluent dubbellaags filter D			Aanvulleiding Loosbroek			Gemengd reinwater		
	15-03	23-03	29-03	15-03	23-03	29-03	15-03	23-03	29-03	15-03	23-03	29-03	15-03	23-03	29-03
Methaan (µg/l)				12	9,0	14	5	< 5	6						
IJzer (mg/l)				0,48	0,42	0,36	0,08	0,02	0,02						
Mangaan (µg/l)				10	7,8	8,1	0,62	< 0,60	< 0,60						
Ammonium (mg NH ₄ -N/l)				0,41	0,44	0,46	< 0,015	< 0,015	< 0,015						
Ortho-fosfaat (µg PO ₄ -P/l)	5	9	7				8	24	21	115	92	112	6	15	25
TOC (mg C/l)	5,7	4,7	5,0				1,8	1,9	1,9	1,5	1,7	1,6	3,1	3,1	3,0

Bijlage II dominante OTU's in drinkwaterzuivering Nuland

II.1 Middeldiepe winning: Influent voorfilter

					Influent voorfilter
Phylum	Klasse	Orde	Familie	Geslacht	Percentage
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	Gallionella	39,654
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	Gallionella	3,352
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	3,236
Omniotrophica	Omniotrophica_cl	Omniotrophica_or	Omniotrophica_fa	Omniotrophica_ge	2,883
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	2,510
Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Helicobacteraceae	Sulfuricurvum	2,100
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	1,846
Omniotrophica	Omniotrophica_cl	Omniotrophica_or	Omniotrophica_fa	Omniotrophica_ge	1,435
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bacteriovoracaceae	Bacteriovorax	1,414
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	1,381
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bacteriovoracaceae	Bacteriovorax	1,357
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	1,059
Omniotrophica	Omniotrophica_cl	Omniotrophica_or	Omniotrophica_fa	Omniotrophica_ge	1,055
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Sulfuriferula	1,033
Omniotrophica	Omniotrophica_cl	Omniotrophica_or	Omniotrophica_fa	Omniotrophica_ge	1,003

II.2 Middeldiepe winning: Effluent voorfilter

Phylum	Klasse	Orde	Familie	Geslacht	Percentage
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	Gallionella	25,831
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	Gallionella	4,536
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	4,459
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	3,547
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	2,289
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bacteriovoracaceae	Bacteriovorax	2,141
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonas	1,779
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	Candidatus_Nitrotoga	1,759
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	1,713
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	1,712
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bacteriovoracaceae	Bacteriovorax	1,620
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	1,605
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	1,545
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	1,446
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	Desulfobacca	1,295
Bacteroidetes	Bacteroidetes_unclassified	Bacteroidetes_unclassified	Bacteroidetes_unclas	Bacteroidetes_unclassified	1,226
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira	1,083
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	1,071

II.3 Middeldiepe winning: Effluent nafilter

Phylum	Klasse	Orde	Familie	Geslacht	Percentage
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	Gallionella	11,550
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	6,657
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bacteriovoracaceae	Bacteriovorax	3,513
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bacteriovoracaceae	Bacteriovorax	2,675
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	2,650
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	2,588
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	2,369
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	2,077
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	1,722
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	1,582
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	1,498
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	1,464
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	1,321
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	Gallionella	1,264
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	Desulfobacca	1,261
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	1,216
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	1,208
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	1,208
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	1,101
Acidobacteria	Subgroup_6	Subgroup_6_or	Subgroup_6_fa	Subgroup_6_ge	1,026

II.4 Middeldiepe winning: Effluent actieve kool

Phylum	Klasse	Orde	Familie	Geslacht	Percentage
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	9,393
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	3,947
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	3,285
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	3,043
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	2,989
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	2,232
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	1,913
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	1,746
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	1,692
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	Desulfobacca	1,680
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	1,633
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	1,592
Acidobacteria	Subgroup_6	Subgroup_6_or	Subgroup_6_fa	Subgroup_6_ge	1,568
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	1,415
Acidobacteria	Subgroup_6	Subgroup_6_unclassified	Subgroup_6_unclassified	Subgroup_6_unclassified	1,369
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	uncultured	1,231
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	1,217
Proteobacteria	Betaproteobacteria	TRA3-20	TRA3-20_fa	TRA3-20_ge	1,035

II.5 Diepe winning: Influent dubbellaags filter D

Phylum	Klasse	Orde	Familie	Geslacht	Percentage
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	37,699
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	15,862
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	12,476
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia	11,482
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Crenotrichaceae	Crenothrix	3,988
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonas	3,869
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	Gallionella	2,790
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	Rickettsiales_Incertae_Sedis	Candidatus_Odyssella	1,572
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Ideonella	1,479

II.6 Diepe winning: Effluent dubbellaags filter D

Phylum	Klasse	Orde	Familie	Geslacht	Percentage
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	28,820
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	6,352
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	6,240
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonas	5,025
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia	4,069
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteria_Incertae_Sedis	Alphaproteobacteria_Incertae_Sedis_unclassified	Alphaproteobacteria_Incertae_Sedis_unclassified	2,391
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	Rickettsiales_Incertae_Sedis	Candidatus_Odyssella	1,640
Peregrinibacteria	Candidatus_Peribacteria	Candidatus_Peribacteria_or	Candidatus_Peribacteria_fa	Candidatus_Peribacteria_ge	1,444
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Ideonella	1,298
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	LWSR-14	LWSR-14_ge	1,279
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira	1,187
Acidobacteria	Subgroup_6	Subgroup_6_unclassified	Subgroup_6_unclassified	Subgroup_6_unclassified	1,054

II.7 Aanvulling Loosbroek

Phylum	Klasse	Orde	Familie	Geslacht	Percentage
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira	4,560
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	uncultured	4,449
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	Gallionella	3,933
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Methyloglobulus	3,582
Acidobacteria	Subgroup_6	Subgroup_6_or	Subgroup_6_fa	Subgroup_6_ge	2,706
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteria_Incertae_Sedis	Alphaproteobacteria_Incertae_Sedis_unclassified	Alphaproteobacteria_Incertae_Sedis_unclassified	1,929
Acidobacteria	Subgroup_6	Subgroup_6_unclassified	Subgroup_6_unclassified	Subgroup_6_unclassified	1,899
SR1_(Absconditabacteria)	SR1_(Absconditabacteria)_cl	SR1_(Absconditabacteria)_or	SR1_(Absconditabacteria)_fa	SR1_(Absconditabacteria)_ge	1,778
Acidobacteria	Subgroup_6	Subgroup_6_or	Subgroup_6_fa	Subgroup_6_ge	1,473
Acidobacteria	Subgroup_6	Subgroup_6_or	Subgroup_6_fa	Subgroup_6_ge	1,360
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcales_unclassified	Methylococcales_unclassified	1,270
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcales_unclassified	Methylococcales_unclassified	1,235
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira	1,143

II.8 Gemengd reinwater

Phylum	Klasse	Orde	Familie	Geslacht	Percentage
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	14,870
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Polaromonas	5,671
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	4,612
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia	3,682
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	Candidatus_Nitrotoga	3,224
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonas	2,382
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	2,003
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	MNG7(99)	MNG7_ge	1,762
Proteobacteria	Betaproteobacteria	TRA3-20	TRA3-20_fa	TRA3-20_ge	1,735
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonadaceae_unclassified	1,696
Omnitrophica	Omnitrophica_cl	Omnitrophica_or	Omnitrophica_fa	Omnitrophica_ge	1,326
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteria_Incertae_Sedis	Alphaproteobacteria_Incertae_Sedis_unclassified	Alphaproteobacteria_Incertae_Sedis_unclassified	1,043

Complete OTU tabellen:



Microsoft Excel
Worksheet