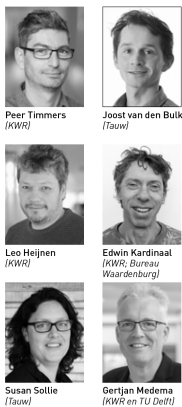




AUTEURS



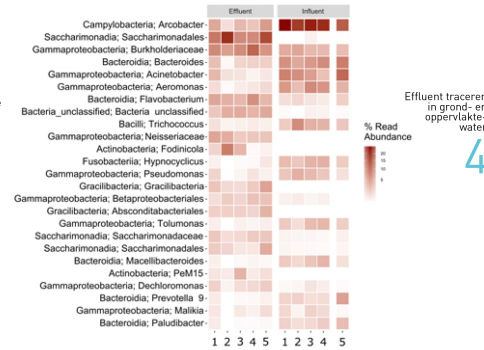
# MICROBIËLE VINGERAFDRUK VOOR BRONOPSPORING IN OPPERVLAKTEWATERBEHEER

De kwaliteit van het Nederlandse oppervlaktewater staat onder druk, mede door riooloverstorten en door effluentlozingen vanuit rioolwaterzuiveringsinstallaties. Die kunnen onder andere fecale of andere schadelijke micro-organismen bevatten. Is DNA-fingerprinting geschikt om microbiële verontreinigingen te identificeren en de lokatie van de bron te achterhalen?

Door riooloverstorten en lozingen van effluent van rioolwaterzuiveringsinstallaties (rwzi's) hebben oppervlaktewaterbeheerders te maken met wisselingen in de kwaliteit van het oppervlaktewater. Uit beheer technisch oogpunt is het belangrijk te weten waar de lozingen precies vandaan komen. Waterbeheerders (gemeenten en waterschappen) hebben hierover de volgende vragen:

1. Is de invloed van riooloverstorten op oppervlaktewater te herkennen en te herleiden tot een specifieke overstort?
2. Is effluentlozing van rwzi op oppervlaktewater traceerbaar, en zo ja, tot hoever van de bron?
3. Is lekkage naar het grondwater vanuit de beluchtingstank van een rwzi of vanuit het effluent traceerbaar, en tot op welke afstand?
4. Is de herkomst van oppervlaktewater dat uitkomt op ander oppervlaktewater (bijv. polderwater in boezemwater) traceerbaar?

Figuur 1: De 'microbiële vingerafdrukken' van rwzi-effluent en -inffluent. Te zien zijn de 25 meest voorkomende microbiële genera in beide monstertypen. Het voorkomen (de abundantie) is uitgedrukt als gemiddelde relatieve abundantie (% read abundance) per monstertype (gemiddelde van de verschillende bemonsteringsmomenten) op de bemonsteringslocaties 1 t/m 7.



Elk type water (oppervlaktewater, rwzi-effluent, rioolwater, grondwater) heeft zijn eigen specifieke microbiële samenstelling, een unieke microbiële 'vingerafdruk'. De kwaliteit van het effluent van rwzi's varieert echter in de tijd (Emissieregistratie, 2019), net als de frequentie en omvang van riooloverstorten. Dit onderzoek wil achterhalen of de microbiële vingerafdruk bruikbaar is voor het beantwoorden van bovenstaande vragen.

**Onderzoekopzet en methode**

Om een microbiële vingerafdruk te bepalen wordt een marker-gen in het DNA van alle micro-organismen in het water in kaart gebracht. Dit gebeurt met NGS (Next Generation Sequencing, NGS), een techniek die de code van zeer veel verschillende DNA-moleculen tegelijk kan ontcijferen.

Voor dit onderzoek zijn monsters genomen van het influent en effluent van 5 rwzi's en van oppervlaktewater (32 locaties). Voor vraag 3 zijn ook de rwzi-beluchtingstank en 4 grondwaterpeilbuizen bemonsterd. De monsters zijn verspreid over de periodes juni-november 2017 en maart-september 2018 genomen. Uit de monsters werd DNA geïsoleerd om de microbiële vingerafdruk te bepalen. Dit laatste gebeurde in twee stappen: specifieke DNA-sequenties bepalen met NGS, daarna met bioinformatica software (Schloss et al., 2009 en Andersen et al., 2018) de bijbehorende microbiële vingerafdruk vaststellen. Ten slotte werd met behulp van de tool *Source Tracker* (Knights et al., 2011) het type bron van de microbiële vingerafdrukken bepaald.

**Vaststellen microbiële vingerafdrukken**

Per locatie (rwzi) zijn de analysesresultaten van de monsters gemiddeld. In figuur 1 zijn deze gemiddelden voor de meest voorkomende microben weerge-

geven voor respectievelijk het effluent en het influent (rioolwater) van de rwzi. Het effluent heeft een herkenbaar profiel met als karakteristieke microbiële groepen zoals *Saccharimonadales*, *Neisseriaceae* en *Fodinicola*. De vingerafdruk van effluent blijkt te verschillen per rwzi, meer dan het profiel van rioolwater.

Rwzi-inffluent (rioolwater) heeft een zeer typerende microbiële gemeenschap, die bestaat uit zowel fecale micro-organismen (afkomstig uit de darm van mens en dier) als bacteriën die vooral groeien in het riool. Karakteristiek zijn onder andere *Arcobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* en *Trichococcus*.

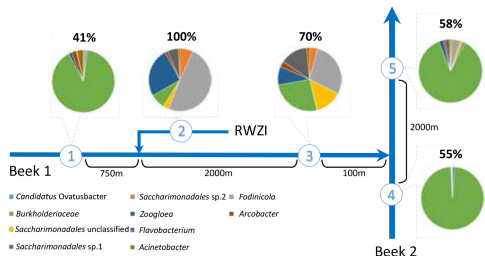
**Vragen beantwoord?**

**Vraag 1: Traceren riooloverstort**

Het zeer specifieke profiel maakte rioolwater uit overstorten traceerbaar in het ontvangende oppervlaktewater. Met de microbiële vingerafdruk kan dus worden vastgesteld in welke mate een oppervlaktewater onder invloed staat van overstorten. Hetzelfde specifieke en stabiele beeld van rioolwater zien we overigens niet alleen in Nederland maar ook in bijvoorbeeld de Verenigde Staten, Australië, Brazilië, China en Spanje (McLellan et al., 2019). Rioolwater is dus waarschijnlijk overal te traceren aan de hand van deze indicator-bacteriën.



JUNI 2020



Figuur 2: Microbiële vingerafdruk van de meetlocaties 1 t/m 5. Situatie: rwzi loost effluent op Beek 1, die uitkomt op Beek 2. De cirkeldiagrammen tonen het relatieve aandeel in de monsters (in %, berekend met *Source Tracker*) van enkele karakteristieke bacterie-genera die horen bij de vingerafdruk van rwzi-effluent.

De keerzijde van de medaille is dat rioolwater van verschillende locaties en tijdstippen zoveel op elkaar lijkt, dat niet bepaald kon worden van welke overstort gevonden micro-organismen precies afkomstig zijn wanneer er in het gebied meerdere overstorten actief zijn. Wordt op een plek heel dicht bij een overstort bemonsterd dan zou dit mogelijk wel kunnen, en dan kan misschien ook de overstortfrequentie bepaald worden.

**Vraag 2: Traceren rwzi-effluent**

Om de traceerbaarheid van effluent in oppervlaktewater te bepalen zijn op verschillende momenten in het jaar in totaal 32 monsters genomen op 5 locaties in het ontvangende oppervlaktewater (beek 1) en in het water waar beek 1 in uitmondt (beek 2). Figuur 2 laat de bemonsteringspunten zien. De oppervlaktewatermonsters van direct voor en na het lozingspunt van de rwzi zijn vergeleken met het effluent met behulp van de *Source Tracker*-tool. Deze tool kan kwantificeren in welke mate de microbiële populatie van het ene watermonster onder invloed staat van dat van een ander. Ook dit is weergegeven in figuur 2.

Zien is dat de microbiële populatie van monsterlocatie 1 voor 41% onder invloed staat van rwzi-effluent. Niet af te leiden is of het gaat om effluent uit de (stroomafwaarts) nabijgelegen beek, of om effluent van andere rwzi's. Monsterlocatie 3 (vlak na de rwzi) bevat een hoger percentage rwzi-effluent (70%). Op andere monstermomenten stond monsterlocatie 1 overigens veel meer onder invloed van rwzi-effluent. Ook de samenstelling van het effluent (monsterpunt 2) varieert in de tijd; het microbiële profiel

van het effluent en het aandeel ervan in oppervlaktewater varieert dus over de seizoenen. Monsterlocatie 4 bevindt zich in groter ontvangend oppervlaktewater (beek 2), bovenstroms van het punt waar Beek 1 instroomt, en staat nauwelijks onder invloed van het rwzi-effluent. Benedenstroms, bij monsterlocatie 5, is het effect duidelijker; veel beperkter dan bij monsterlocatie 3, maar nog zeker waarneembaar. Geconcludeerd kan worden dat de microbiële vingerafdruk mogelijkheden biedt om de invloed van rwzi-effluent op de oppervlaktewaterkwaliteit te signaleren, maar herleiden tot een specifieke rwzi lijkt lastiger.

**Vraag 3: Lekkage naar grondwater traceerbaar?**

Een andere toepassing voor NGS betreft het vaststellen van eventuele lekkages vanuit een rwzi naar het grondwater. Hiervoor zijn gedurende het jaar monsters genomen van a) het grondwater rondom een rwzi, b) rwzi-inffluent, actief slib van de beluchtingstank en effluent en c) het ontvangende oppervlaktewater. Het microbiële profiel van influent, effluent en beluchtingstank bleek traceerbaar tot in het grondwater (peilbuizen). Dit geeft lekkage aan. Opvallend was dat eerder uitgevoerde chemische analyses (INH4 en CZV) geen sporen van lekkage lieten zien. Onderzoek aan de hand van de microbiële vingerafdruk kan dus zinvol zijn voor het vaststellen van lekkages uit de rwzi.

**Vraag 4: Mengen de oppervlaktewateren traceerbaar?**

De metingen in de onderzochte oppervlaktewater-

systemen laten zien dat de vingerafdruk van een watersysteem specifieke karakteristieken heeft, die echter variëren in de tijd. Om een nauwkeurig beeld te krijgen van het effect van het uitstromen van een oppervlaktewaterstroom in een andere waterstroom is een nauwkeurige vingerafdruk nodig; daarvoor is het noodzakelijk om in beide stromen door de tijd (seizoenen) heen te meten.

**Vervolgonderzoek en toepassingen**

Dit onderzoek maakt duidelijk dat de microbiële vingerafdruk samen met de *Source Tracker*, in principe ingezet kan worden om de herkomst en relatieve invloed van watertypen te traceren. Het is nu zaak om de praktische toepasbaarheid van de methode in onderzoek en monitoring van (afval) waterbeheer te bepalen. Onder andere dienen onze resultaten gevalideerd te worden door ze te vergelijken met resultaten uit traditionele methoden om de waterkwaliteit te bepalen, zoals *E. coli*- en *enterococci*-koloniegelden. Een ander interessant aspect voor vervolgonderzoek is te kijken in hoeverre uit kwalitatieve gegevens (de aard en relatieve *hoeveelheid* van een bepaalde microbiële populatie in een watertype) kwantitatieve gegevens (de *hoeveelheid* instromend 'ander' water) af te leiden zijn. In een vervolgfase kunnen dan de debietgegevens en nutriëntenvrachten uit watersysteemanalyses vergeleken worden met de resultaten van de microbiële vingerafdruk. Een andere vraag is: hoe ontwikkelt een populatie micro-organismen uit rwzi-effluent zich in de tijd na lozing op oppervlaktewater? Ook zou de microbiële vingerafdruk bij kunnen dragen aan de vraag welke microbiologische samenstelling ecologisch gezond water moet hebben en of het aan de Europese Kaderrichtlijn Water voldoet.

Peer Timmers (KWR), Joost van den Bulk (Tauw), Leo Heijnen (KWR), Edwin Kardinaal (KWR; Bureau Waardenburg), Susan Sotlie (Tauw), Gerjant Medema (KWR en TU Delft)

**Dankwoord**

Dit onderzoek is mede gefinancierd met PPS-financiering uit de Toeslag voor Topconsortia voor Kennis en Innovatie (TKI's) van het ministerie van Economische Zaken en Klimaat. De resultaten zijn openbaar. Met dank aan alle partners: Waterschap Fryslân, Waterschap Vallei & Veluwe, Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier, Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden, Waterschap Hunze en Aa's, Waterschap Rivierenland, Hoogheemraadschap van Rijnland, Gemeente Utrecht en BaseClear B.V.

**Referenties**

- Andersen K., Kirkegaard R.H., Karst S.M., Albertsen M. (2018). Ampz2: an R package to analyse and visualise 16S rRNA amplicon data. *bioRxiv*.
- Emissieregistratie (2019). [www.Emissieregistratie.nl/jaarcijfers/2017](http://www.Emissieregistratie.nl/jaarcijfers/2017). RWM, PBL, CBS, RWS-WVL, Wageningen Environmental Research, Deltares, RVO, en TNO.
- Knights D., Kuczynski J., Charlson E. et al. Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nat Methods* 8, 761-763 (2011). <https://doi.org/10.1038/nmeth.1650>
- McLellan S. L., Roguet A. (2019). The unexpected habitat in sewer pipes for the propagation of microbial communities and their imprint on urban waters. *Curr Opin Biotechnol*, 57: 34-41.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Sahl, J. W. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 75(23): 7537-7541.

**SAMENVATTING**

Riooloverstorten, lekkages van riolering en effluentlozingen van rwzi's hebben grote invloed op de oppervlaktewaterkwaliteit. Het is daarom zaak om de invloed van rioolwater en rwzi-effluent op grond- en oppervlaktewater goed te kunnen monitoren. Rioolwater en rwzi-effluent hebben karakteristieke microbiële vingerafdrukken die, in vergelijking met oppervlakte- en grondwater, weinig fluctueren in de tijd. Dit onderzoek laat zien dat rioolwater en rwzi-effluent met behulp van deze vingerafdruk goed te traceren in is grond- en oppervlaktewater.

Effluent traceren in grond- en oppervlaktewater



JUNI 2020