

BTO 2016.026 | April 2016

## **BTO** rapport

### NGS voor detectie van fecale besmettingen

Korte verkenning van de mogelijkheden



# BTO

## NGS voor detectie van fecale besmettingen

BTO 2016.026 | April 2016

### Opdrachtnummer

400554/111

### Projectmanager

Luc Hornstra

### Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Hygiëne en veiligheid

### Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

### Auteur(s)

Leo Heijnen

### Verzonden aan

Jaar van publicatie  
2016

#### Meer informatie

Leo Heijnen  
T 030-6069743  
E [leo.heijnen@kwrwater.nl](mailto:leo.heijnen@kwrwater.nl)

Keywords: NGS, fecale  
verontreiniging, snelle detectie  
methode

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

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



BTO 2016.026 | April 2016 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

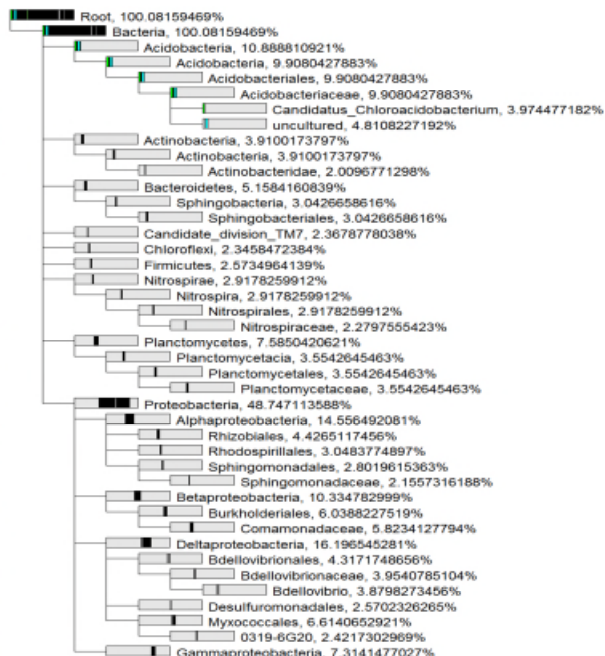
Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

# BTO Managementsamenvatting

## NGS maakt gevoelige detectie van fecale besmettingen in water mogelijk

**Auteur(s)** Leo Heijnen

Een korte verkenning laat zien dat Next Generation Sequencing (NGS) in potentie bruikbaar is voor een gevoelige en verbeterde detectie van fecale verontreinigingen in water. In tegenstelling tot gangbare (kweek)methoden richt NGS zich niet op detectie van een beperkt aantal organismen maar geeft NGS een vrijwel volledig beeld van microbiële gemeenschap in een (water)monster. Daardoor kan mogelijk, slechts met één analyse, inzicht worden verkregen in het optreden van ongewenste veranderingen in het water, zoals de introductie van (fecale) verontreinigingen, het functioneren van de zuivering of het optreden van problemen tijdens distributie. Deze verkennende studie naar de inzet van NGS komt voort uit inventarisatie waarin de noodzaak van snelle en verbeterde methoden voor detectie van fecale besmettingen in de drinkwatersector is gesignaleerd (Smeets et al. 2015). Voor de korte termijn geven laboratoria prioriteit aan de implementatie van veelbelovende RT-PCR methoden voor snelle detectie van het RNA van *E. coli* en enterococci daarom zijn binnen het thema “Nieuwe meetmethoden en sensing” (NMS) projecten gestart waarbinnen validatie en implementatie van RT-PCR methoden centraal staat. Voor de verdere toekomst werd “Next Generation Sequencing” (NGS) gezien als veelbelovende technologie. In dit onderzoek is een eerste verkenning uitgevoerd naar de mogelijkheden van NGS voor het detecteren van fecale verontreinigingen. Doel van de versnelde en verbeterde meetmethoden is risico's voor de volksgezondheid en overlast voor de klant te beperken.



NGS analyses: de MiSeq NGS sequencer (linksboven); de DNA-chip (het “hart” van de sequencer, linksonder) en de globale samenstelling van de bacteriële gemeenschap in drinkwater (rechts)



### Belang: sneller en beter beeld van hygiënische betrouwbaarheid water

Kweekmethoden geven pas na enkele dagen duidelijkheid over de hygiënische betrouwbaarheid van drinkwater. Door snellere en verbeterde vaststelling van problemen na ingrepen in het leidingnet of tijdens productie of distributie van drinkwater kunnen risico's voor de volksgezondheid en overlast (kookadvies) voor de klant worden beperkt. Mogelijk kan Next Generation Sequencing (NGS) op termijn worden doorontwikkeld tot een technologie waarmee met een vrijwel compleet beeld van de microbiologie een zeer betrouwbaar en snel beeld kan worden gegenereerd van de hygiënische betrouwbaarheid van water. In deze studie is een eerste verkenning uitgevoerd van de potentiële mogelijkheden van NGS voor detectie van fecale besmettingen.

### Aanpak: vergelijking standaard kweekmethoden, qPCR en NGS

Om een globale indruk te krijgen van de mogelijkheden van NGS voor het detecteren van fecale verontreinigingen zijn er laboratoriumexperimenten uitgevoerd. Voor het simuleren van fecaal besmette monsters zijn er mengsels van drinkwater met een verdunningsreeks van verschillende concentraties rioolwater (influent en effluent) samengesteld. Op deze mengsels zijn analyses uitgevoerd met de standaard kweekmethoden (*E. coli* en enterococci), qPCR analyses voor detectie van mens-specifieke *Bacteroides* bacteriën en NGS. De resultaten van deze verschillende analyses zijn met elkaar vergeleken.

### Resultaten: gevoelige detectie van fecale verontreiniging mogelijk met NGS

Uit de analyse van kunstmatig samengestelde mengsels van drinkwater met rioolwater kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- Er zijn grote verschillen tussen de bacteriële gemeenschap in drinkwater en rioolwater.

- Met NGS is het mogelijk om bacteriegroepen te identificeren die zeer dominant voorkomen in rioolwater en niet in drinkwater ("rioolwater bacteriën").
- Detectie van deze "rioolwater bacteriën" is met NGS mogelijk tot een concentratie van: (i) 100 nanoliter influent in 1 liter drinkwater en (ii) 0,1 ml effluent in 1 liter drinkwater.
- De detectiegrens van NGS is bij deze experimenten vergelijkbaar met die van de standaard kweekmethoden (*E. coli* en enterococci) en qPCR voor detectie van mens-specifieke *Bacteroides* bacteriën.
- Er is nog optimalisatie van de toegepaste NGS methode mogelijk om detectie van "rioolwater bacteriën" te voorkomen in monsters waarin ze niet verwacht worden ("vals positieven").

### Implementatie: doorontwikkeling nodig voor routinematige inzet NGS

Deze korte verkenning laat zien dat NGS in potentie bruikbaar is voor een gevoelige en, door detectie van meerdere bacteriegroepen in één analyse, verbeterde methode voor detectie van fecale verontreinigingen. Momenteel is het nog geen snelle methode, het genereren van data kost ca. 4 dagen en ook het verwerken van de data is nog arbeidsintensief. Vandaar dat NGS nu vooral bruikbaar is voor het verkrijgen van een goed beeld van de microbiologie in watermonsters en de veranderingen die daarin optreden, in plaats van de inzet ervan voor routinematig onderzoek. Naar verwachting zal doorontwikkeling van apparatuur en software er snel toe leiden dat NGS routinematig en wellicht ook "on site" kan worden toegepast.

### Rapport

Dit onderzoek is beschreven in rapport *NGS voor detectie van fecale besmettingen* (BTO 2016.026).

<b>1</b>	<b>Inleiding</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Materiaal en methoden</b>	<b>5</b>
2.1	Kunstmatic besmette watermonsters	5
2.2	Isolatie van DNA	5
2.3	Analyse van E. coli en enterococcen met kweek	6
2.4	Meting van ATP	6
2.5	Meting van DNA-merkers voor mens-specifieke Bacteroides bacteriën	6
2.6	NGS analyses	6
<b>3</b>	<b>Resultaten</b>	<b>11</b>
3.1	Metingen van E. coli, enterococcen, ATP en DNA merkers voor mens specifieke Bacteroides	11
3.2	NGS analyses	14
<b>4</b>	<b>Discussie en conclusies</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>Literatuur</b>	<b>32</b>
	<b>Bijlage I Influent verdunningen: orde niveau</b>	<b>34</b>
	<b>Bijlage II Influent verdunningen: suborde niveau</b>	<b>35</b>
	<b>Bijlage III Influent verdunningen: familie niveau</b>	<b>36</b>
	<b>Bijlage IV Effluent verdunningen: orde niveau</b>	<b>37</b>
	<b>Bijlage V Effluent verdunningen: familie niveau</b>	<b>38</b>
	<b>Bijlage VI Effluent verdunningen: suborde niveau</b>	<b>39</b>

# 1 Inleiding

Het project “Toepassing snelle detectie fecale verontreiniging” is in 2015 gestart met het voeren van gesprekken met vertegenwoordigers van de waterbedrijven en hun laboratoria en met het houden van een workshop. Met deze activiteiten is geïnventariseerd welke behoeften er bestaan, welke ervaringen er al zijn, welke methoden als kansrijk worden gezien en welke methoden mogelijk in de toekomst toegepast kunnen gaan worden. De resultaten van de workshop zijn samengevat in het BTO-rapport “Verslag workshop snelle detectie fecale verontreinigingen” (Smeets et al. 2015). Het belang van de beschikbaarheid van snelle en betere methoden voor de monitoring van de hygiënische betrouwbaarheid van drinkwater werd onderschreven. Voor de korte termijn krijgt de implementatie van veelbelovende RT-PCR methoden voor detectie van het RNA van *E. coli* en enterococci daarom prioriteit bij alle laboratoria. Binnen het thema “Nieuwe meetmethoden en sensing” (NMS) zijn daarom projecten gestart waarbinnen validatie en activiteiten t.b.v. wettelijke acceptatie van deze snelle methoden centraal staat.

Voor toepassing in de verdere toekomst werd “Next Generation Sequencing” (NGS) gezien als veelbelovende technologie voor het monitoren van de waterkwaliteit. Met NGS is het mogelijk om een vrijwel volledig beeld van de bacteriegroepen die in een watermonster aanwezig zijn te genereren. Mogelijk kunnen deze NGS-analyses gebruikt worden om, met één analyse, inzicht te krijgen in het optreden van ongewenste veranderingen van het water, zoals de introductie van fecale verontreinigingen maar mogelijk kan hiermee ook het functioneren van de zuivering of het optreden van problemen tijdens distributie worden beoordeeld.

Het speerpuntonderzoek “Fingerprinting” van 2014-2015 voor Vitens heeft laten zien dat het mogelijk is om met NGS kleine veranderingen in de totale bacteriële flora zichtbaar te maken (Heijnen et al. 2015). Daarnaast bleek het in dit onderzoek mogelijk om met NGS het DNA van fecale bacteriën te detecteren in een watermonster dat genomen werd na een ingreep in het leidingnet en waarin zeer lage concentraties *E. coli* (1 KVE/100 ml) met de standaard kweekmethode werden gedetecteerd. Daarmee zou NGS nieuwe onderzoeksmogelijkheden bieden om afwijkingen in de totale bacteriële flora, die kunnen optreden door de introductie van ongewenst (fecaal besmet) materiaal, aan te tonen. Mogelijk kunnen NGS-analyses, door het zichtbaar maken van de microbiologische context waarin bacteriën aanwezig zullen zijn die specifiek voorkomen in een bepaald milieu (zoals bv. rioolwater), ook inzicht geven in de herkomst en oorzaak van fecale besmettingen.

De technologische ontwikkelingen op het gebied NGS (en software voor interpretatie van data) gaan momenteel erg snel (“NGS revolution”) waardoor nieuwe mogelijkheden voor toepassing in verschillende vakgebieden (klinische diagnostiek, microbiologie, genetica, natuurbeheer) dichtbij komen. De snelheid van NGS methoden is momenteel nog beperkt (minimale analysetijd van enkele dagen) maar, vooral vanwege de snelle toename van klinische toepassingsmogelijkheden, worden er grote stappen gezet in de ontwikkeling van snellere en eenvoudiger technologie. Momenteel is zelfs technologie beschikbaar waarmee “on-site” NGS analyses kunnen worden uitgevoerd op een geminiaturiseerd systeem (<https://nanoporetech.com/products-services/minion1>). Doorontwikkeling van deze technologie zal de toepassingsmogelijkheden van NGS verder doen toenemen.

Er is te verwachten dat NGS technologieën ook kunnen uitgroeien tot krachtige methoden voor routinematige kwaliteitscontrole van drink- en oppervlaktewater (Tan et al. 2015). Met

NGS is het dan wellicht mogelijk om een universele microbiologische methode (Heijnen 2013) te ontwikkelen waarmee in één analyse een beeld verkregen kan worden van de hygiënische betrouwbaarheid maar ook van de aanwezigheid van andere ongewenste of juist gewenste micro-organismen.

Om de toepassingsmogelijkheden van NGS methoden voor het onderzoek naar de hygiënische betrouwbaarheid van drinkwater beter te leren kennen zijn modelexperimenten uitgevoerd. In deze korte verkennende studie zijn kunstmatig besmette watermonsters samengesteld door drinkwater te mengen met verschillende ratio's rioolwater. Vervolgens zijn analyses uitgevoerd met NGS en een scala aan andere analysetechnieken (kweek voor *E. coli* en enterococci, qPCR's voor diergroep specifieke fecale DNA-merkers). NGS analyse van het bacterieel 16S rRNA gen geeft een vrijwel compleet beeld van de bacteriële samenstelling van de monsters. Door de resultaten van de NGS analyse te vergelijken met de resultaten van de andere analysetechnieken is een indruk gekregen van de mogelijkheden en beperkingen van NGS voor de analyse van fecale verontreinigingen.



## 2 Materiaal en methoden

### 2.1 Kunstmatig besmette watermonsters

Het samenstellen van kunstmatig besmette watermonsters is gedaan door een verdunningsreeks van rioolwater (influent en effluent), afkomstig van RWZI Nieuwegein te maken, en een volume 200 ml van elke verdunning toe te voegen aan 1800 ml Nieuwegeins drinkwater.

Op deze manier zijn de volgende monsters samengesteld (tabel 1):

TABEL 1: KUNSTMATIG SAMENGESTELDE MENGMONSTERS VAN RIOOL- EN DRINKWATER

Monsternr.	Concentratie	Monsternr.	Concentratie
	Rioolinfluent in drinkwater		Riooeffluent in drinkwater
M154533	Rioolwater (1 l/l)	M154534	Rioolwater (1 l/l)
M154509	100 ml/l	M154520	100 ml/l
M154510	10 ml/l	M154521	10 ml/l
M154511	1 ml/l	M154522	1 ml/l
M154512	100 µl/l	M154523	100 µl/l
M154513	10 µl/l	M154524	10 µl/l
M154514	1 µl/l	M154525	1 µl/l
M154515	100 nl/l	M154526	100 nl/l
M154516	10 nl/l	M154527	10 nl/l
M154517	1 nl/l	M154528	1 nl/l
M154518	100 pl/l	M154529	100 pl/l
M154519	10 pl/l	M154530	10 pl/l
M154508	Drinkwater (0 l/l)	M154508	Drinkwater (0 l/l)

### 2.2 Isolatie van DNA

Voor het isoleren van DNA uit de samengestelde monsters is van elk monster een volume water gefiltreerd (zie tabel 2 voor de volumes) over polycarbonaat membraanfilters met een poriegrootte van 0,2 µm. Voor het isoleren van DNA uit de, op het filter geconcentreerde micro-organismen, is de Power Biofilm Kit van de firma MoBio gebruikt zoals eerder beschreven (Heijnen and Learbuch 2013). Voor het bepalen van het rendement van de DNA isolatie is het rendement van toegevoegd controle-DNA (IC) bepaald met qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction), zoals eerder beschreven in (Heijnen and Learbuch 2013). Het rendement van het toegevoegde controle-DNA is gebruikt voor het corrigeren van de meetwaarden van DNA merkers voor mens-specifieke *Bacteroides* bacteriën.

Een deel van het geïsoleerde DNA (tabel 2) is gebruikt voor NGS analyses en voor het meten van de concentratie DNA-merkers voor mens-specifieke *Bacteroides* bacteriën. Om inzicht te krijgen in het optreden van kruisbesmettingen tijdens de verschillende labwerkzaamheden zijn ook DNA-isolaties uitgevoerd op “blanco monsters” (monsters waarbij steriel DNA-vrij water is gefiltreerd). Ter controle zijn op deze “blanco monsters” qPCR analyses voor detectie van mens-specifieke *Bacteroides* bacteriën (2.5) en PCR reacties (2.6.2) voor het vermeerderen van 16S rRNA fragmenten.

TABEL 2: WATERVOLUMES VOOR ISOLATIE VAN DNA

Monsternr.	Volume gefiltreerd	Monsternr.	Volume gefiltreerd	Volume DNA	Volume DNA in qPCR/NGS
M154533	5 ml	M154534	5 ml	200 µl	10 µl
M154509	100 ml	M154520	200 ml	200 µl	10 µl
M154510	500 ml	M154521	1000 ml	200 µl	10 µl
M154511	1000 ml	M154522	1000 ml	200 µl	10 µl
M154512	1000 ml	M154523	1000 ml	200 µl	10 µl
M154513	1000 ml	M154524	1000 ml	200 µl	10 µl
M154514	1000 ml	M154525	1000 ml	200 µl	10 µl
M154515	1000 ml	M154526	1000 ml	200 µl	10 µl
M154516	1000 ml	M154527	1000 ml	200 µl	10 µl
M154517	1000 ml	M154528	1000 ml	200 µl	10 µl
M154518	1000 ml	M154529	1000 ml	200 µl	10 µl
M154519	1000 ml	M154530	1000 ml	200 µl	10 µl
M154508	1000 ml	M154508	1000 ml	200 µl	10 µl

### 2.3 Analyse van *E. coli* en enterococci met kweek

Voor het bepalen van de concentratie kweekbare *E. coli* en enterococci in de samengestelde monsters zijn de standaard huisvoorschriften gebruikt (LMB-042 voor *E. coli* en LMB-044 voor enterococci). Vanuit elk samengesteld monster zijn porties van 100 µl (in 3-voud) uitgespateld op Lauryl Sulfaat (LSA) platen (*E. coli*) en Slanetz and Bartley medium met TTC (S&B platen: enterococci). Verdachte kolonies zijn vervolgens bevestigd met PCR (*E. coli*) of door kweek op Gal-esculine-azide-agar (GEAA) voor enterococci.

### 2.4 Meting van ATP

Voor het bepalen van de concentratie ATP is het standaard huisvoorschrift (LMB-002) gebruikt.

### 2.5 Meting van DNA-merkers voor mens-specifieke *Bacteroides* bacteriën

Voor het meten van de concentratie DNA-merkers van mens-specifieke *Bacteroides* bacteriën (Bernhard and Field 2000, Seurinck et al. 2005, Haugland et al. 2010, Shanks et al. 2010) is de methode gebruikt die in eerder BTO onderzoek is gebruikt: (Heijnen and Learbuch 2013, Heijnen 2015a). Met deze methode vindt, d.m.v. qPCR, kwantificatie plaats van een DNA-fragment dat specifiek voorkomt bij *Bacteroides* bacteriën die voorkomen in de darmen van mensen. Detectie van deze DNA-merker is een maat voor de aanwezigheid en concentratie van mens-specifieke fecale verontreinigingen.

### 2.6 NGS analyses

Bij de toegepaste NGS analyses is de DNA-sequentie (samenstelling en volgorde van de vier bouwstenen van DNA: A, C, G, T) van een deel (met een lengte van 250-500 "DNA-bouwstenen", bp) van het 16S rRNA gen bepaald met een Miseq sequencer van de firma Illumina.

#### 2.6.1 Illumina sequencing

Voor NGS analyses zijn er verschillende systemen met elk hun specifieke eigenschappen beschikbaar. Voor NGS analyse van 16S rRNA sequenties van bacteriële gemeenschappen wordt momenteel de MiSeq van de firma Illumina het meest toegepast. Dit systeem (figuur 2) is redelijk klein, gebruikersvriendelijk, de operationele kosten zijn beperkt en het is mogelijk om betrouwbare sequenties te genereren van fragmenten met een maximale lengte van ca. 500bp (baseparen).

Eerst wordt, op het DNA uit een monster, een PCR uitgevoerd waarbij een fragment van het 16S rRNA gen wordt geamplificeerd (16S-amplicon). Vervolgens wordt er op het 16S-amplicon een 2<sup>e</sup> PCR stap uitgevoerd waarmee de uiteinden van het fragment worden voorzien van specifieke "index sequenties". Hierbij wordt elk monster binnen één NGS experiment voorzien van een unieke "index sequentie" van 7 nucleotiden (DNA bouwstenen) lang.

FIGUUR 1: MISEQ VAN ILLUMINA



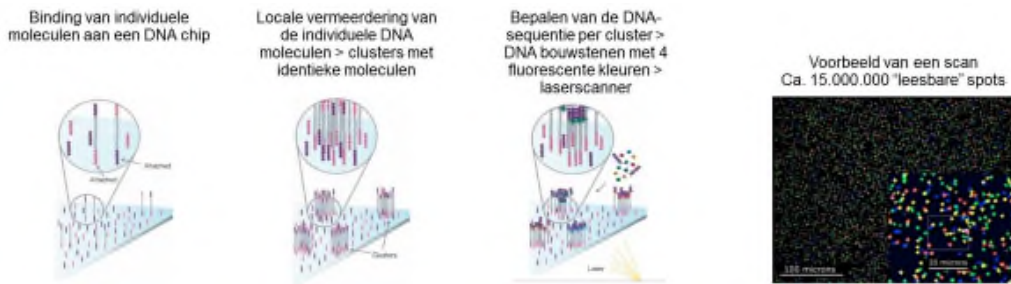
Na de 2<sup>e</sup> PCR (met index sequenties) worden amplicons van verschillende monsters in equimolaire hoeveelheden gemengd en dit mengsel wordt door de sequencer geanalyseerd. De sequence-reacties vinden plaats in een DNA chip (figuur 3). Deze DNA chip bevat een kanaaltje waar de reagentia doorheen gepompt worden. Tijdens deze analyse worden individuele moleculen uit het ampliconmengsel eerst gebonden aan de flowcell (figuur 2).

FIGUUR 2: DNA CHIP (FLOWCELL)



In het kanaaltje in de flowcell vindt binding van individuele DNA moleculen aan de vaste drager plaats (figuur 4). Aansluitend worden PCR-reagentia door de flowcell geleid. Deze reagentia zorgen lokaal voor vermeerdering van de individuele amplicon moleculen waardoor clusters met identieke DNA-moleculen ontstaan. Ten slotte vinden cyclische sequence reacties plaats waarbij tijdens elke cyclus een mengsel van nucleotiden wordt aangeboden waarbij elk nucleotide (A, C, G of T) een fluorescente kleurstof bevat met voor elk nucleotide een eigen kleur. Tijdens elke cyclus wordt, afhankelijk van de sequentie van het gebonden amplicon molecuul, een nucleotide ingebouwd waarbij de kleur van de fluorescente stof aangeeft welk nucleotide is ingebouwd (A, C, G of T). Aan het einde van elke cyclus wordt een foto gemaakt van de flowcell en kan bepaald worden welke fluorescente kleur (welk nucleotide) is ingebouwd op alle locaties (ca. 15.000.000 locaties). Op deze manier wordt, door dit cyclische proces maximaal 600X te herhalen, de sequentie van max. 600 nucleotiden van het amplicon bepaald.

FIGUUR 3: BASISPRINCIPE VAN NGS ANALYSES OP DE MISEQ

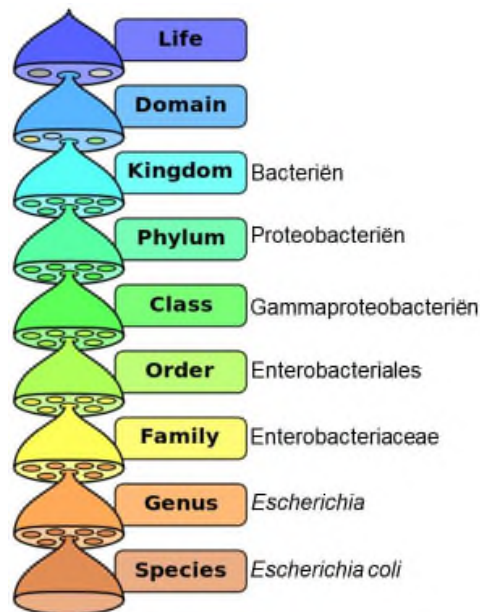


Na afloop van de sequence run bepaald de software in welke volgorde de nucleotiden op de verschillende locaties zijn ingebouwd en welke DNA sequenties er in de monsters aanwezig zijn. Tijdens dit proces wordt ook duidelijk welke index sequenties er aan de uiteinden van de individuele moleculen aanwezig zijn, deze informatie wordt vervolgens gebruikt om vast te stellen uit welk monster een sequentie afkomstig is.

### 2.6.2 16S rRNA sequencing

Bij de NGS analyses in dit onderzoek is 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) en de DNA sequenties van andere delen van dit gen varieert sterk tussen verschillende bacteriegroepen (variabele regio's). De DNA-sequentie van deze variabele regio's wordt gebruikt voor het identificeren (welke bacteriegroep?) van de aanwezige bacteriën. Door gebruik te maken van synthetische DNA-moleculen (primers), welke specifiek binden aan een geconserveerde regio, is het mogelijk om m.b.v. PCR een fragment te vermeerderen dat voorkomt bij alle bacteriesoorten. En, het gebruik van primers die binden aan een geconserveerde regio maar flankeren aan een variabele regio maakt het mogelijk om PCR-fragmenten te genereren die, tussen de primers, een variabel gebied bevatten. Met NGS is het vervolgens mogelijk om de DNA-sequentie te bepalen van een mengsel van een groot aantal (15.000.000 in één MiSeq run) individuele PCR-fragmenten (amplicons). De DNA-sequenties van de individuele PCR fragmenten wordt m.b.v. software, na het maken van een alignment, vergeleken met sequenties 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 4: TAXONOMISCHE INDELING VAN ORGANISMEN MET E. COLI ALS VOORBEELD



### 2.6.2.1 Genereren van 16S specifieke fragmenten

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 wordt gebruik gemaakt van synthetische DNA-moleculen (primers) waarbij de sequentie van deze primers bepaald welk deel van het 16S rRNA molecuul wordt vermenigvuldigd. Van alle, in de wetenschappelijke literatuur, beschreven primerparen is bekend dat deze primerparen niet perfect zijn. Met de algemeen gebruikte primerparen zal een zeer groot deel (over het algemeen meer dan 80%) van alle 16S sequenties worden geamplificeerd en gesequenced maar geen van de primerparen zal een perfect beeld geven van de samenstelling van de bacteriële gemeenschap, met de keuze van de primers ontstaat altijd enige bias in de resultaten. Daarom was het in dit onderzoek de bedoeling om de resultaten van drie verschillende primerparen met elkaar te vergelijken en is er gekozen voor het uitvoeren van analyses met drie verschillende (veel toegepaste) primerparen waarmee verschillende regio's van het 16S rRNA gen worden geamplificeerd:

- Primerpaar 515F-806R (Caporaso et al. 2012): met dit primerpaar wordt een fragment van de v4 regio het 16S rRNA gen gegenereerd met een lengte van ca. 291 bp.
- Primerpaar BSF784F-1064R (Claesson et al. 2010): met dit primerpaar wordt een fragment met een lengte van ca. 283 bp van de v6 regio van het 16S rRNA gen gegenereerd.
- Primerpaar 341F-805R (Herlemann et al. 2011): met dit primerpaar wordt een fragment van de v3 en v4 regio gegenereerd (lengte ca. 464 bp).

Alle toegepaste primers zijn verlengd met Illumina sequenties (adapters) waarmee binding aan de flowcell en de vorming van clusters 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 elk PCR fragment gecontroleerd d.m.v. agarosegel elektroforese. 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 moleculen uit het fragmentmengsel is bepaald door 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.

#### 2.6.2.2 Verwerking van NGS data

Er is sequentiedata gegenereerd met drie verschillende primerparen, het doel was om de resultaten welke worden verkregen met drie primerparen met elkaar te vergelijken zodat kan worden vastgesteld welk primerpaar het meest geschikt is voor detectie van fecale bacteriën. Dit project is uitgevoerd tijdens de opstartfase van de bij KWR nieuw aangeschafte Illumina sequencer. Vanwege enkele technische problemen en moeilijkheden met de verwerking van de gegenereerde data (rekencapaciteit van de computer en ontwikkeling van geschikte manieren om de resultaten te visualiseren) is analyse van alle data, binnen het voor dit project gereserveerde budget, niet mogelijk gebleken. Er is daarom gekozen om eerst alleen data gegenereerd met primerpaar 515F-806R te verwerken en te rapporteren, in een eventueel vervolgonderzoek is het mogelijk om ook de data van de andere primerparen te analyseren. Dit primerpaar wordt door veel verschillende onderzoeksgroepen gebruikt, o.a. ook voor het "Earth Microbiome project" (Gilbert et al. 2014) en [www.earthmicrobiome.org](http://www.earthmicrobiome.org) en lijkt zich te ontwikkelen tot een standaardmethode.

Voor de taxonomische identificatie kan gebruik gemaakt worden van verschillende referentie alignments en taxonomische indelingen (Cole et al. 2009, Quast et al. 2013, Yilmaz et al. 2014, DeSantis et al. 2006). Bij dit onderzoek is gebruik gemaakt van de referentie alignment en taxonomische indeling van Silva (Yilmaz et al. 2014). Bij de indeling volgens "Silva" worden bacteriën ingedeeld in negen taxonomische niveaus: Phylum, Klasse, Subklasse, Orde, Suborde, Familie, Genus en Species. Dit zijn, t.o.v. de taxonomische indeling zoals die is weergegeven in figuur 4, twee niveaus meer: Subklasse en Suborde. Doordat met de toegepaste aanpak slechts een deel van de DNA-sequentie van het 16S rRNA gen wordt bepaald is het niet mogelijk om alle 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).



## 3 Resultaten

### 3.1 Metingen van *E. coli*, enterococcen, ATP en DNA merkers voor mens specifieke *Bacteroides*

In het laboratorium zijn monsters samengesteld door Nieuwegeins drinkwater te mengen met een reeks van 10-voudige verdunningen van rioolwater-influent en -effluent. Om een globale indruk te krijgen van de mogelijkheid van verschillende technieken voor het detecteren van de kunstmatig aangebrachte verontreinigingen zijn verschillende analyses uitgevoerd:

- qPCR analyses: detectie van DNA merkers voor mens-specifieke *Bacteroides* bacteriën.
- Analyses met kweekmethoden: voor detectie van *E. coli* en enterococcen (indicatororganismen voor fecale verontreinigingen).
- ATP metingen: om een indruk te krijgen van de concentratie actieve biomassa in de monsters en de mogelijkheid voor het toepassen van ATP metingen voor het vaststellen van een "algemene" verstoring van de hoeveelheid biomassa t.g.v. de toevoeging van rioolwater.
- NGS analyse van het 16S rRNA gen: waarmee een vrijwel compleet beeld van de samenstelling van de bacteriële populatie wordt verkregen.

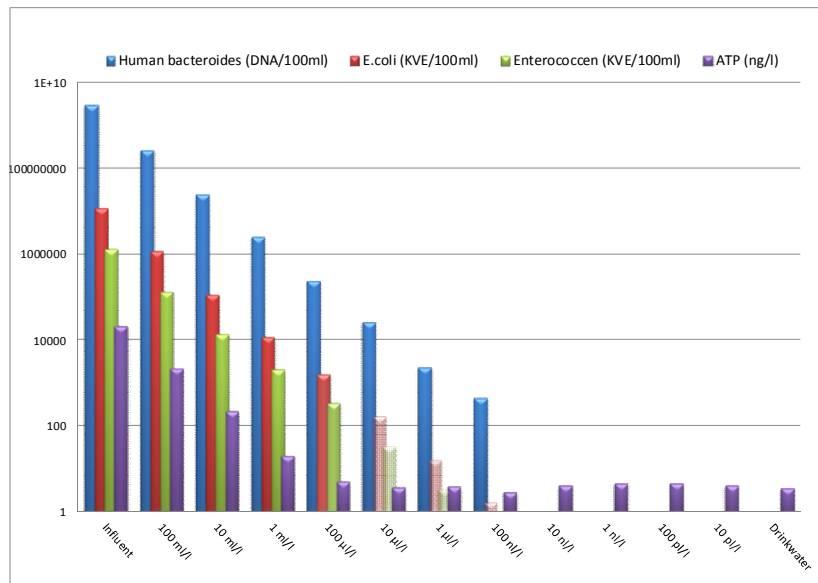
De analyses geven globaal aan of detectie van verontreinigen van drinkwater met rioolwater mogelijk is met deze technieken en tot welk besmettingsniveau de verschillende methoden in staat zijn tot het detecteren van de kunstmatig aangebrachte verontreinigingen. De resultaten van de metingen met mens-specifieke *Bacteroides* (qPCR), *E. coli* (kweek), enterococcen (kweek) en ATP van monsters samengesteld uit mengsels van drinkwater en rioolwater (influent en effluent) zijn samengevat in tabel 3 en grafisch weergegeven in figuur 5 (influent) en figuur 6 (effluent).

TABEL 3. CONCENTRATIES ATP, E.COLI, ENTEROCOCCEN EN DNA VAN HUMANE BACTEROIDES

Monster	Samenstelling	ATP	E. coli	Enterococcen	Humane Bacteroides
Nr.	volume rioolwater per liter drinkwater (% rioolwater)	(ng/l)	(KVE/100 ml)		(DNA kopiën/100 ml)
<b>Mengsels influent met drinkwater</b>					
M154533	Influent (100%)	21151	1,2E+07	1,4E+06	2,9E+09
M154509	100 ml/l (10%)	2178	1,2E+06	1,4E+05	2,7E+08
M154510	10 ml/l (1%)	218	1,2E+05	1,4E+04	2,4E+07
M154511	1 ml/l (0,1%)	20	1,2E+04	2,0E+03	2,5E+06
M154512	100 µl/l (0,01%)	5	1,5E+03	3,3E+02	2,4E+05
M154513	10 µl/l (0,001%)	3,7	1,7E+02	3,3E+01	2,6E+04
M154514	1 µl/l (0,0001%)	3,8	1,7E+01	3,3E+00	2,3E+03
M154515	100 nl/l (0,00001%)	2,8	1,7E+00	NA	4,4E+02
M154516	10 nl/l (0,000001%)	4,0	NA	NA	NA
M154517	1 nl/l (0,0000001%)	4,5	NA	NA	NA
M154518	100 pl/l (0,00000001%)	4,6	NA	NA	NA
M154519	10 pl/l (0,000000001%)	4,1	NA	NA	NA
M154508	Drinkwater (0%)	3,6	NA	NA	NA
<b>Mengsels effluent met drinkwater</b>					
m154534	Effluent (100%)	737	3,9E+04	1,0E+04	1,2E+07
m154520	100 ml/l (10%)	80	4,0E+03	1,0E+03	1,1E+06
m154521	10 ml/l (1%)	9,3	4,0E+02	3,3E+02	1,2E+05
m154522	1 ml/l (0,1%)	4,0	4,0E+01	3,2E+01	1,2E+04
m154523	100 µl/l (0,01%)	3,5	4,0E+00	3,3E+00	2,8E+01
m154524	10 µl/l (0,001%)	4,4	NA	NA	NA
m154525	1 µl/l (0,0001%)	2,7	NA	NA	NA
m154526	100 nl/l (0,00001%)	4,7	NA	NA	NA
m154527	10 nl/l (0,000001%)	4,1	NA	NA	NA
m154528	1 nl/l (0,0000001%)	4,2	NA	NA	NA
m154529	100 pl/l (0,00000001%)	4,7	NA	NA	NA
m154530	10 pl/l (0,000000001%)	4,4	NA	NA	NA
m154508	Drinkwater (0%)	3,6	NA	NA	NA

Concentratie Humane Bacteroides (qPCR), E. coli en enterococcen (kweek) en ATP in drinkwater gemengd met afnemende concentraties rioolwaterinfluent. Monsters waarin niets is aangetoond zijn weergegeven met NA. De waarden die cursief zijn weergegeven zijn niet het resultaat van metingen in het monster maar deze waarden zijn op basis van extrapolatie van meetwaarden uit het monster met een influent concentratie van 1 ml/l of een effluent concentratie van 100 ml/l.

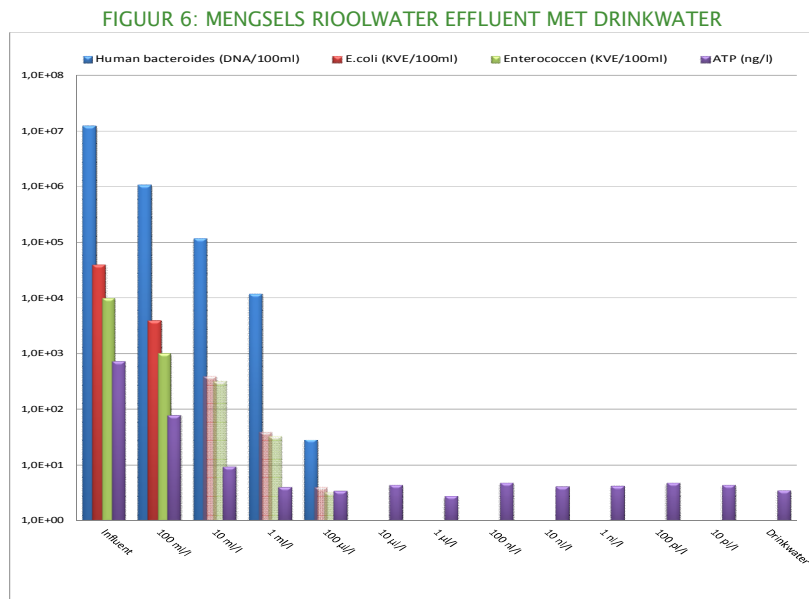
FIGUUR 5: MENGSELS RIOOLWATER INFLUENT MET DRINKWATER



*Concentratie Humane Bacteroides (qPCR), E. coli en enterococci (kweek) en ATP in drinkwater gemengd met afnemende concentraties rioolwaterinfluent. De meetwaarden zijn op een logaritmische schaal weergegeven en voor monsters waarin niets is aangetoond is de waarde 1 weergegeven. De waarden weergegeven door de transparante kolommen zijn niet het resultaat van metingen in die monsters maar deze meetwaarden zijn gebaseerd op extrapolatie van meetwaarden uit het monster met een influent concentratie van 1 ml/l.*

Bovenstaande metingen van mengsels van rioolwaterinfluent en drinkwater laten zien dat:

- Elke 10-voudige verdunningsstap van influent in drinkwater zorgt voor een duidelijke afname van de concentratie van de gemeten parameters met een factor 10 (bij benadering).
- Zoals verwacht, is de concentratie *E. coli* in influent hoger is dan de concentratie enterococci (ca. factor 10).
- Bij het analyseren van 100 ml water (zoals in de praktijk wordt toegepast) voor detectie van *E. coli* is, op basis van de gemeten concentraties, te verwachten dat het mogelijk is om een verontreiniging met een concentratie van minimaal 100 nl (=10<sup>-7</sup>l) influent per liter drinkwater te detecteren.
- Bij het meten van het DNA van humane Bacteroides met qPCR is het in dit experiment mogelijk om een verontreiniging met een concentratie van 100 nl influent per liter drinkwater te detecteren.
- Bij het analyseren van 100 ml water voor detectie van enterococci is, op basis van de gemeten concentraties, te verwachten dat het mogelijk is om een verontreiniging met een concentratie van minimaal 1 µl influent per liter drinkwater te detecteren.
- In dit experiment zorgt de toevoeging van 1 ml influent nog voor een verhoging van de basisconcentratie ATP die aanwezig is in drinkwater (van ca. 4 ng/l naar ca. 20 ng/l). Toevoeging van kleinere volumes heeft geen duidelijk waarneembaar effect op de concentratie ATP.



Concentratie Humane Bacteroides (qPCR), *E. coli* en enterococci (kweek) en ATP in drinkwater gemengd met afnemende concentraties rioolwatereffluent. De meetwaarden zijn op een logaritmische schaal weergegeven en voor monsters waarin niets is aangetoond is de waarde 1 weergegeven. De waarden weergegeven door de transparante kolommen zijn niet het resultaat van metingen in die monsters maar zijn gebaseerd op extrapolatie van meetwaarden uit het monster met een effluent concentratie van 100 ml/l.

Bovenstaande metingen van mengsels van rioolwatereffluent en drinkwater laten zien dat:

- Zoals verwacht, is de concentratie van alle gemeten parameters hoger in influent dan in effluent.
- Elke 10-voudige verdunningsstap van effluent in drinkwater zorgt voor een duidelijke afname van de concentratie van de gemeten parameters met een factor 10 (bij benadering).
- Bij het analyseren van 100 ml water voor detectie van *E. coli* is, op basis van de gemeten concentraties, te verwachten dat het mogelijk is om een verontreiniging met een concentratie van minimaal 100 µl (=10<sup>-4</sup>l) effluent per liter drinkwater te detecteren.
- Bij het meten van het DNA van humane Bacteroides met qPCR is het in dit experiment mogelijk om een verontreiniging met een concentratie van 100 µl effluent per liter drinkwater te detecteren.
- Bij het analyseren van 100 ml water voor detectie van enterococci is, op basis van de gemeten concentraties, te verwachten dat het mogelijk is om een verontreiniging met een concentratie van minimaal 1 ml effluent per liter drinkwater te detecteren.
- In dit experiment zorgt de toevoeging van 10 ml effluent voor een verhoging van de basisconcentratie ATP die aanwezig is in drinkwater (van ca. 4 ng/l naar ca. 9 ng/l), Toevoeging van kleinere volumes rioolwatereffluent heeft geen duidelijk waarneembaar effect op de concentratie ATP.

### 3.2 NGS analyses

Op DNA afkomstig van kunstmatig samengestelde watermonsters van mengsels van drinkwater en rioolwater zijn analyses met NGS uitgevoerd waarbij sequenties van het 16S rRNA gen zijn bepaald en taxonomisch geïdentificeerd. Deze analyses geven een vrijwel compleet beeld van de samenstelling van een, in een watermonster, aanwezige bacteriële

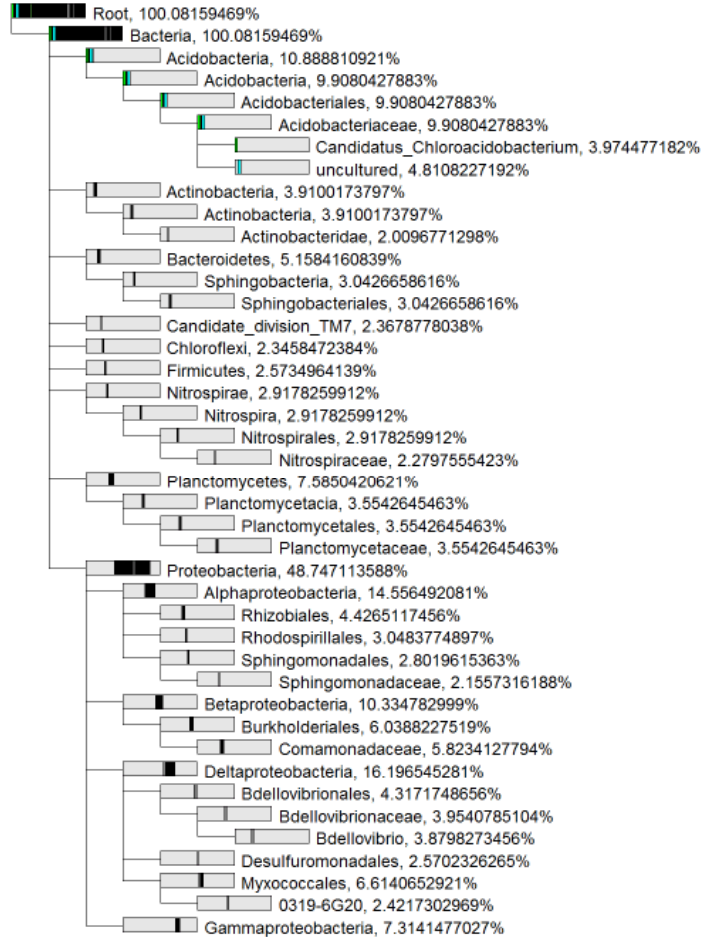
populatie. De informatie over de samenstelling van de bacteriologische populaties in deze monsters geeft aan:

- Of het mogelijk is om met NGS analyses bacteriegroepen te identificeren die specifiek voorkomen in rioolwater (“rioolwater bacteriën”).
- In hoeverre lage concentraties van deze “rioolwater bacteriën” te detecteren zijn in kunstmatig besmet drinkwater.

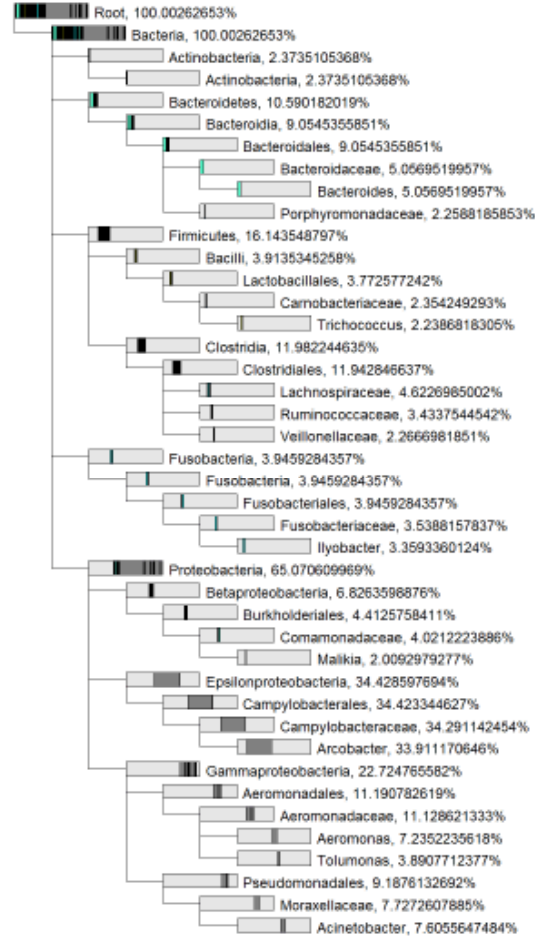
Een samenvatting van de resultaten van NGS analyses, uitgevoerd op drinkwater, rioolwater-influent en -effluent, is geïllustreerd in de taxonomische bomen in figuur 7. Vanwege de aanwezigheid van een groot aantal bacteriegroepen, die slechts een klein deel vormen van de gehele populatie, is het niet goed mogelijk om alle aanwezige bacteriegroepen in één overzichtelijke figuur weer te geven. Daarom is ervoor gekozen om in deze figuren alleen de dominante bacteriegroepen die minimaal 2% van de gehele populatie uitmaken weer te geven.

FIGUUR 7: DOMINANTE BACTERIEGROEPEN IN DRINK- EN RIOOLWATER

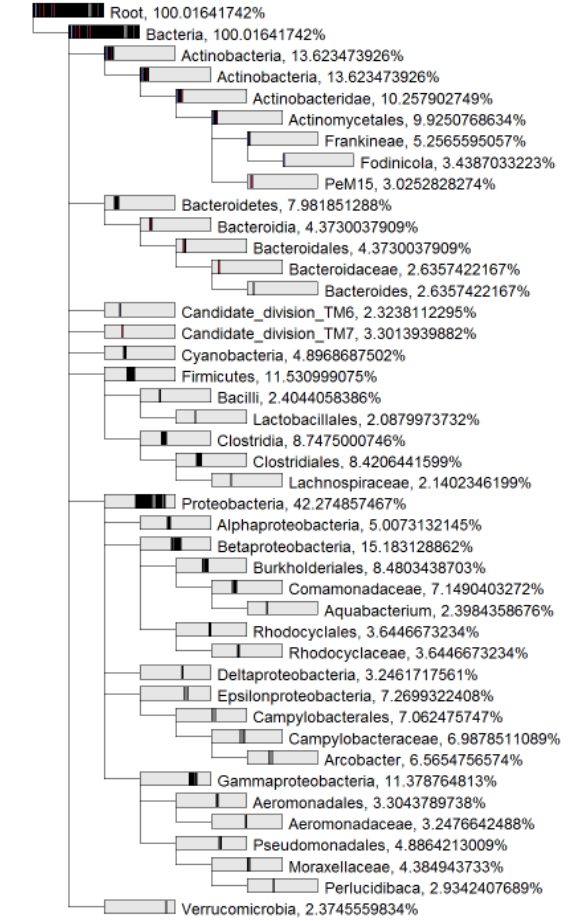
Drinkwater



Rioolinfluent



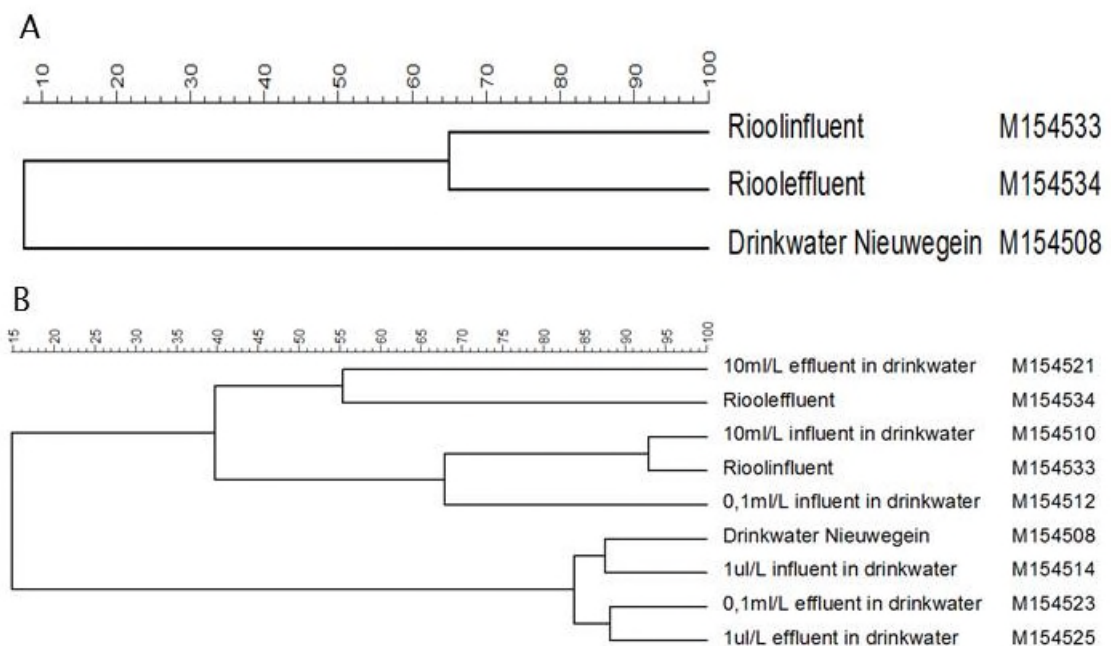
Riooeffluent





Een globale vergelijking van de populaties maakt duidelijk dat, zoals verwacht, de dominante bacteriegroepen die aanwezig zijn in drinkwater sterk afwijken van de dominante bacteriegroepen in rioolwaterinluent en -effluent. De vergelijking tussen deze bacteriële populaties is ook samengevat in een dendrogram (figuur 8 A). De dendrogram geeft de mate van verwantschap tussen populaties weer en maakt duidelijk dat de samenstelling van de bacteriële populatie in drinkwater sterk afwijkt van de populatie in rioolwater en dat het verschil tussen rioolwatereffluent en rioolwaterinluent minder groot is.

FIGUUR 8: DENDROGRAMMEN WAARMEE DE VERWANTSCHAP TUSSEN BACTERIËLE POPULATIES WORDT WEEGEGEVEN



*Dendrogrammen van de vergelijking van: bacteriële populaties in drinkwater, rioolwaterinluent en -effluent (A). En mengsels van drinkwater met rioolwaterinluent en -effluent (B).*

Bij het kunstmatig besmetten van drinkwater met verschillende volumes rioolwater verandert, door toevoeging van de bacteriën uit rioolwater, de samenstelling van de bacteriële gemeenschap van het drinkwater. Figuur 8B laat de dendrogram zien waarmee het effect van het mengen van verschillende volumes rioolwater op de samenstelling van de bacteriële flora van het, met rioolwater besmette, drinkwater wordt zichtbaar gemaakt. De figuur maakt duidelijk dat toevoeging van een volume van 10 ml influent aan 1l drinkwater zorgt voor een bacteriële populatie die het meest lijkt op de populatie die aanwezig is in rioolwaterinluent. Bij toevoeging van een volume van 0,1 ml/l influent wijkt de verkregen populatie nog steeds sterk af van de drinkwaterpopulatie en lijkt meer op influent dan op drinkwater. Na toevoeging van 1 µl influent lijkt de verkregen populatie meer op drinkwater dan op rioolwaterinluent. In de samengestelde mengsels van rioolwatereffluent met drinkwater is duidelijk dat een concentratie van 10 ml/l effluent zorgt voor een populatie die het meest lijkt op de populatie die aanwezig is in effluent maar toevoeging van een volume van 0,1 ml effluent zorgt voor een populatie die meer overeenkomst vertoont met drinkwater dan met rioolwatereffluent.

### 3.2.1 Detectie van rioolbacteriën in drinkwater

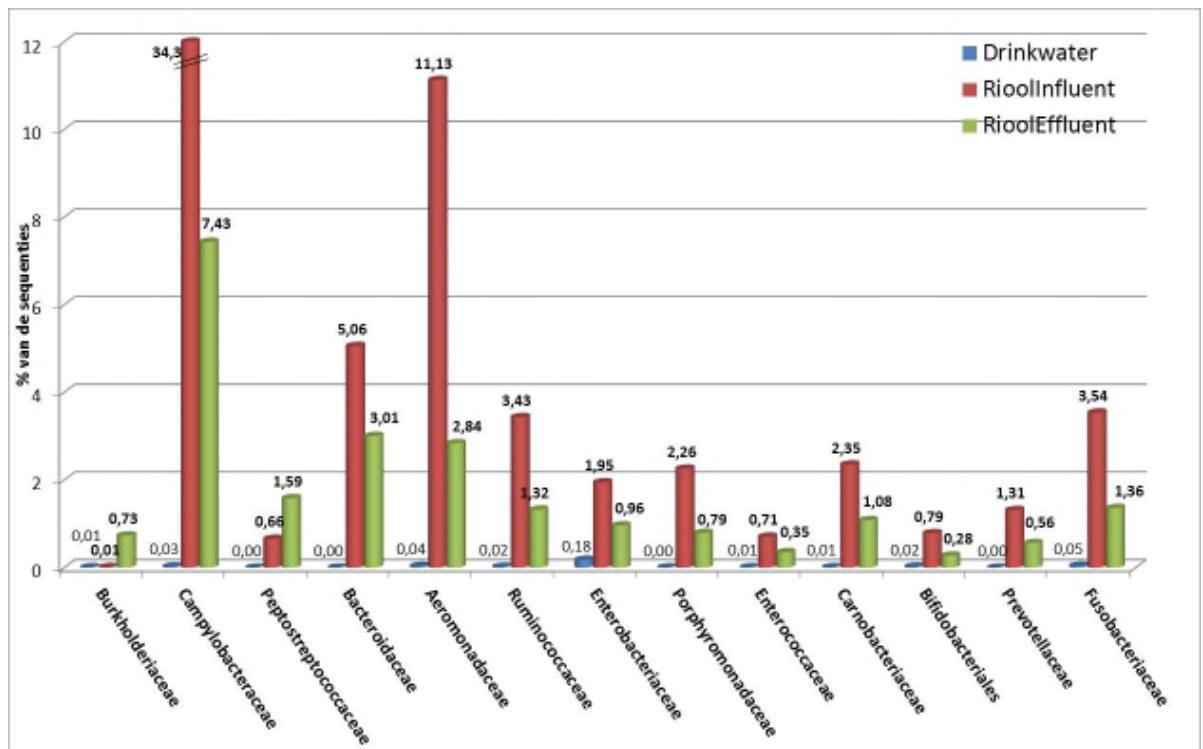
Om een indruk te krijgen van de mogelijkheid om NGS te gebruiken voor het detecteren van verontreinigingen van rioolwater in drinkwater zijn de verkregen datasets (van mengsels van

rioolwater-influent en -effluent) in meer detail onderzocht. Eerst is gezocht naar DNA-sequenties van bacteriën die in hoge concentraties aanwezig zijn in rioolwater en niet, of in lage concentraties, aanwezig zijn in drinkwater (“rioolwater bacteriën”). Vervolgens is onderzocht in hoeverre het DNA van deze “rioolwater bacteriën” detecteerbaar is in mengsels van drinkwater met verschillende concentraties rioolwater.

### 3.2.1.1 Rioolwater bacteriën

In de NGS datasets van drinkwater, rioolwater-influent en -effluent is gezocht naar DNA-sequenties van “rioolwater bacteriën”. Met “rioolwater bacteriën” worden in dit onderzoek bacteriën bedoeld die dominant voorkomen in rioolwater en (vrijwel) niet in drinkwater. Hierbij is geselecteerd voor bacteriën die minder dan 0,05% van de gehele populatie uitmaken in drinkwater en in rioolwater- influent of -effluent meer dan 0,5% van de gehele populatie uitmaken. Deze groepen van “rioolwater bacteriën” zijn op verschillende taxonomische niveaus geïdentificeerd en weergegeven in figuur 9 (orde niveau), figuur 10 (suborde niveau) en figuur 11 (familie niveau).

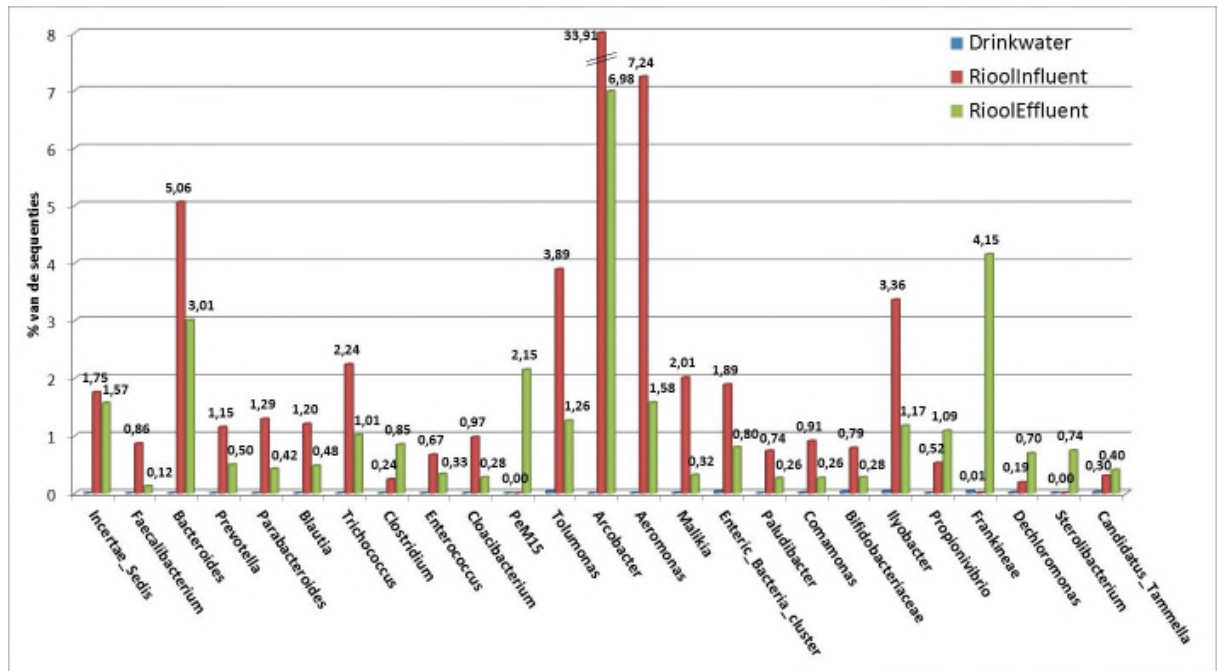
FIGUUR 9. RIOOLWATER BACTERIËN: ORDE NIVEAU



Op het niveau van “orde” worden diverse ordes geïdentificeerd die (vrijwel) niet voorkomen in drinkwater en dominant voorkomen in rioolwater-influent en -effluent. Van een deel van deze ordes is bekend dat daartoe bacteriën behoren die dominant voorkomen in fecaal materiaal zoals:

- Campylobacteraceae: deze orde is het meest dominant in influent (34,3% van de sequenties) en effluent (7,43%), tot deze orde behoren o.a. Arcobacter en Campylobacter.
- Bacteroidaceae: de Bacteroides bacteriën zijn ingedeeld in deze orde. Van Bacteroides bacteriën is bekend dat deze in hoge concentraties in de darmen van warmbloedige dieren voorkomen.
- Enterobacteriaceae: hiertoe behoren de “bacterien van de coligroep” (coliformen) en *E. coli*.
- Enterococcaceae: Enterococcus maakt onderdeel uit van deze orde.
- Bifidobacteriales, Prevotellaceae en Fusobacteriaceae: bacteriën die tot deze ordes behoren komen eveneens algemeen voor in feces van warmbloedige dieren.

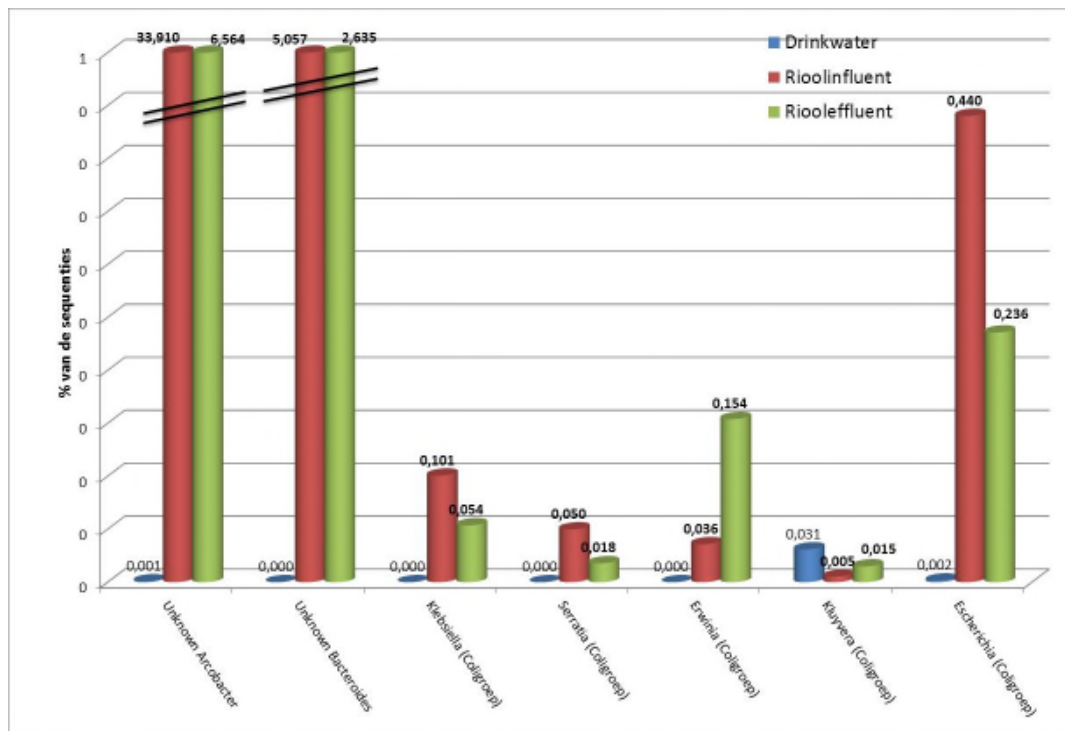
FIGUUR 10. SEQUENTIES VAN RIOOLWATER BACTERIËN: SUBORDE NIVEAU



Bij het identificeren van “rioolwater bacteriën” op suborde niveau wordt een groot aantal subordes geïdentificeerd waarvan bekend is dat deze groepen in hoge concentraties in feces voorkomen zoals Faecalibacterium, Bacteroides, Prevotella, Blautia, Clostridium, Enterococcus, Cloacibacterium, Acrobacter, “Enteric-Bacteria\_Cluster” (“Coligroep”) en Bifidobacteriaceae. Van een aantal van deze subordes worden in drinkwater geen DNA-sequenties aangetoond en van een ander deel van de subordes worden lage percentages DNA-sequenties in drinkwater aangetoond. Een aantal van deze subordes is meer dominant in effluent dan in influent (Frankineae en PeM15), mogelijk dat bacteriën van deze ordes zich in de RWZI vermeerderen.

Vervolgens is op familie niveau specifiek gekeken naar dominante bacteriën waarvan bekend is dat deze dominant kunnen zijn in fecaal materiaal (Arcobacter, Bacteroides) en bacteriën die, bij het gebruik van kweekmethoden, vooral worden ingedeeld in de groep van Enteric\_Bacteria\_Cluster (“Coligroep”) zoals Klebsiella, Serratia, Erwinia, Kluyvera en Escherichia. De resultaten van de analyses op familie niveau zijn samengevat in figuur 11.

FIGUUR 11 RIOOLWATER BACTERIËN: FAMILIE NIVEAU



DNA sequenties van de (nog onbekende) bacteriefamilies behorende tot de suborde van Arcobacter en Bacteroides zijn zeer dominant in influent en effluent en worden niet aangetoond in drinkwater. De bacteriefamilies welke behoren tot de suborde van "Enteric\_bacteria" worden vooral aangetoond in het influent en effluent (*Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*) en niet in drinkwater. Sequenties van de families *Kluyvera* en *Escherichia* worden ook aangetoond in drinkwater. Mogelijk zijn de gedetecteerde *Escherichia* sequenties afkomstig van *Escherichia coli*. Maar, vanwege de beperkte lengte van het PCR fragment waarop de NGS analyse is uitgevoerd, is het niet mogelijk om deze *Escherichia* sequentie tot op genus niveau te identificeren.

### 3.2.1.2 Mengsels van drinkwater met rioolwater

In de NGS datasets van mengsels van rioolwater met drinkwater zijn de "rioolwater bacteriën" gericht onderzocht. De analyse is uitgevoerd op het taxonomisch niveau van "suborde", "orde" en familie en de analyses zijn gericht op de dominante rioolwater bacteriën welke niet in drinkwater zijn aangetoond (Bacteroidaceae en Prevotellaceae) en de ordes waartoe de indicatororganismen *E. coli* en enterococci behoren (Enterobacteroidaceae en Enterococcaceae). Als voorbeeld is hier de aanwezigheid van de bacteriegroep van de suborde van Bacteroides in mengsels van drinkwater met rioolwaterinfluent in meer detail onderzocht. Het is bekend dat hoge concentraties van deze bacteriegroep in fecaal materiaal van verschillende diergroepen voorkomen en er was dan ook te verwachten dat de concentratie in rioolwater hoog zal zijn. DNA merkers van bacteriën die behoren tot de suborde van Bacteroides worden gebruikt voor het onderscheiden van fecaal materiaal van verschillende bronnen ("source tracking", "bronopsporing") (Heijnen and Learbuch 2013, Heijnen 2015b, Heijnen et al. 2014). In tabel 4 is het totaal aantal verkregen DNA-sequenties per monster weergegeven en het aantal sequenties dat binnen deze datasets behoort tot de suborde van Bacteroides. De NGS analyses geven de mogelijkheid om informatie te verzamelen over het percentage sequenties dat behoort tot een bepaalde bacteriegroep in relatie de gehele populatie ("welk deel van de populatie behoort tot de orde van Bacteroides bacteriën?"). Deze resultaten laten zien dat sequenties van Bacteroides bacteriën niet worden aangetoond in drinkwater en dat deze sequenties dominant zijn in rioolwatereffluent (5,06%).

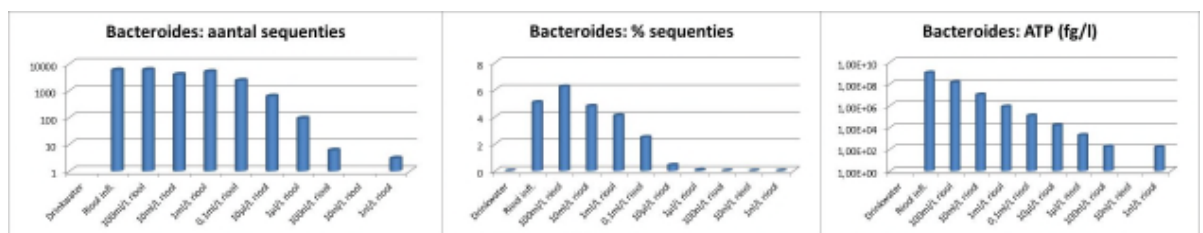
Naarmate rioolwater verder verdund wordt in drinkwater wordt ook het percentage *Bacteroides* sequenties dat is aangetroffen lager.

Met NGS wordt niet direct kwantitatieve informatie gegenereerd over de concentratie bacteriën van elke bacteriegroep in de monsters. Om een grove indicatie te krijgen van de concentratie *Bacteroides* bacteriën in de monsters is de concentratie ATP gebruikt. De concentratie ATP is een maat voor de totale *actieve* biomassa. Hoe lager de concentratie ATP, des te minder *actieve* bacteriën in het monster. ATP is hier gebruikt als indicator voor de totale concentratie bacteriën in de monsters. Het percentage sequenties is gebruikt om te berekenen welke concentratie ATP afkomstig is van bacteriën die behoren tot de suborde van *Bacteroides*. Het resultaat van deze berekeningen is samengevat in tabel 4 en weergegeven in figuur 12.

TABEL 4: BACTEROIDES SEQUENTIES IN MENGSELS VAN DRINKWATER EN RIOOLWATERINFLUENT

Monster	Totaal aantal sequenties	Conc. ATP ng/l	Suborde: <i>Bacteroides</i>		
			Aantal sequenties	% v/d sequenties	"Conc. ATP" (fg/l)
Drinkwater Nieuwegein	122656	4	0	0,000	0,00E+00
Riool influent	114222	21151	5776	5,057	1,1E+09
100ml/L infl.	95285	2178	5920	6,213	1,4E+08
10ml/L infl.	82298	218	3933	4,779	1,0E+07
1ml/L infl.	122605	20	5011	4,087	8,2E+05
0,1ml/L infl.	94871	5	2351	2,478	1,2E+05
10µl/L infl.	143638	4	614	0,428	1,6E+04
1µl/L infl.	175546	4	92	0,052	2,0E+03
100nl/L infl.	96244	3	6	0,006	1,8E+02
10nl/L infl.	109762	4	0	0,000	0,0E+00
1nl/L infl.	86646	5	3	0,004	1,6E+02
10pl/L infl.	90678	4	1	0,001	4,5E+01

FIGUUR 12: HET TOTAAL AANTAL SEQUENTIES, HET PERCENTAGE VAN DE SEQUENTIES EN DE HOEVEELHEID ATP BEHOREND TOT DE SUBORDE VAN BACTEROIDES BACTERIËN



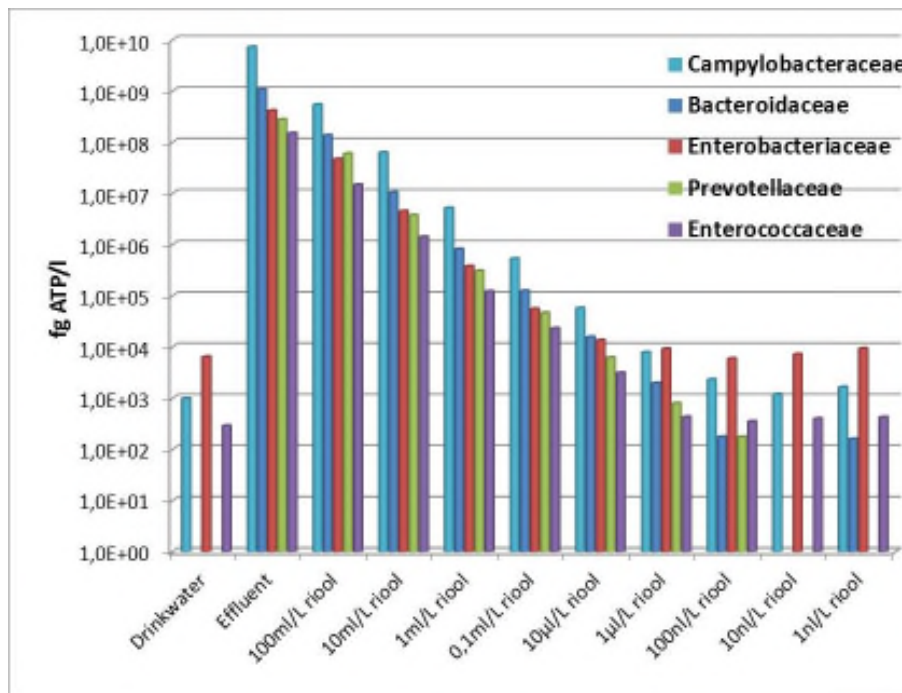
Bij het gebruik van ATP als maat voor het totaal aantal bacteriën wordt duidelijk dat de (10-voudige) verdunningsreeks van het rioolwater, welke is gebruikt voor het "besmetten" van het drinkwater, ook resulteert in een 10-voudige afname van de hoeveelheid "aan *Bacteroides* gekoppeld ATP" bij elke verdunningsstap. De analyses laten ook zien dat een besmetting van 100 nanoliter rioolwater in een volume van 1 liter drinkwater zorgt voor een detecteerbare hoeveelheid *Bacteroides* sequenties in de NGS dataset. Het is daarbij wel opvallend dat ook in het monster met een influentconcentratie van slechts 1 nl/l ook *Bacteroides* sequenties worden gedetecteerd. Het is onduidelijk of detectie van *Bacteroides* sequenties in het monster met een influentconcentratie van 1 nl/l het gevolg is van de aanwezigheid van lage concentraties van deze bacteriën in deze monsters of dat het aantonen van deze sequenties het gevolg is van contaminaties tijdens de labwerkzaamheden of het optreden van sequentie- of analysefouten.

Vervolgens zijn vergelijkbare analyses op het taxonomisch niveau van “orde” uitgevoerd voor:

- De meest dominante orde in het influent: Campylobacteraceae.
- De bacterieordes die dominant aanwezig zijn in influent en niet worden aangetoond in drinkwater: Bacteroidaceae en Prevotellaceae.
- De ordes waartoe de huidige indicatororganismen behoren: Enterobacteriaceae (*E. coli*) en Enterococcaceae (Enterococcen).

Het resultaat van deze analyses is weergegeven in bijlage I en samengevat in figuur 13.

FIGUUR 13. DETECTIE VAN “INFLUENT BACTERIËN” IN KUNSTMATIG BESMET DRINKWATER: ORDE NIVEAU



De analyses op het niveau van “orde” laten zien dat:

- Elke 10-voudige verdunningsstap (in de range van 100 ml/l tot 100 nl/l) van influent in drinkwater zorgt voor een 10-voudige afname van de concentratie ATP van de geselecteerde bacterie-ordes.
- Een besmetting van 1 liter drinkwater met een volume van 100 nanoliter rioolwaterinfluent zorgt voor een verhoogde concentratie van de meest dominante “rioolwater bacterie” orde (Campylobacteraceae) en een detecteerbare concentratie DNA van de ordes Bacteroidaceae en Prevotellaceae.
- Het is ook hier opvallend dat Bacteroidaceae ook worden aangetoond in het monster met een rioolwaterconcentratie van slechts 1 nl/l maar niet in het monster met een concentratie van 10 nl/l. De concentraties van DNA sequenties van bacteriën behorende tot deze ordes zijn in deze monsters zeer laag en zijn het resultaat van detectie van slechts één of twee DNA-sequenties in een dataset van gemiddeld ca. 111.000 sequenties per monster.
- De concentratie DNA-sequenties behorende tot de ordes van Enterobacteriaceae (waaronder bacteriën van de coligroep en *E. coli*), Enterococcaceae (waaronder enterococcen) en Campylobacteraceae zijn, zoals verwacht, hoog in rioolwater influent. Na verdunning van influent in het drinkwater verdunt de concentratie van sequenties van deze ordes tot een basisniveau in drinkwater en in monsters met een lage concentratie (<10 µl/l) influent.

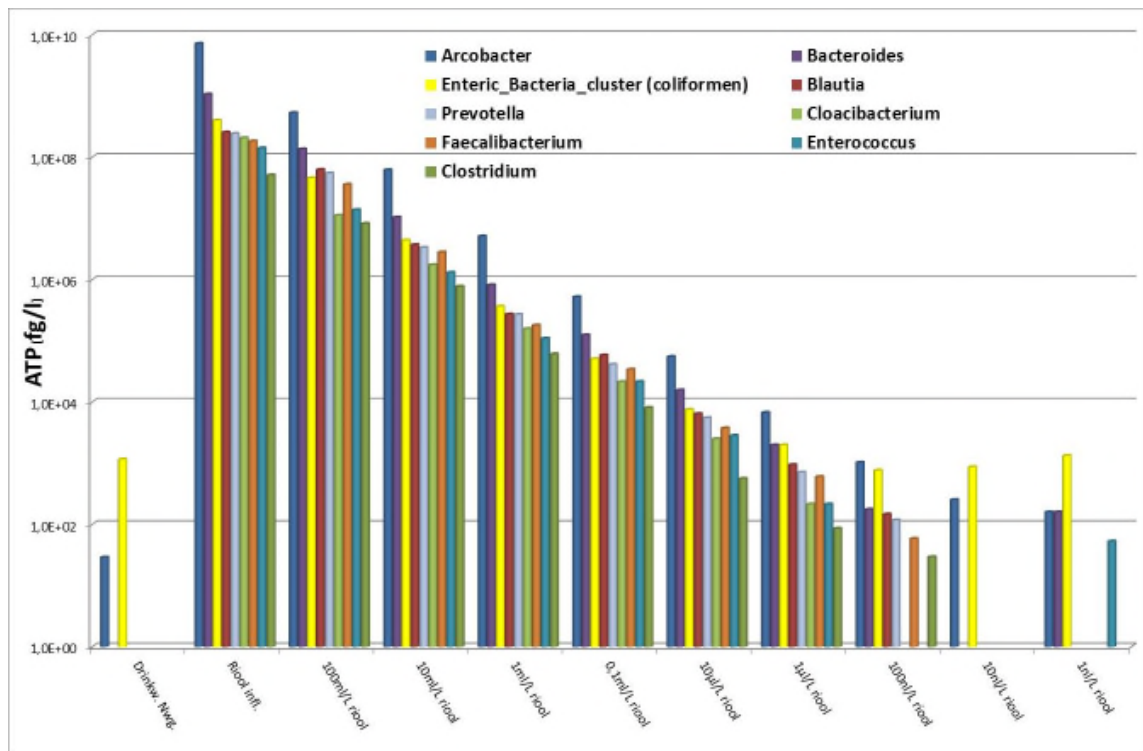
Vervolgens is in deze kunstmatige mengmonsters op het niveau van *suborde* gekeken naar de concentraties “rioolwater bacteriën” waarbij een selectie is gemaakt van:



- De meest dominante bacterieorde in rioolwaterinfluent: Arcobacter (behorend tot de orde van Campylobacteraceae)
- Dominante bacteriën waarvan geen DNA in drinkwater wordt aangetoond: Bacteroides, Blautia, Cloacibacterium, Prevotella, Faecalibacterium en Clostridium.
- Bacteriën behorende tot "Enteric\_Bacteria\_Cluster" ("Coligroep").
- Bacteriën behorende tot de suborde van Enterococcus (enterococcen).

De resultaten van deze analyse zijn samengevat in bijlage II en samengevat in figuur 14

FIGUUR 14. DETECTIE VAN "INFLUENT BACTERIËN" IN KUNSTMATIG BESMET DRINKWATER: SUBORDE NIVEAU



Analyses op het niveau van "suborde" laten de volgende resultaten zien:

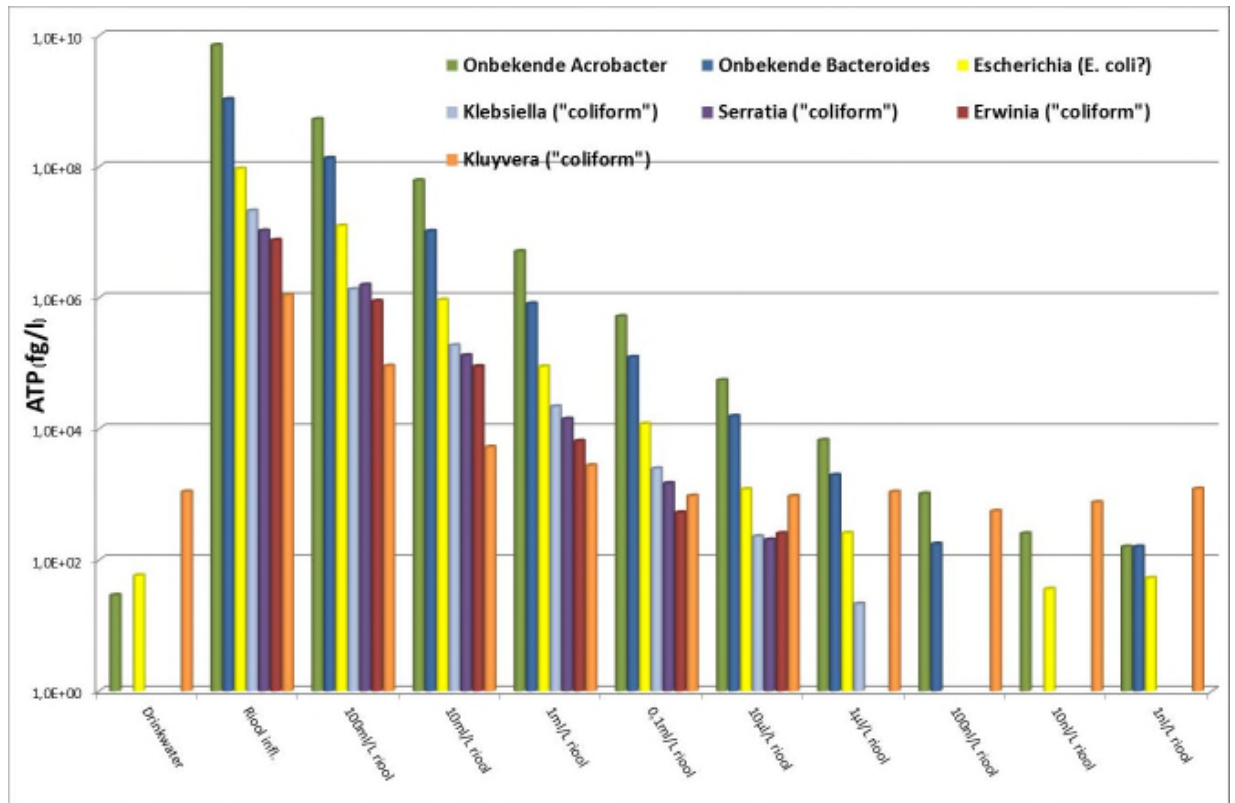
- De (10-voudige) verdunningsstappen van het influent zorgen voor een 10-voudige afname van de concentratie van de geselecteerde subordes.
- Besmetting van 1 liter drinkwater met 100 nanoliter rioolwater zorgt voor een detecteerbare hoeveelheid sequenties van de "rioolwater bacterie" ordes (Bacteroides, Prevotella, Faecalibacterium en Clostridium) en een verhoging van de concentratie Arcobacter.
- Een deel van deze dominante ordes wordt ook aangetoond in de monsters met een lagere rioolwaterconcentratie van 1 nl/l. Het is niet duidelijk wat hiervan de oorzaak is (contaminatie?, fouten tijdens sequentie analyse?)
- DNA sequenties van de ordes van "Enteric\_Bacteria\_Cluster" en Arcobacter worden ook aangetoond in onbesmet drinkwater.

Vervolgens is op *familieniveau* de concentratie "rioolwater bacteriën" onderzocht in mengsels van rioolwaterinfluent en drinkwater waarbij geselecteerd is voor families behorende tot de subordes van

- Bacteroides
- Enteric\_Bacteria\_Cluster (coligroep): Escherichia, Klebsiella, Serratia, Erwinia en Kluyvera.

De concentraties van deze bacteriefamilies in de mengmonsters zijn weergegeven in bijlage III en samengevat in figuur 15.

FIGUUR 15: DETECTIE VAN "INFLUENT BACTERIËN" IN KUNSTMATIG BESMET DRINKWATER: FAMILIE NIVEAU



Analyses op het niveau van "familie" laten de volgende resultaten zien:

- Het DNA van de familie "Unclassified Bacteroides" is nog detecteerbaar tot een besmettingsniveau van ca. 100 nl rioolwaterinluent per liter drinkwater.
- Bacteriefamilies met een lagere concentratie in het influent, zoals Escherichia en Klebsiella, zijn nog detecteerbaar tot een besmettingsniveau van 1 µl influent in 1 l drinkwater.
- Van de families Kluyvera en Escherichia lijkt er een basisniveau DNA aanwezig in drinkwater. Waarschijnlijk is het DNA van deze bacteriefamilies ook verantwoordelijk voor de basisvervuiling van de suborde "Enteric\_Bacteria\_Cluster".

#### **Samenvattende conclusies: mengsels influent/drinkwater**

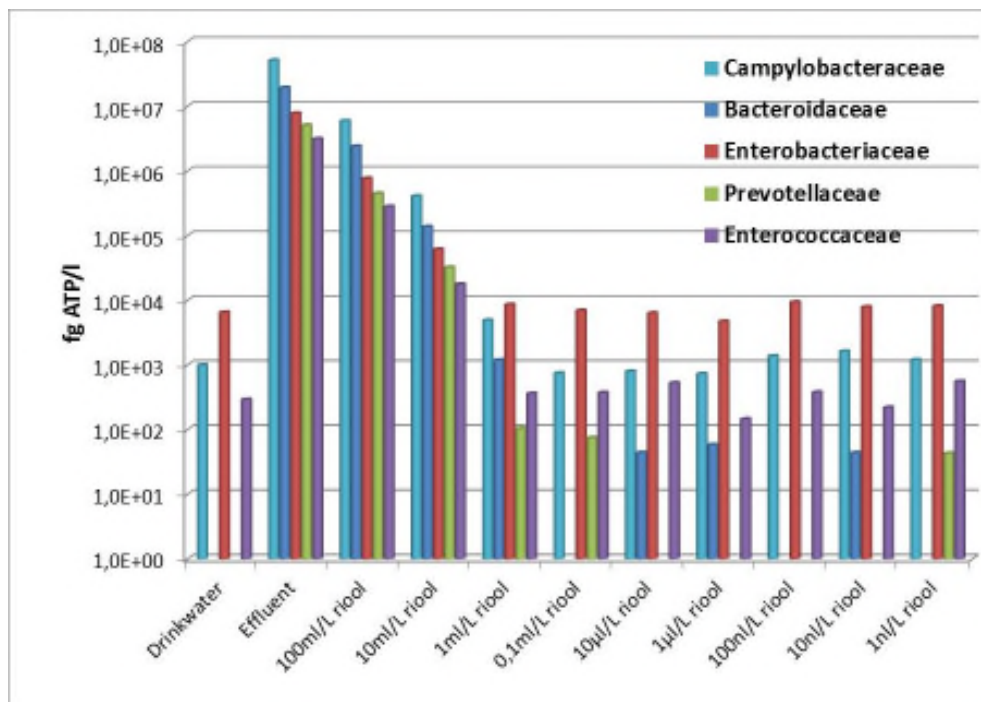
- De reeks van 10-voudige verdunningen van rioolwaterinluent in drinkwater resulteert, bij analyse met NGS, in een 10-voudige afname van de concentratie van verschillende DNA-sequenties van "rioolwater bacteriën" in de monsters.
- De aanwezigheid van een besmetting met rioolwater kan met NGS zichtbaar gemaakt worden door detectie van verschillende bacteriegroepen in één analyse.
- DNA-sequenties van dominante rioolwater bacteriegroepen detecteerbaar tot een besmettingsniveau van 100 nanoliter rioolwater per liter drinkwater (verdunning van 1 op 10 miljoen)
  - o Dit is vergelijkbaar met de detectiegrens van de kweek voor *E. coli* (bij analyse van 100 ml) en de qPCR voor detectie van humaan specifieke *Bacteroides* bacteriën.
  - o In een aantal monsters worden ook nog lage concentraties "rioolwater bacteriegroepen" gedetecteerd bij lagere concentraties rioolwaterinluent, het aantal sequenties is in die gevallen zeer laag. Het is onduidelijk of dit

het gevolg is van: contaminaties tijdens laboratoriumwerkzaamheden;  
introductie van fouten tijdens de NGS analyse of de introductie van fouten  
tijdens de taxonomische classificatie.

### 3.2.1.3 Mengsels van drinkwater met rioolwatereffluent

Voor de analyse van mengsels van effluent met drinkwater is op de taxonomische niveaus van orde, suborde en familie de concentratie “rioolwater bacteriën” (3.2.1.1) onderzocht in de samengestelde mengsels. De resultaten van deze analyses zijn weergegeven in bijlage IV, V en VI en samengevat in figuur 16 (orde), 17 (suborde) en 18 (familie).

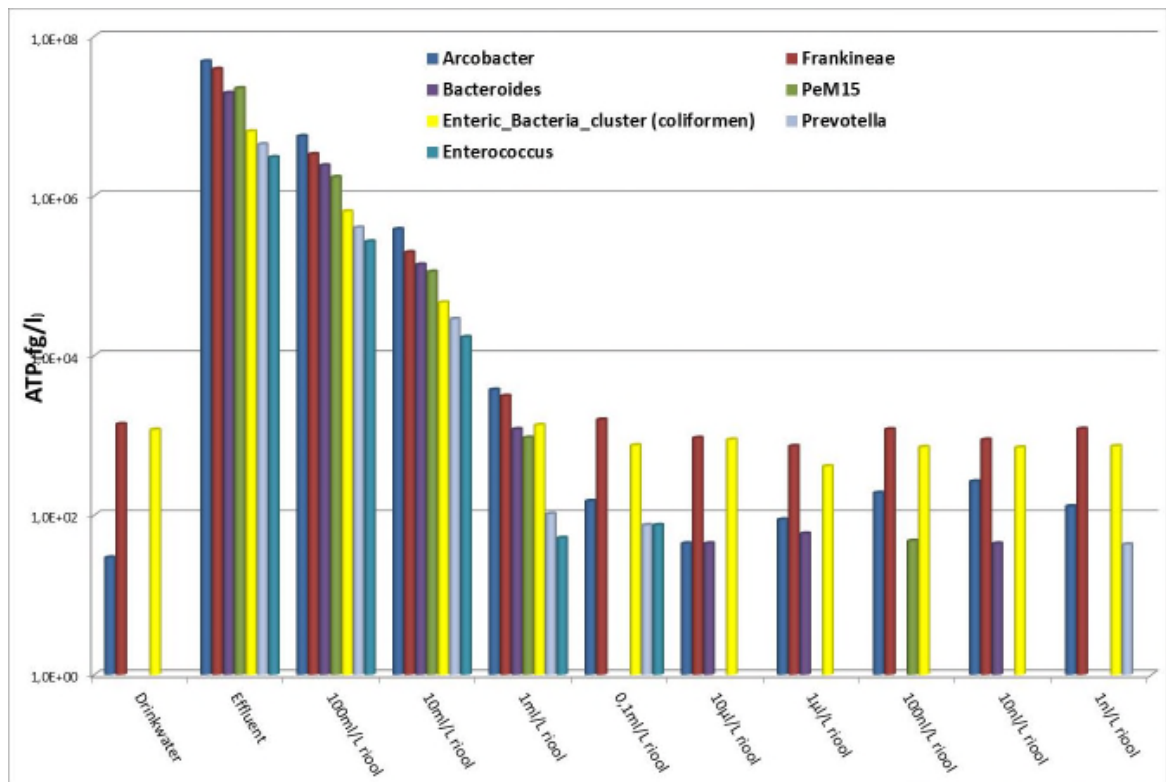
FIGUUR 16: DETECTIE VAN DOMINANTE “EFFLUENT BACTERIËN” IN KUNSTMATIG BESMET DRINKWATER: ORDE NIVEAU



De analyses op het niveau van “orde” laten zien dat:

- Elke 10-voudige verdunningsstap (in de range van 100 ml/l tot 1 ml/l) van effluent in drinkwater zorgt voor een 10-voudige afname van de concentratie ATP van de geselecteerde bacterie-orde.
- Een besmetting van 1 liter drinkwater met een volume van 0,1 ml rioolwatereffluent zorgt voor een verhoogde concentratie van de “rioolwater bacterieordes” Campylobacteraceae en Prevotellaceae maar niet van de orde van Bacteroidaceae.

FIGUUR 17: DETECTIE VAN DOMINANTE “EFFLUENT BACTERIËN” IN KUNSTMATIG BESMET DRINKWATER: SUBORDE NIVEAU



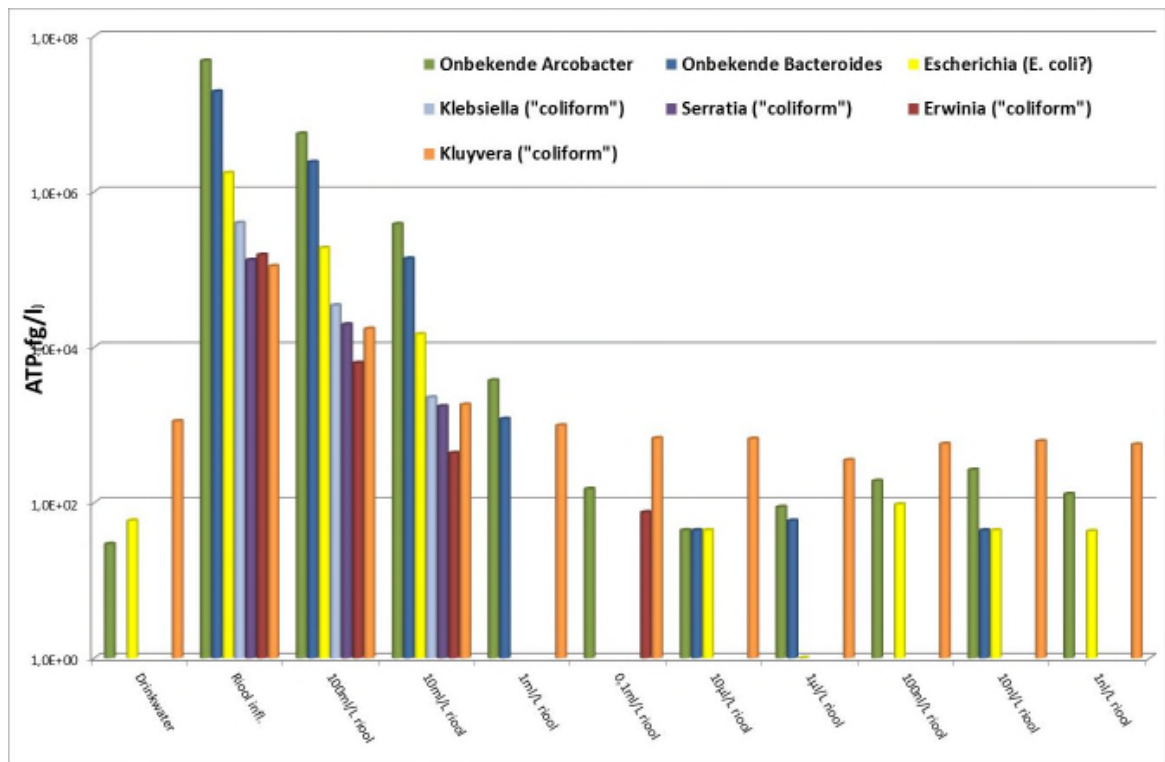
Analyses op het niveau van “sub orde” laten de volgende resultaten zien:

- De (10-voudige) verdunningsstappen van het effluent zorgen voor een 10-voudige afname van de concentratie van de geselecteerde bacteriegroepen (subordes).
- Besmetting van 1 liter drinkwater met 0,1 ml rioolwater-effluent zorgt voor een detecteerbare hoeveelheid sequenties van de “rioolwater bacterie-orde” Arcobacter, Enterococcus en Prevotella.

Vervolgens is op familieniveau de concentratie “rioolwater bacteriën” onderzocht in mengsels van rioolwater-effluent en drinkwater waarbij geselecteerd is voor families behorende tot de subordes van

- Bacteroides
- Enteric\_Bacteria\_Cluster (Coligroep): Escherichia, Klebsiella, Serratia, Erwinia en Kluyvera.

FIGUUR 18: DETECTIE VAN DOMINANTE "EFFLUENT BACTERIËN" IN KUNSTMATIG BESMET DRINKWATER: FAMILIE NIVEAU



Analyses op het niveau van "familie" laten de volgende resultaten zien:

- Veel van de "rioolwater bacterie-families" worden nog in verhoogde concentraties aangetoond in mengsels met een effluent concentratie van 10 ml/l.
- Alleen de ordes van "Onbekende Arcobacter" en "Onbekende Bacteroides" zorgen in het monster het een effluentconcentratie van 1 ml/l nog voor een verhoging van de concentratie van DNA-sequenties van deze families.

**Samenvattende conclusies: mengsels effluent/drinkwater**

- De resultaten zijn vergelijkbaar met de resultaten zoals die zijn verkregen op mengsels van influent en drinkwater. Maar, vanwege de lagere concentratie "rioolwater bacteriën" in effluent is er een groter volume effluent nodig om een detecteerbare verhoging van de concentratie "rioolwater bacteriën" in drinkwater te veroorzaken.

## 4 Discussie en conclusies

In dit onderzoek is, via het uitvoeren van laboratoriumexperimenten, een korte verkenning uitgevoerd naar de mogelijkheden NGS voor het detecteren van fecale besmettingen in drinkwater. Hiervoor zijn analyses met NGS en verschillende andere methoden voor detectie van fecale verontreinigingen (*E. coli* en enterococci kweek, qPCR voor mens-specifieke *Bacteroides* bacteriën) uitgevoerd op kunstmatig samengestelde monsters waarbij drinkwater en rioolwater (influent en effluent) in verschillende ratio's zijn gemengd. De uitgevoerde analyses maken duidelijk dat het met NGS analyses in potentie mogelijk is om verontreinigingen van drinkwater met een klein volume rioolwater zichtbaar te maken met een detectiegrens die weinig verschilt van de detectiegrens van de kweekmethode voor detectie van *E. coli* en de qPCR methode voor detectie van mens-specifieke *Bacteroides* bacteriën.

### *Samenstelling drink- en rioolwater*

Uit de NGS analyse blijkt dat de samenstelling van de microbiologische gemeenschap in drink- en rioolwater zeer complex is en, zoals te verwachten, zijn er grote verschillen tussen de bacteriële populatie in drinkwater en de bacteriële populaties in rioolwater-influent en -effluent. De verschillen tussen de populaties in rioolwater-influent en -effluent zijn minder groot. Om te onderzoeken of het mogelijk is om met NGS verontreinigingen te detecteren van een klein volume rioolwater in drinkwater is er eerst geselecteerd voor taxonomische groepen van bacteriën die dominant (>0,5% van de populatie) aanwezig zijn in rioolwater en (vrijwel) niet (<0,05%) aanwezig zijn in drinkwater ("rioolwater bacteriën"). Uit deze selectie komt een groot aantal groepen waarvan ook in andere studies is aangetoond dat deze dominant zijn in feces of rioolwater voorkomen (Fisher et al. 2015, McLellan and Eren 2014, Newton et al. 2015, Shchegolkova et al. 2016, Shanks et al. 2013) zoals:

- Ordeniveau: Campylobacteraceae, Bacteroidaceae, Enterobacteriaceae, Bifidobacteriales, Prevotellaceae en Fusobacteriaceae
- Subordeniveau: Faecalibacterium, Bacteroides, Prevotella, Blautia, Clostridium, Enterococcus, Cloacibacterium, Arcobacter, "Enteric-Bacteria\_Cluster ("coligroep") en Bifidobacteriaceae.
- Familieniveau: "unknown Acrobacter", "unknown Bacteroides" en "bacterien van de coligroep" zoals *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Kluyvera*

Van een deel van deze bacteriegroepen, waaronder de suborde van "Enteric-Bacteria\_Cluster", worden ook lage aantallen DNA-sequenties in het drinkwater aangetoond. Tot deze suborde behoren de bacteriën van de coligroep waarvan in deze experimenten de families van *Kluyvera* en *Escherichia* in drinkwater worden aangetoond. Van de familie van *Kluyvera* is bekend dat deze voorkomen in feces maar ook kunnen voorkomen in water (Sarría et al. 2001). DNA-sequenties van de familie van *Escherichia* zijn mogelijk het gevolg van de aanwezigheid van DNA van *Escherichia coli*. Hoewel er in het drinkwatermonster met kweek geen *E. coli* is aangetoond zijn de aangetoonde is het aantonen van DNA van de familie van *Escherichia* mogelijk het gevolg van verontreiniging van de gebruikte reagentia met lage concentraties DNA van *E. coli* (Heijnen and Medema 2006). Deze verontreiniging maakt het ook lastig om met DNA-technieken, zoals qPCR, methoden te ontwikkelen waarmee lage concentraties *E. coli* snel en betrouwbaar kunnen worden gedetecteerd (Heijnen and Medema 2006, Philipp et al. 2010). De concentratie *Escherichia* is in rioolwaterinfluent en -effluent wel duidelijk hoger dan in drinkwater en neemt af bij de verdunningen van rioolwater in drinkwater, dit geeft aan dat *Escherichia* bacteriën worden gedetecteerd met NGS. Het is opvallend dat dit afwijkt van recent gepubliceerd onderzoek (Vierheilig et al. 2015) waar de

onderzoekers niet in staat waren om *Escherichia* bacteriën te detecteren met NGS in oppervlaktewater maar ook niet in fecesmonsters van verschillende diersoorten. Een deel van dit verschil kan worden verklaard door de toegepaste sequencing methode (454-sequencing) waardoor per monster minder sequenties worden gegenereerd (ca. 3000 tegen ca. 100.000 in dit onderzoek). Door dit lagere aantal sequenties wordt het moeilijker om sequenties te detecteren die minder dominant aanwezig zijn. Echter, als het percentage sequenties van *Escherichia* in feces vergelijkbaar zou zijn met het percentage *Escherichia* sequenties in rioolwater influent (0,44%) dan was het ook met 3000 sequenties mogelijk geweest om een klein aantal (theoretisch ca. 13) *Escherichia* sequenties te detecteren in de fecesmonsters. Wellicht is de concentratie *Escherichia* in de fecesmonsters van de onderzochte dieren lager dan de concentratie *Escherichia* in het in deze studie onderzochte rioolwater en is detectie van *Escherichia* in de studie van Vierheilig et al. 2015 daarom niet mogelijk geweest.

#### *Kwantificatie*

Met NGS wordt niet direct kwantitatieve informatie gegenereerd over de concentratie bacteriën in de monsters maar de NGS analyses geven wel informatie het percentage sequenties dat behoort tot een bepaalde bacteriegroep. Dit percentage sequenties is, in combinatie met de concentratie ATP, gebruikt om een globale indruk te krijgen van de concentratie van de verschillende bacteriegroepen. Het is duidelijk dat de concentratie ATP een maat is voor de actieve biomassa en niet direct voor de concentratie bacteriën. ATP geeft daarom slechts een grove indicatie van de concentratie bacteriën in de monsters. Het zou beter zijn geweest om de concentratie bacteriën, microscopisch of met de flowcytometer geteld, of de concentratie DNA kopieën van het 16S rRNA gen te gebruiken als maat voor de concentratie bacteriën maar deze metingen zijn in dit onderzoek niet uitgevoerd. Vanwege het, bij deze analyses, ontbreken van betere parameters is de concentratie ATP gebruikt als "surrogaatparameter" voor de concentratie bacteriën. Als de concentratie van verschillende "rioolwater bacteriën" wordt berekend in de monsters met daarin verschillende verdunningen van rioolwater dan wordt duidelijk dat elke 10-voudige verdunningsstap van het rioolwater zorgt voor een 10-voudige afname van de concentratie van de geselecteerde "rioolwater bacteriegroepen". Dit geeft aan dat de NGS analyses een goede weerspiegeling geven van de verhoudingen van de concentratie 16S rRNA fragmenten in mengsels met verschillende samenstelling (verschillende verhoudingen rioolwater/drinkwater). Dit suggereert ook dat kwantificatie met NGS, tot op zekere hoogte, mogelijk is. Er is echter uitgebreider onderzoek nodig om de mogelijkheden en beperkingen van kwantificatie met NGS beter te leren kennen. Dit is mogelijk door NGS analyses uit te voeren op watermonsters waaraan bekende concentraties van verschillende bekende bacteriën toe te voegen.

#### *Detectiegrens*

Door het uitvoeren van NGS analyses op drinkwater waaraan een reeks van 10-voudige verdunningen van rioolwater-influent en -effluent zijn toegevoegd is te bepalen welk minimaal volume rioolwater nog detecteerbaar is in deze mengmonsters (detectiegrens). Doordat op dezelfde monsters ook analyses zijn uitgevoerd met kweek (*E. coli* en enterococci) en met qPCR (mens-specifieke *Bacteroides*) is het ook mogelijk om een eerste indruk te krijgen hoe de detectiegrens van NGS zich verhoudt tot de detectiegrens van de toegepaste kweek en qPCR methoden.

Bij het toepassen van NGS analyses op de mengmonsters van influent met drinkwater is er nog DNA van "rioolwater bacteriën" (*Bacteroidaceae* en *Prevotellaceae*), subordes (*Bacteroides*, *Blautia*, *Prevotella*, *Faecalibacterium* en *Clostridium*) en families (onbekende *Bacteroides*) te detecteren in een monster waarin aan 1 liter drinkwater een minimaal volume van 100 nl influent is toegevoegd. Ook voor het detecteren van mens-specifieke *Bacteroides* is een minimale concentratie van 100 nl/l nodig, een concentratie waarbij te verwachten is dat er nog net *E. coli* detecteerbaar is en geen enterococci meer detecteerbaar zijn met kweek.

In de mengmonsters van effluent met drinkwater is er een minimaal volume van 0,1 ml effluent in 1 liter drinkwater nodig voor een detecteerbare hoeveelheid DNA van "rioolwater



bacterieorde" (Prevotellaceae), -subordes (Bacteroides en Enterococcus) en -families (onbekende Arcobacter en Erwina). Ook voor het detecteren van mens-specifieke Bacteroides en *E. coli* is een verontreiniging met een minimaal volume van 0,1 ml effluent per liter drinkwater nodig.

Hoewel uitgebreider onderzoek noodzakelijk is om een betrouwbaarder beeld te krijgen van de detectiegrenzen van de methoden impliceren deze analyses dat er weinig verschil is tussen de detectiegrens van NGS en de detectiegrens van *E. coli* (kweek) en qPCR voor het detecteren van verontreinigingen met rioolwater in drinkwater. Bij de NGS analyses is het wel opvallend dat het DNA van een deel van de "rioolwater bacteriën" niet wordt gedetecteerd in drinkwater maar wel in enkele monsters met een influent concentratie van 10 nl/l of 1 nl/l of een effluent concentratie tussen de 1 nl/l en 10 µl/l. Detectie van "rioolwater bacteriën" is in deze gevallen vaak het gevolg van de aanwezigheid van één of twee DNA-sequenties in een dataset van ca. 100.000 sequenties. Uitbreider onderzoek zal nodig zijn om vast te stellen waardoor deze opvallende ("vals-positieve") resultaten worden gegenereerd. Mogelijk zijn deze "vals-positieve" resultaten het gevolg van:

- *Contaminaties* die optreden tijdens de laboratoriumwerkzaamheden: doordat NGS analyses plaats vinden op individuele moleculen is het risico van het optreden van contaminaties van enkele moleculen, tijdens de labwerkzaamheden, vrij groot en zullen mogelijk voorzorgsmaatregelen moeten worden genomen om dit risico te beperken. Ter controle is er in dit onderzoek vastgesteld dat er geen detecteerbare hoeveelheid 16S DNA gegenereerd werd bij het uitvoeren van PCR reacties op blanco monsters. Er is alleen geen NGS analyse uitgevoerd op deze blanco monsters zodat niet uitgesloten kan worden dat in deze blanco monsters (t.g.v. contaminaties) lage concentraties 16S DNA aanwezig zijn. Om beter inzicht te krijgen in het optreden van contaminaties zullen in vervolgonderzoek ook NGS analyses worden uitgevoerd op blanco monsters.
- *Sequentiefouten* geïntroduceerd tijdens het genereren van data op de Illumina MiSeq: met het MiSeq systeem worden bij het analyseren van PCR-fragmenten van het 16S rRNA gen fouten geïntroduceerd t.g.v. de beperkte sequentievariatie op dit DNA fragment. Door het toevoegen van extra DNA van een ander organisme (van het phiX virus) tijdens de sequencing kan het aantal fouten worden beperkt. Optimalisatie van de concentratie phiX virus kan mogelijk zorgen voor beperking van het aantal sequentiefouten.
- *PCR fouten* t.g.v. fouten die gemaakt worden door het enzym Taq polymerase tijdens de PCR waarbij het 16S rRNA fragment wordt vermeerderd. Om het risico op de introductie van fouten te minimaliseren is gebruik gemaakt van een speciaal Taq polymerase waarmee te verwachten is dat PCR fouten weinig invloed zullen hebben op de analyseresultaten. In vervolgonderzoek kan het risico nog verder worden geminimaliseerd door PCR reacties uit te voeren op een hogere concentratie DNA waardoor minder cycli nodig zijn voor de vermenigvuldiging.
- *Analysefouten* geïntroduceerd door de software tijdens de verwerking/interpretatie van data: het toegepaste software pakket (Bionumerics) voor de analyse van de gegenereerde data bevat een verouderde module voor analyse van 16S sequenties. De analyses met Bionumerics geven een goed beeld van de samenstelling van de bacteriële gemeenschap maar mogelijk worden ook sporadisch fouten geïntroduceerd die alleen zichtbaar worden als wordt "ingezoomd" op zeldzame DNA-sequenties in de datasets. Inmiddels zijn acties gestart met de implementatie van alternatieve software (Schloss et al. 2009), aanvullend onderzoek moet duidelijk maken in hoeverre de resultaten van analyses hierdoor zullen veranderen.

#### *Samenvattend*

De uitgevoerde analyses maken duidelijk dat het met NGS analyses in potentie mogelijk is om verontreinigingen van drinkwater met een klein volume rioolwater zichtbaar te maken met een detectiegrens die weinig verschilt van de detectiegrens van de kweekmethode voor detectie van *E. coli* en de qPCR methode voor detectie van mens-

specifieke Bacteroides bacteriën. NGS maakt het mogelijk om detectie niet te beperken tot één of enkele indicatorbacteriën maar geeft een compleet beeld van de aanwezige fecale bacteriën maar ook van de andere bacteriën die in een watermonster aanwezig zijn. Hierdoor zou een universele detectiemethode kunnen ontstaan waarmee met één analyse een compleet beeld wordt gegenereerd van de (microbiologische) waterkwaliteit. Uitvoeren van de NGS analyses en het verwerken van de gegenereerde data is momenteel nog wel zeer bewerkelijk en tijdrovend. Het is de verwachting dat apparatuur en software snel zullen worden doorontwikkeld waardoor NGS analyses in de verdere toekomst mogelijk snel en wellicht ook “on site” kunnen worden uitgevoerd.

## 5 Literatuur

- Smeets, P., Heijnen, L., Kronemeijer, A. and Medema, G. (2015) Verslag Workshop Snelle Detectie Fecale Verontreinigingen. BTO rapport 2015.034
- Heijnen, L., Ijszenga, M., Graaf de, B. and Wielen, P.W.J.J. (2015) Application of NGS for monitoring microbiological water quality. Rapid Methods Europe 2015 conference (RME) (Poster presentation).
- Tan, B., Ng, C., Nshimiyimana, J.P., Loh, L.L., Gin, K.Y. and Thompson, J.R. (2015) Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Front Microbiol* 6, 1027.
- Heijnen, L. (2013) Een universele moleculair microbiologische meetmethode: binnen bereik of verre toekomst? BTO rapport 2013.242(s).
- Heijnen, L. and Learbuch, K. (2013) Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen BTO rapport BTO 2013.014.
- Bernhard, A.E. and Field, K.G. (2000) A PCR assay To discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 66(10), 4571-4574.
- Seurinck, S., Defoirdt, T., Verstraete, W. and Siciliano, S.D. (2005) Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environ Microbiol* 7(2), 249-259.
- Haugland, R.A., Varma, M., Sivaganesan, M., Kelty, C., Peed, L. and Shanks, O.C. (2010) Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of selected *Bacteroidales* species and human fecal waste by qPCR. *Syst Appl Microbiol* 33(6), 348-357.
- Shanks, O.C., White, K., Kelty, C.A., Sivaganesan, M., Blannon, J., Meckes, M., Varma, M. and Haugland, R.A. (2010) Performance of PCR-based assays targeting *Bacteroidales* genetic markers of human fecal pollution in sewage and fecal samples. *Environ Sci Technol* 44(16), 6281-6288.
- Heijnen, L. (2015a) Eigenschappen van DNA-merkers voor fecale verontreiniging. BTO rapport 2015.023
- 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.
- Claesson, M.J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J.R., Ross, R.P. and O'Toole, P.W. (2010) Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research* 38(22), e200.
- Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jurgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J. and Andersson, A.F. (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *Isme J* 5(10), 1571-1579.
- Gilbert, J.A., Jansson, J.K. and Knight, R. (2014) The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC biology* 12, 69.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Heijnen, L. (2015b) Eigenschappen van DNA-merkers voor fecale verontreiniging. BTO rapport BTO 2014.053
- Heijnen, L., Learbuch, K., Kardinaal, E., Rotteveel, S., Ruiter, H. and Leenen, I. (2014) Fecale verontreiniging in zwemwater identificeren met DNA-merkers. H2O April 2014.
- Fisher, J.C., Eren, A.M., Green, H.C., Shanks, O.C., Morrison, H.G., Vineis, J.H., Sogin, M.L. and McLellan, S.L. (2015) Comparison of Sewage and Animal Fecal Microbiomes by Using Oligotyping Reveals Potential Human Fecal Indicators in Multiple Taxonomic Groups. *Appl Environ Microbiol* 81(20), 7023-7033.
- McLellan, S.L. and Eren, A.M. (2014) Discovering new indicators of fecal pollution. *Trends Microbiol* 22(12), 697-706.
- Newton, R.J., McLellan, S.L., Dila, D.K., Vineis, J.H., Morrison, H.G., Eren, A.M. and Sogin, M.L. (2015) Sewage reflects the microbiomes of human populations. *MBio* 6(2), e02574.
- Shchegolkova, N.M., Krasnov, G.S., Belova, A.A., Dmitriev, A.A., Kharitonov, S.L., Klimina, K.M., Melnikova, N.V. and Kudryavtseva, A.V. (2016) Microbial Community Structure of Activated Sludge in Treatment Plants with Different Wastewater Compositions. *Front Microbiol* 7, 90.
- Shanks, O.C., Newton, R.J., Kelty, C.A., Huse, S.M., Sogin, M.L. and McLellan, S.L. (2013) Comparison of the microbial community structures of untreated wastewaters from different geographic locales. *Appl Environ Microbiol* 79(9), 2906-2913.
- Sarria, J.C., Vidal, A.M. and Kimbrough, R.C., 3rd (2001) Infections caused by *Kluyvera* species in humans. *Clin Infect Dis* 33(7), E69-74.
- Heijnen, L. and Medema, G. (2006) Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *J Water Health* 4(4), 487-498.
- Philipp, S., Huemer, H.P., Irschick, E.U. and Gassner, C. (2010) Obstacles of Multiplex Real-Time PCR for Bacterial 16S rDNA: Primer Specificity and DNA Decontamination of Taq Polymerase. *Transfus Med Hemother* 37(1), 21-28.
- Vierheilig, J., Savio, D., Ley, R.E., Mach, R.L., Farnleitner, A.H. and Reischer, G.H. (2015) Potential applications of next generation DNA sequencing of 16S rRNA gene amplicons in microbial water quality monitoring. *Water Sci Technol* 72(11), 1962-1972.
- 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.

## Bijlage I Influent verdunningen: orde niveau

Absoluut aantal Sequenties						
Samenstelling	Totaal aantal					
Monster	sequenties	Campylobacteraceae	Bacteroidaceae	Enterobacteriaceae	Enterococcaceae	Prevotellaceae
Drinkwater	122657	34	0	222	10	0
Riool influent	114222	39167	5776	2224	808	1500
100ml/L riool	95285	23679	5920	2045	643	2615
10ml/L riool	82298	23717	3933	1693	532	1416
1ml/L riool	122605	31820	5011	2315	747	1881
0,1ml/L riool	94871	10016	2351	1048	437	880
10µl/L riool	143638	2253	614	529	122	243
1µl/L riool	175546	366	92	429	20	37
100nl/L riool	96244	79	6	203	12	6
10nl/L riool	109762	33	0	199	11	0
1nl/L riool	86646	31	3	176	8	0
10pl/L riool	90678	36	1	187	4	1
Procentueel aantal sequenties						
		Campylobacteraceae	Bacteroidaceae	Enterobacteriaceae	Enterococcaceae	Prevotellaceae
Drinkwater		0,0277	0,0000	0,1810	0,0082	0,0000
Riool influent		34,2902	5,0568	1,9471	0,7074	1,3132
100ml/L riool		24,8507	6,2129	2,1462	0,6748	2,7444
10ml/L riool		28,8184	4,7790	2,0572	0,6464	1,7206
1ml/L riool		25,9533	4,0871	1,8882	0,6093	1,5342
0,1ml/L riool		10,5575	2,4781	1,1047	0,4606	0,9276
10µl/L riool		1,5685	0,4275	0,3683	0,0849	0,1692
1µl/L riool		0,2085	0,0524	0,2444	0,0114	0,0211
100nl/L riool		0,0821	0,0062	0,2109	0,0125	0,0062
10nl/L riool		0,0301	0,0000	0,1813	0,0100	0,0000
1nl/L riool		0,0358	0,0035	0,2031	0,0092	0,0000
10pl/L riool		0,0397	0,0011	0,2062	0,0044	0,0011
Omgerekend naar fg ATP/l per groep						
	ATP ng/l	Campylobacteraceae	Bacteroidaceae	Enterobacteriaceae	Enterococcaceae	Prevotellaceae
Drinkwater	7	0,0010	0,0000	0,0064	0,0003	0,0000
Riool infl.	21151	7252,6014	1069,5490	411,8208	149,6183	277,7568
100ml/L riool	2178	541,2048	135,3069	46,7403	14,6963	59,7682
10ml/L riool	218	62,7615	10,4078	4,4801	1,4078	3,7471
1ml/L riool	20	5,1852	0,8166	0,3772	0,1217	0,3065
0,1ml/L riool	5	0,5301	0,1244	0,0555	0,0231	0,0466
10µl/L riool	4	0,0574	0,0156	0,0135	0,0031	0,0062
1µl/L riool	4	0,0079	0,0020	0,0092	0,0004	0,0008
100nl/L riool	3	0,0023	0,0002	0,0060	0,0004	0,0002
10nl/L riool	4	0,0012	0,0000	0,0072	0,0004	0,0000
1nl/L riool	5	0,0016	0,0002	0,0093	0,0004	0,0000
10pl/L riool	4	0,0016	0,0000	0,0084	0,0002	0,0000

# Bijlage II Influent verdunningen: suborde niveau

Absoluut aantal sequenties										
Samenstelling	Totaal aantal sequenties	Arcobacter	Clostridium	Enteric_Bacteria_cluster	Faecalibacterium	Bacteroides	Prevotella	Cloacibacterium	Enterococcus	Blautia
Drinkwater	122656	1	0	40	0	0	0	0	0	0
Riool influent	114222	38733	275	2155	985	5776	1311	1111	761	1375
100ml/L riool	95285	23255	360	1999	1567	5920	2396	488	604	2733
10ml/L riool	82298	23365	292	1659	1060	3933	1259	659	493	1398
1ml/L riool	122605	31424	373	2241	1103	5011	1646	965	671	1664
0,1ml/L riool	94871	9832	153	952	644	2351	776	404	406	1096
10µl/L riool	143638	2164	22	295	147	614	216	98	111	252
1µl/L riool	175546	314	4	92	28	92	33	10	10	44
100ml/L riool	96244	35	1	26	2	6	4	0	0	5
10ml/L riool	109762	7	0	24	0	0	0	0	0	0
1nl/L riool	86646	3	0	25	0	3	0	0	1	0
10pl/L riool	90678	12	0	23	1	1	1	0	0	1

Procentueel aantal sequenties										
	Arcobacter	Clostridium	Enteric_Bacteria_cluster	Faecalibacterium	Bacteroides	Prevotella	Cloacibacterium	Enterococcus	Blautia	
Drinkwater	0,0008	0,0000	0,0326	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Riool influent	33,9103	0,2408	1,8867	0,8624	5,0568	1,1478	0,9727	0,6662	0,6662	1,2038
100ml/L riool	24,4657	0,3778	2,0979	1,6445	6,2129	2,5146	0,5121	0,6339	0,6339	2,8682
10ml/L riool	28,3907	0,3548	2,0158	1,2880	4,7790	1,5298	0,8007	0,5990	0,5990	1,6987
1ml/L riool	25,6303	0,3042	1,8278	0,8996	4,0871	1,3425	0,7871	0,5473	0,5473	1,3572
0,1ml/L riool	10,3635	0,1613	1,0035	0,6788	2,4781	0,8180	0,4258	0,4279	0,4279	1,1553
10µl/L riool	1,5066	0,0153	0,2054	0,1023	0,4275	0,1504	0,0682	0,0773	0,0773	0,1754
1µl/L riool	0,1789	0,0023	0,0524	0,0160	0,0524	0,0188	0,0057	0,0057	0,0057	0,0251
100ml/L riool	0,0364	0,0010	0,0270	0,0021	0,0062	0,0042	0,0000	0,0000	0,0000	0,0052
10ml/L riool	0,0064	0,0000	0,0219	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1nl/L riool	0,0035	0,0000	0,0289	0,0000	0,0035	0,0000	0,0000	0,0012	0,0012	0,0000
10pl/L riool	0,0132	0,0000	0,0254	0,0011	0,0011	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011

Omgerekend naar fg ATP/l per groep										
	ATP ng/l	Arcobacter	Clostridium	Enteric_Bacteria_cluster	Faecalibacterium	Bacteroides	Prevotella	Cloacibacterium	Enterococcus	Blautia
Drinkwater	4	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,00000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Riool influent	21151	7172,2370	50,9221	399,0440	182,3937	1069,54899	242,7595	205,7252	140,9153	254,6104
100ml/L riool	2178	531,5139	8,2281	45,6889	35,8152	135,30692	54,7627	11,1537	13,8050	62,4652
10ml/L riool	218	61,8300	0,7727	4,3902	2,8050	10,40777	3,3316	1,7439	1,3046	3,6995
1ml/L riool	20	5,1207	0,0608	0,3652	0,1797	0,81657	0,2682	0,1573	0,1093	0,2712
0,1ml/L riool	5	0,5203	0,0081	0,0504	0,0341	0,12442	0,0411	0,0214	0,0215	0,0580
10µl/L riool	4	0,0552	0,0006	0,0075	0,0037	0,01565	0,0055	0,0025	0,0028	0,0064
1µl/L riool	4	0,0067	0,0001	0,0020	0,0006	0,00197	0,0007	0,0002	0,0002	0,0009
100ml/L riool	3	0,0010	0,0000	0,0008	0,0001	0,00018	0,0001	0,0000	0,0000	0,0001
10ml/L riool	4	0,0003	0,0000	0,0009	0,0000	0,00000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1nl/L riool	5	0,0002	0,0000	0,0013	0,0000	0,00016	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000
10pl/L riool	4	0,0005	0,0000	0,0010	0,0000	0,00004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000



## Bijlage III Influent verdunningen: familie niveau

Absoluut aantal sequenties										
Samenstelling	Totaal aantal sequenties	unclassified	unclassified	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"
Monster		Arcobacter	Bacteroides	Serratia	Kluyvera	Erwinia	Klebsiella	Escherichia	Enterobacter	
Drinkwater	122656	1	0	0	38	0	0	2	0	0
Riool influent	114222	38733	5776	57	6	41	115	503	9	
100ml/L riool	95285	23255	5920	69	4	39	59	550	5	
10ml/L riool	82298	23365	3933	50	2	34	71	350	1	
1ml/L riool	122605	31424	5011	87	17	40	135	549	1	
0,1ml/L riool	94871	9832	2351	28	18	10	47	225	3	
10µl/L riool	143638	2164	614	8	37	10	9	47	0	
1µl/L riool	175546	314	92	0	51	0	1	12	0	
100nl/L riool	96244	35	6	0	19	0	0	0	0	
10nl/L riool	109762	7	0	0	21	0	0	1	0	
1nl/L riool	86646	3	3	0	23	0	0	1	0	
10pl/L riool	90678	12	1	0	15	0	0	4	0	
Procentueel aantal sequenties										
		unclassified	unclassified	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"
		Arcobacter	Bacteroides	Serratia	Kluyvera	Erwinia	Klebsiella	Escherichia	Enterobacter	
Drinkwater		0,0008	0,0000	0,0000	0,0310	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	
Riool influent		33,9103	5,0568	0,0499	0,0053	0,0359	0,1007	0,4404	0,0079	
100ml/L riool		24,4057	6,2129	0,0724	0,0042	0,0409	0,0619	0,5772	0,0052	
10ml/L riool		28,3907	4,7790	0,0608	0,0024	0,0413	0,0863	0,4253	0,0012	
1ml/L riool		25,6903	4,0871	0,0710	0,0139	0,0326	0,1101	0,4478	0,0008	
0,1ml/L riool		10,3635	2,4781	0,0295	0,0190	0,0105	0,0495	0,2372	0,0032	
10µl/L riool		1,5066	0,4275	0,0056	0,0258	0,0070	0,0063	0,0327	0,0000	
1µl/L riool		0,1789	0,0524	0,0000	0,0291	0,0000	0,0006	0,0068	0,0000	
100nl/L riool		0,0364	0,0062	0,0000	0,0197	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
10nl/L riool		0,0064	0,0000	0,0000	0,0191	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	
1nl/L riool		0,0035	0,0035	0,0000	0,0265	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	
10pl/L riool		0,0132	0,0011	0,0000	0,0165	0,0000	0,0000	0,0044	0,0000	
Omgekeerd naar fg ATP/l per groep										
	ATP ng/l	unclassified	unclassified	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"	"Coliform"
		Arcobacter	Bacteroides	Serratia	Kluyvera	Erwinia	Klebsiella	Escherichia	Enterobacter	
Drinkwater	4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	
Riool influent	21151	7172,2370	1069,5490	10,5548	1,1110	7,5920	21,2947	93,1411	1,6665	
100ml/L riool	2178	531,5139	135,3069	1,5771	0,0914	0,8914	1,3485	12,5707	0,1143	
10ml/L riool	218	61,8300	10,4078	0,1323	0,0053	0,0900	0,1879	0,9262	0,0026	
1ml/L riool	20	5,1207	0,8166	0,0142	0,0028	0,0065	0,0220	0,0895	0,0002	
0,1ml/L riool	5	0,5203	0,1244	0,0015	0,0010	0,0005	0,0025	0,0119	0,0002	
10µl/L riool	4	0,0552	0,0156	0,0002	0,0009	0,0003	0,0002	0,0012	0,0000	
1µl/L riool	4	0,0067	0,0020	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0003	0,0000	
100nl/L riool	3	0,0010	0,0002	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
10nl/L riool	4	0,0003	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
1nl/L riool	5	0,0002	0,0002	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	
10pl/L riool	4	0,0005	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0002	0,0000	



## Bijlage IV Effluent verdunningen: orde niveau

Samenstelling	Totaal aantal							
Monster	sequenties	Arcobacter	Frankineae	PeM15	Enteric_Bacteria_cluster	Bacteroides	Prevotella	Enterococcus
Drinkwater	122657	1	47	0	40	0	0	0
Effluent	67013	4399	3522	2027	584	1766	402	277
100ml/L riool	102298	7144	4247	2197	818	3075	510	342
10ml/L riool	107273	4413	2260	1291	531	1586	330	196
1ml/L riool	77268	72	60	18	26	23	2	1
0,1ml/L riool	46715	2	21	0	10	0	1	1
10µl/L riool	99671	1	21	0	20	1	0	0
1µl/L riool	92170	3	25	0	14	2	0	0
100nl/L riool	98940	4	25	1	15	0	0	0
10nl/L riool	93137	6	20	0	16	1	0	0
1nl/L riool	97682	3	28	0	17	0	1	0
100 pl/L riool	97771	3	40	1	19	0	0	0
10 pl/L riool	98217	1	30	1	21	0	0	0
<b>Procentueel aantal sequenties</b>								
		Arcobacter	Frankineae	PeM15	Enteric_Bacteria_cluster	Bacteroides	Prevotella	Enterococcus
Drinkwater		0,0008	0,0383	0,0000	0,0326	0,0000	0,0000	0,0000
Effluent		6,5644	5,2557	3,0248	0,8715	2,6353	0,5999	0,4134
100ml/L riool		6,9835	4,1516	2,1476	0,7996	3,0059	0,4985	0,3343
10ml/L riool		4,1138	2,1068	1,2035	0,4950	1,4785	0,3076	0,1827
1ml/L riool		0,0932	0,0777	0,0233	0,0336	0,0298	0,0026	0,0013
0,1ml/L riool		0,0043	0,0450	0,0000	0,0214	0,0000	0,0021	0,0021
10µl/L riool		0,0010	0,0211	0,0000	0,0201	0,0010	0,0000	0,0000
1µl/L riool		0,0033	0,0271	0,0000	0,0152	0,0022	0,0000	0,0000
100nl/L riool		0,0040	0,0253	0,0010	0,0152	0,0000	0,0000	0,0000
10nl/L riool		0,0064	0,0215	0,0000	0,0172	0,0011	0,0000	0,0000
1nl/L riool		0,0031	0,0287	0,0000	0,0174	0,0000	0,0010	0,0000
100 pl/L riool		0,0031	0,0409	0,0010	0,0194	0,0000	0,0000	0,0000
10 pl/L riool		0,0010	0,0305	0,0010	0,0214	0,0000	0,0000	0,0000
<b>Omgekeerd naar fg ATP/l per groep</b>								
	ATP ng/l	Arcobacter	Frankineae	PeM15	Enteric_Bacteria_cluster	Bacteroides	Prevotella	Enterococcus
Drinkwater	4	0,0000	0,0014	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000
Effluent	737	48,4059	38,7555	22,3048	6,4262	19,4328	4,4235	3,0481
100ml/L riool	80	5,5868	3,3213	1,7181	0,6397	2,4047	0,3988	0,2675
10ml/L riool	9	0,3826	0,1959	0,1119	0,0460	0,1375	0,0286	0,0170
1ml/L riool	4	0,0037	0,0031	0,0009	0,0013	0,0012	0,0001	0,0001
0,1ml/L riool	4	0,0001	0,0016	0,0000	0,0007	0,0000	0,0001	0,0001
10µl/L riool	4	0,0000	0,0009	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000
1µl/L riool	3	0,0001	0,0007	0,0000	0,0004	0,0001	0,0000	0,0000
100nl/L riool	5	0,0002	0,0012	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000
10nl/L riool	4	0,0003	0,0009	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000
1nl/L riool	4	0,0001	0,0012	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000
100 pl/L riool	5	0,0001	0,0019	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000
10 pl/L riool	4	0,0000	0,0013	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000

## Bijlage V Effluent verdunningen: familie niveau

<b>Absoluut aantal Sequenties</b>									
Samenstelling	Totaal aantal sequenties	unclassified Arcobacter	unclassified Bacteroides	"Coliform" Serratia	"Coliform" Kluyvera	"Coliform" Erwinia	"Coliform" Klebsiella	"Coliform" Escherichia	
Drinkwater	122657	1	0	0	38	0	0	0	2
Effluent	67013	4399	1766	12	10	14	36		158
100ml/L riool	102298	7144	3075	25	22	8	44		242
10ml/L riool	107273	4413	1586	20	21	5	26		169
1ml/L riool	77268	72	23	0	19	0	0		0
0,1ml/L riool	46715	2	0	0	9	1	0		0
10µl/L riool	99671	1	1	0	15	0	0		1
1µl/L riool	92170	3	2	0	12	0	0		0
100nl/L riool	98940	4	0	0	12	0	0		2
10nl/L riool	93137	6	1	0	14	0	0		1
1nl/L riool	97682	3	0	0	13	0	0		1
100 pl/L riool	97771	3	0	0	18	0	0		0
10 pl/L riool	98217	1	0	0	19	0	0		2
<b>Procentueel aantal sequenties</b>									
		unclassified Arcobacter	unclassified Bacteroides	"Coliform" Serratia	"Coliform" Kluyvera	"Coliform" Erwinia	"Coliform" Klebsiella	"Coliform" Escherichia	
Drinkwater		0,0008	0,0000	0,0000	0,0310	0,0000	0,0000	0,0016	
Effluent		6,5644	2,6353	0,0179	0,0149	0,0209	0,0537	0,2358	
100ml/L riool		6,9835	3,0059	0,0244	0,0215	0,0078	0,0430	0,2366	
10ml/L riool		4,1138	1,4785	0,0186	0,0196	0,0047	0,0242	0,1575	
1ml/L riool		0,0932	0,0298	0,0000	0,0246	0,0000	0,0000	0,0000	
0,1ml/L riool		0,0043	0,0000	0,0000	0,0193	0,0021	0,0000	0,0000	
10µl/L riool		0,0010	0,0010	0,0000	0,0150	0,0000	0,0000	0,0010	
1µl/L riool		0,0033	0,0022	0,0000	0,0130	0,0000	0,0000	0,0000	
100nl/L riool		0,0040	0,0000	0,0000	0,0121	0,0000	0,0000	0,0020	
10nl/L riool		0,0064	0,0011	0,0000	0,0150	0,0000	0,0000	0,0011	
1nl/L riool		0,0031	0,0000	0,0000	0,0133	0,0000	0,0000	0,0010	
100 pl/L riool		0,0031	0,0000	0,0000	0,0184	0,0000	0,0000	0,0000	
10 pl/L riool		0,0010	0,0000	0,0000	0,0193	0,0000	0,0000	0,0020	
<b>Omgerekend naar fg ATP/l per groep</b>									
	ATP ng/l	unclassified Arcobacter	unclassified Bacteroides	"Coliform" Serratia	"Coliform" Kluyvera	"Coliform" Erwinia	"Coliform" Klebsiella	"Coliform" Escherichia	
Drinkwater	4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0001	
Effluent	737	48,4059	19,4328	0,1320	0,1100	0,1541	0,3961	1,7386	
100ml/L riool	80	5,5868	2,4047	0,0196	0,0172	0,0063	0,0344	0,1893	
10ml/L riool	9	0,3826	0,1375	0,0017	0,0018	0,0004	0,0023	0,0147	
1ml/L riool	4	0,0037	0,0012	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	
0,1ml/L riool	4	0,0001	0,0000	0,0000	0,0007	0,0001	0,0000	0,0000	
10µl/L riool	4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	
1µl/L riool	3	0,0001	0,0001	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	
100nl/L riool	5	0,0002	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0001	
10nl/L riool	4	0,0003	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	
1nl/L riool	4	0,0001	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	
100 pl/L riool	5	0,0001	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000	
10 pl/L riool	4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0001	

## Bijlage VI Effluent verdunningen: suborde niveau

Samenstelling	Totaal aantal							
Monster	sequenties	Arcobacter	Frankineae	PeM15	Enteric_Bacteria_cluster	Bacteroides	Prevotella	Enterococcus
Drinkwater	122657	1	47	0	40	0	0	0
Effluent	67013	4399	3522	2027	584	1766	402	277
100ml/L riool	102298	7144	4247	2197	818	3075	510	342
10ml/L riool	107273	4413	2260	1291	531	1586	330	196
1ml/L riool	77268	72	60	18	26	23	2	1
0,1ml/L riool	46715	2	21	0	10	0	1	1
10µl/L riool	99671	1	21	0	20	1	0	0
1µl/L riool	92170	3	25	0	14	2	0	0
100nl/L riool	98940	4	25	1	15	0	0	0
10nl/L riool	93137	6	20	0	16	1	0	0
1nl/L riool	97682	3	28	0	17	0	1	0
100 pl/L riool	97771	3	40	1	19	0	0	0
10 pl/L riool	98217	1	30	1	21	0	0	0
<b>Procentueel aantal sequenties</b>								
		Arcobacter	Frankineae	PeM15	Enteric_Bacteria_cluster	Bacteroides	Prevotella	Enterococcus
Drinkwater		0,0008	0,0383	0,0000	0,0326	0,0000	0,0000	0,0000
Effluent		6,5644	5,2557	3,0248	0,8715	2,6353	0,5999	0,4134
100ml/L riool		6,9835	4,1516	2,1476	0,7996	3,0059	0,4985	0,3343
10ml/L riool		4,1138	2,1068	1,2035	0,4950	1,4785	0,3076	0,1827
1ml/L riool		0,0932	0,0777	0,0233	0,0336	0,0298	0,0026	0,0013
0,1ml/L riool		0,0043	0,0450	0,0000	0,0214	0,0000	0,0021	0,0021
10µl/L riool		0,0010	0,0211	0,0000	0,0201	0,0010	0,0000	0,0000
1µl/L riool		0,0033	0,0271	0,0000	0,0152	0,0022	0,0000	0,0000
100nl/L riool		0,0040	0,0253	0,0010	0,0152	0,0000	0,0000	0,0000
10nl/L riool		0,0064	0,0215	0,0000	0,0172	0,0011	0,0000	0,0000
1nl/L riool		0,0031	0,0287	0,0000	0,0174	0,0000	0,0010	0,0000
100 pl/L riool		0,0031	0,0409	0,0010	0,0194	0,0000	0,0000	0,0000
10 pl/L riool		0,0010	0,0305	0,0010	0,0214	0,0000	0,0000	0,0000
<b>Omgerekend naar fg ATP/l per groep</b>								
	ATP ng/l	Arcobacter	Frankineae	PeM15	Enteric_Bacteria_cluster	Bacteroides	Prevotella	Enterococcus
Drinkwater	4	0,0000	0,0014	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000
Effluent	737	48,4059	38,7555	22,3048	6,4262	19,4328	4,4235	3,0481
100ml/L riool	80	5,5868	3,3213	1,7181	0,6397	2,4047	0,3988	0,2675
10ml/L riool	9	0,3826	0,1959	0,1119	0,0460	0,1375	0,0286	0,0170
1ml/L riool	4	0,0037	0,0031	0,0009	0,0013	0,0012	0,0001	0,0001
0,1ml/L riool	4	0,0001	0,0016	0,0000	0,0007	0,0000	0,0001	0,0001
10µl/L riool	4	0,0000	0,0009	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000
1µl/L riool	3	0,0001	0,0007	0,0000	0,0004	0,0001	0,0000	0,0000
100nl/L riool	5	0,0002	0,0012	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000
10nl/L riool	4	0,0003	0,0009	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000
1nl/L riool	4	0,0001	0,0012	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000
100 pl/L riool	5	0,0001	0,0019	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000

