

BTO 2020.044 | Augustus 2020

BTO rapport

Microbiologische
compositie en potentiële
metabole processen
tijdens
drinkwaterdistributie

BTO

Microbiologische compositie en potentiële metabole processen tijdens drinkwaterdistributie

BTO 2020.044 | Juni 2020

Opdrachtnummer

402045-038

Projectmanager

Michiel Hootsmans

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische activiteit

Kwaliteitsborger

Paul van der Wielen

Auteurs

Kimberly Learbuch, Peer Timmers

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Jaar van publicatie
2020

Meer informatie

Kimberly Learbuch MSc.
T 030-6069599
E kimberly.learbuch@kwrwater.nl

Keywords

Biofilm, microbiële activiteit

Postbus 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

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



BTO 2020.044 | Augustus 2020 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

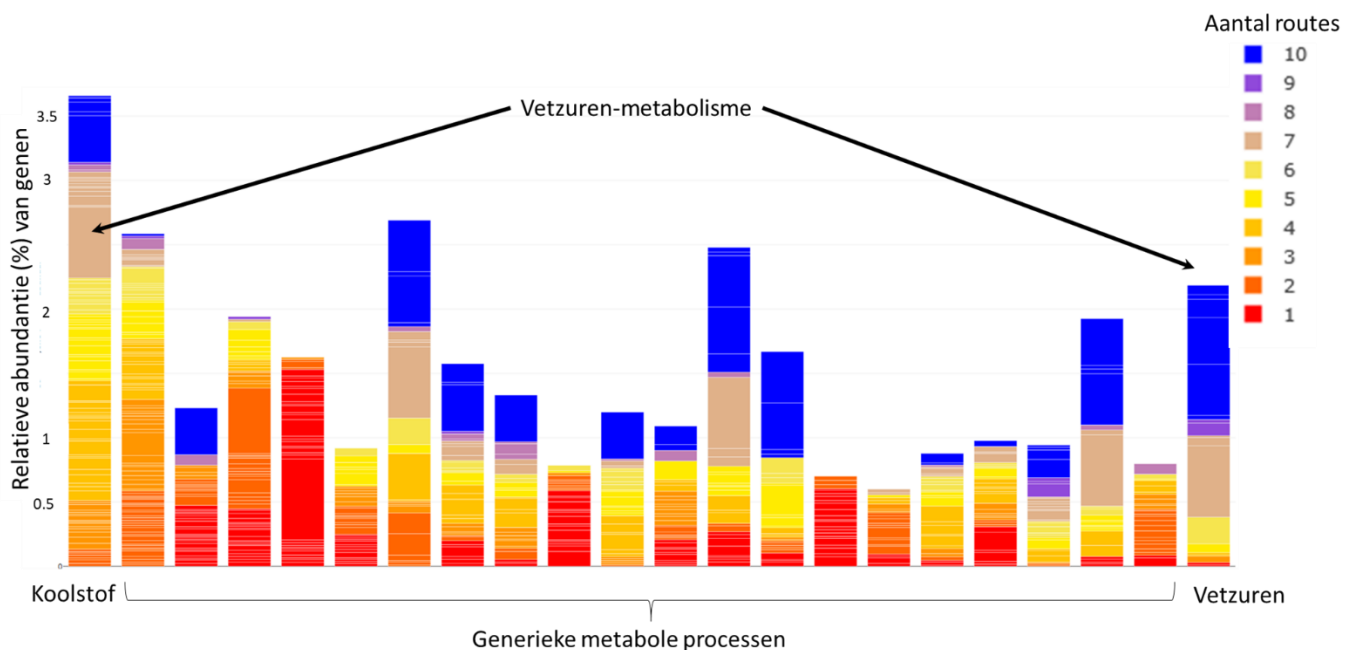
Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

BTO Managementsamenvatting

Afbraak van vetzuren door micro-organismen speelt mogelijk een belangrijke rol in nagroei, zo blijkt uit genetisch onderzoek

Auteurs Kimberly Learbuch MSc, Dr. Peer Timmers

Genen die betrokken zijn bij de afbraak van vetzuren spelen mogelijk een belangrijke rol in de biofilm van de buiswand en het sediment van drinkwaterdistributiesystemen. Dat blijkt uit een studie waarin drie voorzieningsgebieden zijn bemonsterd. Van water-, sediment- en leidingwandmonsters zijn de ATP-concentraties, KG22 en *Aeromonas*-aantallen en de samenstelling van de bacteriële populatie bepaald. Ook is achterhaald welke dominante genen betrokken zijn bij metabole processen (zie onderstaande figuur). Welke microbiologische processen zich in het distributiesysteem afspelen wordt veelal nog onvoldoende begrepen. Deze studie is onderdeel van een project waarbij praktijkmetingen worden gecombineerd met experimenten op laboratoriumschaal om deze kennislacune te doorbreken. In het volgende deel van het project wordt onderzoek gedaan naar de invloed van vetzuren op biofilmvorming onder gecontroleerde laboratoriumcondities.



Metagenoomanalyse van een drinkwatermonster, waarin voor generieke metabole processen (x-as) staat uitgezet wat de relatieve hoeveelheid is van genen die hierbij zijn betrokken (y-as). De kleur geeft aan in hoeveel metabole processen het gen voorkomt.

Belang: metabole microbiologische processen in de biofilm in kaart brengen.

Microbiologische processen die zich in het drinkwaterdistributiesysteem afspelen worden veelal nog onvoldoende begrepen. Met meer inzicht kunnen metabole processen beter

worden gecontroleerd en gestuurd, wat mogelijk helpt bij het terugdringen of tegengaan van nagroei en biofilmvorming in het distributiesysteem. Deze studie is bedoeld om dat inzicht te vergroten.

Aanpak: bemonsteringen voorzieningsgebieden met verschillen in afstand/verblijftijd.

In 2018 zijn in drie voorzieningsgebieden per gebied drie locaties bemonsterd met verschillende afstanden en/of verblijftijden ten opzichte van de productielocatie. Monsters zijn genomen van het reinwater, drinkwater, sediment en de biofilm op de distributieleidingen. Deze zijn geanalyseerd op ATP, KG22 en *Aeromonas*. Tevens is met Next Generation Sequencing (NGS) de bacteriesamenstelling bepaald en is met behulp van een metagenoomanalyse achterhaald welke genen betrokken kunnen zijn bij de dominante metabole processen in het distributiesysteem.

Resultaten: vetzuren geïdentificeerd als mogelijke belangrijkste stofgroep in biofilm.

De ATP-concentratie en aantallen KG22 en *Aeromonas* waren het hoogst in het sediment en de biofilm. In het drinkwater waren deze parameters beduidend lager. Ook blijkt dat tijdens distributie naar de klant de bacteriesamenstelling van het drinkwater verandert. Uit de metagenoomanalyse volgt dat in het distributiesysteem de afbraak van kortketen- en langketenvetzuren door micro-organismen waarschijnlijk een belangrijk biologisch proces is, waardoor dit een belangrijke reden kan zijn voor nagroei.

Toepassing: volgende stap is toetsen van invloed van vetzuren op biofilmvorming in laboratorium.

De praktijkmetingen tonen aan dat vetzuren mogelijk de belangrijkste stofgroep vormen die in de biofilm op de buiswand en in het sediment door micro-organismen worden afgebroken. De volgende stap in het onderzoek is om onder gecontroleerde laboratoriumcondities te achterhalen hoe belangrijk die rol is. Wanneer hieruit blijkt dat vetzuren een cruciale rol spelen in nagroei van micro-organismen in het distributiesysteem, dan kunnen beheersmaatregelen worden gedefinieerd die ervoor zorgen dat tijdens de zuivering vetzuren beter kunnen worden verwijderd.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in rapport *Microbiologische compositie en potentiële metabole processen tijdens drinkwaterdistributie* (BTO-2020.044).

Meer informatie

Kimberly Learbuch MSc.

T 030-6069599

E kimberly.learbuch@kwrwater.nl**KWR**

PO Box 1072

3430 BB Nieuwegein

The Netherlands



Inhoud

Inhoud	2
1 Inleiding	3
1.1 Microbiologische processen in biofilm buiswand/sediment	4
2 Materiaal en methoden	5
2.1 Monsterlocaties	5
2.2 Monstername	5
2.3 Analyses	6
2.4 DNA en RNA isolatie	7
2.5 Microbial profiling	7
2.6 Metagenoomanalyse	8
3 Resultaten	10
3.1 Sedimentvolumes en troebelheid spuiacties	10
3.2 ATP, KG22 en <i>Aeromonas</i>	10
3.3 Microbial profiling	17
4 Metagenoomanalyse	26
4.1 Resultaten metagenoomanalyses	28
5 Discussie	48
5.1 ATP, KG22 en <i>Aeromonas</i>	48
5.2 Microbial profiling	48
5.3 Metagenoomanalyse	49
6 Conclusie en aanbevelingen	52
6.1 Conclusies	52
6.2 Aanbevelingen	52
7 Referenties	54
Bijlage I Bemonsteringsprotocol leidinguitname	57
Bijlage II Troebelheidsmetingen	58
Bijlage III Metabole route data	63
Bijlage IV Binning resultaten	70
Bijlage V Genera bar graphs	72
Bijlage VI RNA figuren	74

1 Inleiding

Drinkwater in Nederland wordt gedistribueerd zonder restgehalte van een desinfectiemiddel als chloor. Groei van micro-organismen tijdens distributie wordt daarom gelimiteerd door het aanbod van nutriënten in het drinkwatersysteem zo laag mogelijk te houden, oftewel door te streven naar biologische stabiliteit van het drinkwatersysteem. In 2017 is in samenspraak met de drinkwaterbedrijven een gezamenlijke definitie van deze biologische stabiliteit vastgesteld: 'Biologische stabiliteit beschrijft een drinkwatersysteem dat tot een zo min mogelijke biologische verandering leidt, zodat gezondheidsrisico's en/of consumentenklachten, gerelateerd aan groei van (micro-)organismen, niet kunnen optreden.' Een aantal locaties in Nederland en Vlaanderen voldoen waarschijnlijk niet aan deze definitie, doordat (i) opportunistische pathogenen, die genotypisch vergelijkbaar zijn met patiëntstammen, aanwezig zijn en (ii) esthetische klachten voorkomen ten aanzien van de aanwezigheid van ongewervelde dieren, geur & smaak en/of bruinwaterklachten. In het BTO onderzoek is traditiegetrouw altijd veel aandacht geweest voor het aanpassen en optimaliseren van de zuivering in relatie tot de biologische stabiliteit, maar het onderzoek heeft zich veel minder gericht op de rol van het distributiesysteem. Daar komt bij dat de BTO projecten die zich wel op het distributiesysteem hebben gericht, veelal gefocust zijn geweest op het bemonsteren en analyseren van reinwatermonsters, watermonsters genomen aan de keukenkraan na doorstroming en/of spuiwater genomen aan de brandkraan. Door de vele variabelen die van invloed zijn op microbiële groei in het distributiesysteem, is het met dergelijke metingen moeilijk om de parameters te identificeren die de meeste invloed hebben op de microbiologische processen in het distributiesysteem. Het gevolg is dat het drinkwaterdistributiesysteem nog veelal een "black box" is, waardoor de microbiologische processen die optreden onvoldoende worden begrepen om onderbouwde aanbevelingen voor distributie te geven om de eventuele nagroeiproblematiek te beperken.

In het verleden zijn ook een aantal BTO-onderzoeken uitgevoerd die zich meer hebben gericht op het identificeren van processen en variabelen die groei van micro-organismen in het distributiesysteem bepalen. Een voorbeeld hiervan is het gezamenlijk BTO-onderzoek naar *Legionella pneumophila* dat in de periode 2002-2012 door Dick van der Kooij is opgezet. Binnen dit *L. pneumophila* onderzoek is veel gebruik gemaakt van experimenten op laboratoriumschaal met biofilmmonitoren. De resultaten van die experimenten hebben duidelijk gemaakt waar de waterkwaliteit, temperatuur en leidingmaterialen aan moeten voldoen om groei van *L. pneumophila* te voorkómen. Het resultaat is dat dit legionellaonderzoek, in tegenstelling tot de eerder beschreven "black box" benadering, heeft geresulteerd in concrete en goed onderbouwde aanbevelingen. Het lijkt daarom voor toekomstig BTO-onderzoek zinvol om metingen in de praktijk te complementeren met onderzoek op laboratoriumschaal.

Het overkoepelend doel van het project waar dit rapport onderdeel van uitmaakt, is om diverse microbiologische processen die zich afspelen in het distributiesysteem beter te begrijpen door praktijkmetingen te combineren met experimenten op laboratoriumschaal. De verwachting is dat met behulp van die kennis onderbouwde aanbevelingen gedaan kunnen worden over hoe de biologische stabiliteit tijdens distributie kan worden gehandhaafd of mogelijk zelfs verbeterd. Binnen het

zesjarenplan zijn meerdere onderzoeksvragen ten aanzien van distributie en microbiologische drinkwaterkwaliteit vastgesteld. Binnen het hier beschreven deelproject is gestart om een studie uit te voeren naar de eerste van deze onderzoeksvragen.

1.1 Microbiologische processen in biofilm buiswand/sediment

Hoewel de meeste (actieve) biomassa (ATP) in het distributiesysteem zich bevindt in de biofilm op de buiswand of in het sediment (Liu et al., 2014; 2017; van der Wielen & Lut, 2016), besteden de meeste studies naar drinkwatersystemen voornamelijk aandacht aan de biomassa die aanwezig is in het water. Onderzoek heeft tevens laten zien dat voor veel productielocaties geldt dat de bacteriën die dominant aanwezig zijn in het gedistribueerde water ook al aanwezig zijn in het reinwater van het productielocatie (Pinto et al., 2020; Roeselers et al., 2015). Het lijkt er daarom op dat actieve microbiologische processen in het distributiesysteem voornamelijk plaatsvinden in de biofilm op de buiswand of sediment. Welke metabole processen echter plaatsvinden in deze biofilms in het distributiesysteem is onbekend, evenals de rol van deze biofilms in de biologische stabiliteit van het water. Welke (groepen van) stoffen (carbonzuren, eiwitten, koolhydraten, langere vetzuren, etc.) worden afgebroken in het distributiesysteem en daarmee nagroeiproblematiek kunnen veroorzaken is onbekend. Daarnaast is de invloed van deeltjeskarakteristieken (weinig organische stof, veel organische stof, ijzer/mangaangehalte etc.) op deze biofilmgroei ook onbekend. Hierdoor blijft de dynamiek tussen micro-organismen in de biofilm op de buiswand en sediment, én bacteriën in de waterfase onduidelijk. Het ontbreken van dergelijke kennis is een belangrijke reden waarom het definiëren van effectieve en goed onderbouwde beheersmaatregelen in zuivering en distributie om de biologische stabiliteit van het drinkwatersysteem te verbeteren moeilijk is. Het onderzoek beschreven in deze rapportage poogt daarom op te helderen welke microbiologische metabole processen in het drinkwaterprocessen optreden. De doelstellingen van dit onderzoek zijn:

1. De dominante metabole microbiologische processen in drinkwater en de biofilm van de buiswand en in het sediment in kaart te brengen
2. De verschillen bepalen tussen verschillende productielocaties op basis van:
 - a. actieve biomassa (ATP) en wettelijke parameters nagroei (KG22 en *Aeromonas*)
 - b. samenstelling van de bacteriepopulaties
 - c. potentie van metabole processen in biofilm op buiswand, sediment en drinkwater

2 Materiaal en methoden

2.1 Monsterlocaties

In de zomer en vroege najaar van 2018 zijn op drie locaties, met verschillende verblijftijden en afstanden, bij drie verschillende voorzieningsgebieden (Seppe, De Laak en Braakman) water- en biofilmmonsters genomen (Tabel 1).

Tabel 1 Overzicht locaties bemonsteringen tijdens 2018.

Waterbedrijf	Productielocatie	Type water	Zuivering	Locatie	Monsterdatum	Verblijftijd
Brabant Water	Seppe	Grondwater	Beluchting en filtratie	Fijnaart	3-7-2018	24 uur
	Seppe			Helwijk	3-7-2018	48 uur
	Seppe			Willemstad	3-7-2018	72 uur
Oasen	De Laak	Grondwater	Beluchting en filtratie	Lexmond	20-9-2018	
	De Laak			Gorinchem	20-9-2018	
	De Laak			Sliedrecht	20-9-2018	
Evides	Braakman	Oppervlaktewater	UV, actief kool en chloordioxide	Hoek	14-9-2018	
	Braakman			Breskens	13-9-2018	
	Braakman			Sluis	13-9-2018	

2.2 Monstername

2.2.1 Drinkwatermonsters

Het reinwatermonster van de productielocatie dat het desbetreffende voorzieningsgebied voedt, werd als eerste genomen. Drinkwatermonsters uit het distributiesysteem werden bij consumenten genomen. Daarbij werd de watermeter tijdelijk vervangen door een passtuk en vervolgens werd hier direct een drinkwatermonster genomen, zodat de drinkwaterinstallatie van het gebouw geen invloed heeft gehad op de kwaliteit van het onderzochte drinkwatermonster.

2.2.2 Biofilmmonsters

2.2.2.1 Sediment

Op elke locatie in het distributiesysteem zijn sedimentmonsters genomen, door te spuien met 1 m/s. Tijdens het spuien is de troebelheid gemeten om de sediment piek waar te nemen, die piek laat zien dat er op het goede moment bemonsterd is (van der Kooij en van der Wielen, 2009). Het sediment is bemonsterd in een 20 liter vat, dat gedurende de hele spuiactie onder de spuikraan heeft gestaan. De volgende sedimentfracties zijn verzameld: >30 - < 100 µm, >100 - < 500 µm en >500 µm.

2.2.2.2 Leidingwand

Op elke bemonsterde locatie in het distributiesysteem werd een stuk PVC-U leiding uitgenomen. Een uitgebreid protocol hoe deze leidinguitnames zijn verricht is te vinden in bijlage I. Kort samengevat wordt de leiding uitgegraven en rondom vrijgemaakt van de bodem. Er wordt een ontwateringspomp gebruikt om de gegraven put vrij te houden van water. De leiding wordt ontwaterd door eerst een klein sleufje te zagen. Vervolgens

wordt met twee zaagsneden het stuk leiding uitgezaagd. Deze wordt vervolgens verpakt in steriele zakken en koel (4°C) vervoerd naar het KWR laboratorium.

Op het microbiologische laboratorium van KWR werden de uitgenomen leidingen op vier plekken bemonsterd (± 2 cm van de uitgezaagde rand): de onderkant, beide zijkanten en de bovenkant. De bemonstering werd gedaan door de biofilm van een bepaald oppervlakte (~ 10 cm²) met een steriel wattenstaafje af te nemen (swabben), waarna het wattenstaafje in 10 ml steriel leidingwater werd gedaan. Vervolgens werd het behandeld met vier keer 2 minuten LES (Low Energy Sonification bij 40 KHz), waar na iedere behandeling het volume werd opgevangen gevolgd door het opnieuw toevoegen van 10 ml steriel leidingwater, zodat per geswabd oppervlakte in totaal 40 ml werd verkregen. De vier plekken die van een leiding werden geswabd zijn vervolgens gepoold, zodat een totaal volume van 160 ml werd verkregen.

2.3 Analyses

2.3.1 Adenosinetrifosfaat (ATP)

ATP is aanwezig in alle levende organismen en is een maat voor de hoeveelheid actieve biomassa. De ATP bepaling berust op de luciferine-luciferase reactie, waarbij ATP onder vorming van licht (een foton per molecuul ATP) overgaat in adenosinedifosfaat (ADP). Met behulp van lichtgevoelige apparatuur kan de lichtproductie nauwkeurig worden gemeten. De werkwijze levert binnen enkele minuten een resultaat op. De detectiegrens van de bepaling bij direct onderzoek van drinkwater bedraagt ca. 1 ng ATP l⁻¹. De ATP-bepaling wordt gebruikt voor de bepaling van de biomassaconcentratie in leidingwater en van de biofilms. De ATP concentratie van de biofilm op de leidingwand wordt weergegeven in pg ATP cm⁻², terwijl de concentratie van drinkwater en van de biofilm op het sediment wordt weergegeven in ng l⁻¹. Om de ATP-concentratie van de biofilms en drinkwater met elkaar te kunnen vergelijken zijn deze omgerekend naar ng ATP per meter buislengte met een diameter van 110 mm. Om de concentratie van het reinwater met deze monsters te kunnen vergelijken, is ook het reinwater op dezelfde manier omgerekend naar ng ATP per meter buis.

De ATP-analyse is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-002.

2.3.2 *Aeromonas*

Detectie van *Aeromonas*-bacteriën met behulp van de kweekmethode is uitgevoerd conform NEN 6263. De bepalingsgrens van de methode komt overeen met 1 kolonievormende eenheid per 100 ml (1 kve 100 ml⁻¹). Voor het kwantificeren van de *Aeromonas*-bacteriën worden watermonsters en gesuspendeerde biofilmmonsters gefiltreerd door een membraanfilter, uitgespateld op Ampicilline Dextrine Agar (ADA) en vervolgens 24 uur geïncubeerd bij 30°C. Kolonies met een kenmerkende morfologie (geel) worden geteld. De wettelijke eis van *Aeromonas* in het drinkwater bemonsterd na doorstroming aan de keukenkraan is < 1000 kve 100 ml⁻¹. De resultaten voor de biofilms en drinkwater zijn omgerekend naar kve per meter buislengte met een diameter van 110 mm. Om de aantallen van het reinwater met deze monsters te kunnen vergelijken, is ook het reinwater op dezelfde manier omgerekend naar kve per meter buis.

De *Aeromonas*-analyse is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-022.

2.3.3 Koloniegetal bij 22°C

Deze bepaling conform NEN-EN-ISO 6222 telt het aantal heterotrofe bacteriën dat aanwezig is in het water en biofilm en kolonies vormt op een PCA voedingsmedium na 3 dagen incuberen bij 22°C. Dit is een standaardbepaling in drinkwater, en deze parameter is ook opgenomen als norm in het drinkwaterbesluit. De wettelijke eis is dat het geometrisch jaargemiddelde van KG22 in drinkwater bemonsterd na doorstroming (tot de watertemperatuur 30 seconden constant is) aan de keukenkraan lager is dan 100 kve ml⁻¹. De resultaten van de biofilms en water zijn omgerekend naar kve per meter buislengte met een diameter van 110 mm. Om de aantallen van het reinwater met deze monsters te kunnen vergelijken, is ook het reinwater op dezelfde manier omgerekend naar kve per meter buis.

De KG22-analyse is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-032.

2.4 DNA en RNA isolatie

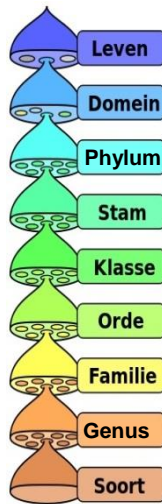
Elk water- en biofilmmonster (1 liter en 50 ml respectievelijk) werd gefiltreerd door een 0,22µm filter, waarna de filters met een DNA suspensie van een interne controle werden opgeslagen bij -20°C. Later werd DNA uit deze filters geïsoleerd met de DNeasy PowerBiofilm kit (Qiagen). De DNA isolatie is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-069.

RNA isolatie is uitgevoerd met de RNeasy® PowerMicrobiome® kit (Qiagen), volgens instructies van de fabrikant. Het RNA is vervolgens omgezet in complementair-DNA (cDNA) gebruik makend van iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-Rad) (volgens instructies van de fabrikant).

2.5 Microbial profiling

Gebarcodeerde fragmenten van het 16S rRNA gen (~300bp), gericht op de V4 hypervariabele regio, werden geamplificeerd uit de DNA extracties en uit het cDNA d.m.v. qPCR, gebruik makend van de primers 515F en 806R. Er zijn totaal 66 monsters geanalyseerd met microbial profiling. Negatieve controles (blanco van DNase/RNase vrij water tijdens filtratie en tijdens PCR) zijn meegenomen. De DNA-sequentie is bepaald van de gezuiverde PCR producten met de Illumina MiSeq sequencer bij KWR. Deze DNA-sequenties zijn vervolgens geanalyseerd met behulp van het specialistische computerprogramma Mothur (Schloss et al. 2009). Dit programma zorgt voor verbetering van de sequentiedata door eerst een aantal stappen uit te voeren waarin eventuele fouten uit de sequentiedata worden verwijderd, vervolgens wordt een programma toegepast waarmee chimeersequenties (artefacten die t.g.v. de PCR-reacties kunnen ontstaan) worden verwijderd. Na deze verbeteringsstappen worden sequenties ingedeeld in "Operational Taxonomic Units" (OTU's). Daarbij worden alle 16S rRNA gensequenties met een sequentieovereenkomst van minimaal 97% ingedeeld binnen één OTU. Ten slotte gaat het programma in een database op zoek naar 16S rRNA gensequenties van geïdentificeerde bacteriën die overeenkomen met de sequenties van de OTU's uit de dataset (filytypering). Bij deze filytypering wordt elke sequentie vergeleken met een referentiesequentiedatabase (Silva v128-V4) die internationaal beschikbaar is en vervolgens taxonomisch ingedeeld (Figuur 1) of op naam gebracht op basis van de gelijkheid met de referentiesequentie. Het taxonomisch niveau waarop de sequentie op naam kan worden gebracht hangt af van de aanwezigheid van overeenkomende sequenties in de referentiedatabase en de kwaliteit van de sequentie. Indien op bijvoorbeeld genusniveau een overeenkomende referentiesequentie ontbreekt, maar op familieniveau wel een overeenkomende referentiesequentie aanwezig is, dan zal de sequentie op genusniveau als "onbekend/unclassified" worden

getypeerd, maar op familieniveau wel tot een familienaam kunnen worden benoemd. Voor drinkwater gerelateerde monsters geldt dat identificatie tot genusniveau vaak niet mogelijk is door het (nog) ontbreken van beschreven overeenkomende soorten in de database die tot hetzelfde genus behoren. Daarnaast is het geanalyseerde stuk 16S rRNA gen te kort om de sequenties tot soortniveau in te kunnen delen. De figuren zijn vervolgens gegenereerd met het statistisch programma R en de pakketten phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) en ampvis2 (Anderson et al., 2018).



Figuur 1 De hiërarchie van de acht belangrijkste taxonomische rangen, tussenliggende rangen zijn niet afgebeeld.

Een Principle Coordinate Analysis (PCoA) plot is een manier om de verschillen in de OTU samenstelling tussen de individuele monsters te visualiseren in een dataset. De PCoA plots zijn gemaakt in R met het pakket phyloseq en zijn gebaseerd op de Bray-Curtis afstand.

De Shannon diversity index meet de diversiteit van de bacteriesamenstelling, rekening houdend met het aantal OTU's en de verdeling van het aantal sequenties over de OTU's. De Shannon boxplots zijn gemaakt in R met het pakket ampvis2 waarbij de drie locaties per monster zijn gemiddeld.

2.6 Metagenoomanalyse

2.6.1 Functionele genen

Ter voorbereiding van de metagenoomanalyse werd geconstateerd dat de DNA opbrengst per monster te weinig was voor een adequate analyse. Daarom is besloten om per voorzieningsgebied de drie monsters met een gelijke matrix (drinkwater, sediment of leidingwand) te poolen om zo wel te voldoen aan de minimale DNA concentratie-eis die nodig is om een betrouwbare metagenoomanalyse uit te voeren.

De metagenoomanalyses zijn door Baseclear uitgevoerd. Bij deze analyses heeft Baseclear gebruik gemaakt van een Illumina HiSeq sequencer. Met deze sequencer is het mogelijk om tijdens één analyse de sequentie van een zeer groot aantal fragmenten te bepalen. Bij deze methode worden alle DNA fragmenten gesequenced, dus naast micro-organismen ook die van planten en dieren. De lengte van deze fragmenten is korter dan bij het gebruik van de Illumina MiSeq (maximaal 2x 300 bp bij Miseq en

maximaal 2 X 150 bp bij HiSeq). Na het bepalen van de sequenties zijn bioinformaticatools door Baseclear gebruikt voor de interpretatie van de metagenoomdata. Bij deze analyses zijn eerst de sequenties korter dan 150 bp en sequenties met lage kwaliteit (op basis van Phred scores) uit de dataset verwijderd. Vervolgens zijn de overgebleven fragmenten zoveel mogelijk samengevoegd (geassembleerd) zodat langere fragmenten ontstaan m.b.v. metaSPAdes (Nurk et al., 2017). Daarna zijn er verschillende analyses uitgevoerd op de geassembleerde sequenties (scaffolds). MOCAT2 (Kultima et al., 2012) is gebruikt voor het identificeren van functionele genen ("functional profiling"), functionele metabole routes ("pathways") en functionele metabole processen in de dataset waarbij gebruik gemaakt is van de KEGG databases (Kanehisa et al., 2012). Verdere data analyse is in de resultaten uitgelegd om de leesbaarheid van dit rapport te verhogen.

2.6.2 Metagenoombinning

De verkregen functionele genen uit de metagenoomdata zijn ook door BaseClear gesorteerd per bacteriesoort (OTU), zodat duidelijk wordt bij welke bacterie een bepaalde set aan functionele genen horen. Dit proces heet binning. Dit is gedaan om te achterhalen of van de functionele genen die aanwezig zijn, ook een gehele functionele metabole route (= proces) in één micro-organisme aanwezig is. Wanneer de functionele genen van een gehele metabole route binnen één micro-organisme aanwezig zijn, kan worden geconcludeerd dat dit metabole proces ook daadwerkelijk operationeel kan zijn. Hierbij wordt verwacht dat de functionele genen die het meest aanwezig zijn in de monsters afkomstig zijn van de micro-organismen die het meest voorkomen in de monsters. Wanneer van deze micro-organismen de metabole routes in kaart gebracht zijn, is met zekerheid te achterhalen wat de metabolische potentie van deze micro-organismen is. Doordat de analyse op het DNA is gedaan achterhaald deze methodiek alleen de metabolische potentie, omdat onduidelijk blijft of de aanwezige genen ook actief worden afgeschreven tot enzymen in het drinkwaterdistributiesysteem. Binning van de negen metagenoommonsters (zie 2.6) is gedaan op de ruwe, ongefilterde metagenoomdata met behulp van MaxBin v2.2.7 (Wu et al, 201) onder de standaardinstellingen, met een minimum contig lengte van 150 bp. Voor details over de MaxBin methode wordt gerefereerd naar de volgende webpagina:

https://downloads.jbei.org/data/microbial_communities/MaxBin/README.txt.

Verdere data analyse en uitleg over metagenoomanalyse wordt in de resultaten uitgelegd om de leesbaarheid van dit rapport te verhogen.

3 Resultaten

3.1 Sedimentvolumes en troebelheid spuiacties

De sedimentvolumes van de verschillende fracties zijn per locatie weergegeven in Tabel 2. De troebelheid die tijdens de spuiacties zijn gemeten zijn weergegeven in grafieken (Bijlage II).

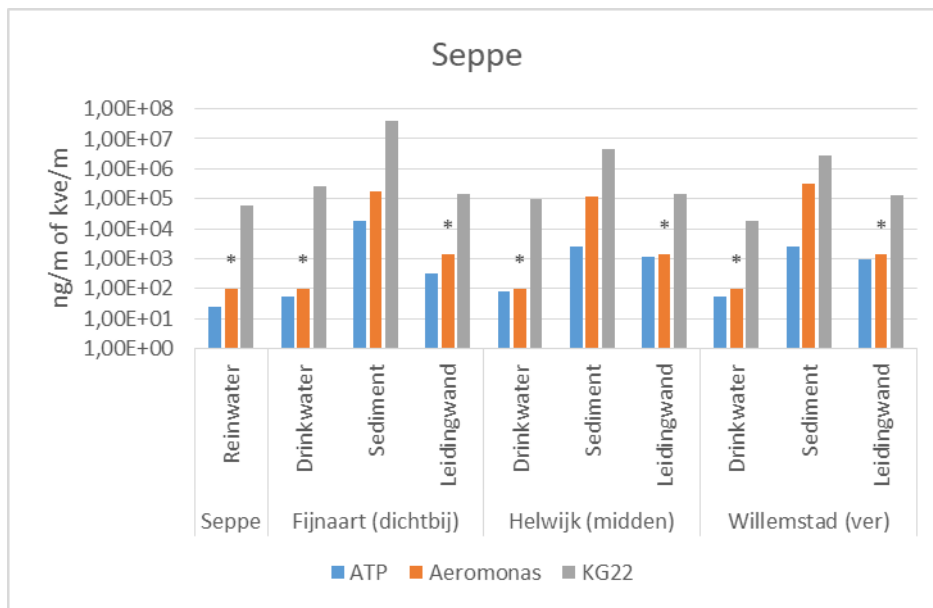
Tabel 2 Sedimentvolumes in ml per fractie.

Productielocatie	Locatie	30µm	100µm	500µm
Seppe	Fijnaart	130	9,5	0,1
	Helwijk	4,5	-	0,2
	Willemstad	25	4,5	2,5
De Laak	Lexmond	1,1	0,3	0,1
	Gorinchem	3	0,1	0,5
	Sliedrecht	3,5	1	35
Braakman	Hoek	58	5	20
	Breskens	85	6	1,1
	Sluis	61	7	7,5

3.2 ATP, KG22 en *Aeromonas*

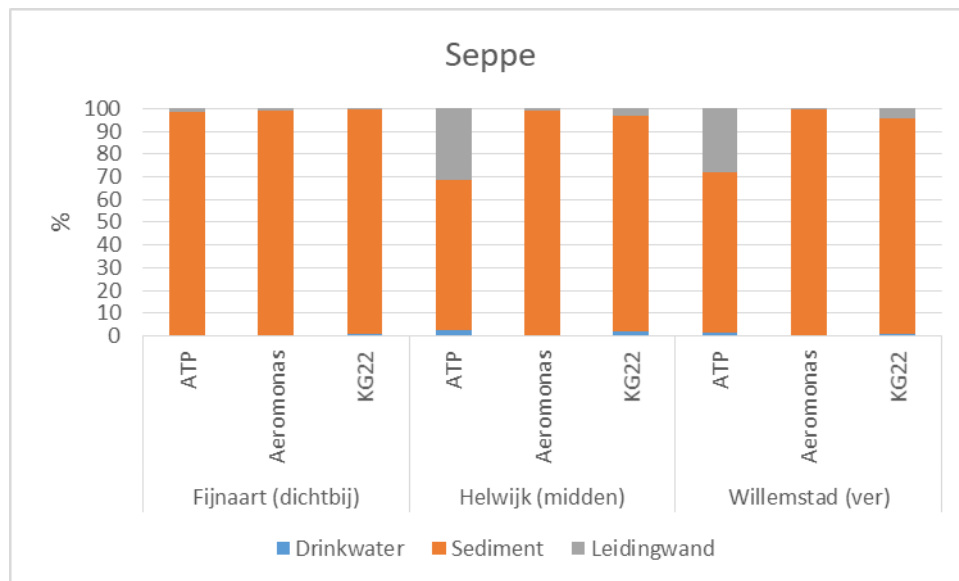
3.2.1 Productielocatie Seppe

De ATP, KG22 en *Aeromonas* resultaten van productielocatie Seppe zijn weergegeven in Figuur 2. De ATP concentratie in het reinwater, omgerekend naar een meter leiding, is 25 ng m⁻¹. Op de locatie dichtbij (Fijnaart) de productielocatie is de ATP concentratie van het drinkwater omgerekend 57 ng m⁻¹, van het sediment 17.993 ng m⁻¹ en op de leidingwand 314 ng m⁻¹. Op de middenlocatie (Helwijk) is de ATP concentratie van het drinkwater omgerekend 86 ng m⁻¹, van het sediment 2.480 ng m⁻¹ en op de leidingwand 1.175 ng m⁻¹. Bij de locatie veraf (Willemstad) van de productielocatie is de ATP concentratie van het drinkwater omgerekend 55 ng m⁻¹, van het sediment 2.510 ng m⁻¹ en op de leidingwand 1.002 ng m⁻¹. De aantallen van KG22 variëren van 1,9 × 10⁴ kve m⁻¹ tot 4,2 × 10⁷ kve m⁻¹, de hoogste aantallen worden in het sediment aangetroffen, terwijl de aantallen voor drinkwater en leidingwand vergelijkbaar zijn. In het voorzieningsgebied van Seppe is *Aeromonas* alleen in het sediment waargenomen, niet in de drinkwater- en leidingwandmonsters (onder de detectiegrens). De ATP concentratie en de KG22 en *Aeromonas* aantallen van het water, sediment en biofilm lijken geen duidelijke trend te laten zien met afstand/verblijftijd tot het productielocatie.



Figuur 2 ATP concentratie en aantallen KG22 en *Aeromonas* in het (rein) water en de biofilm (omgerekend naar meter leiding met diameter 110 mm), en op drie locaties (begin, midden en eind) in het voorzieningsgebied van productielocatie Seppe van Brabant Water. De asterisken geven het onder de detectiegrens is.

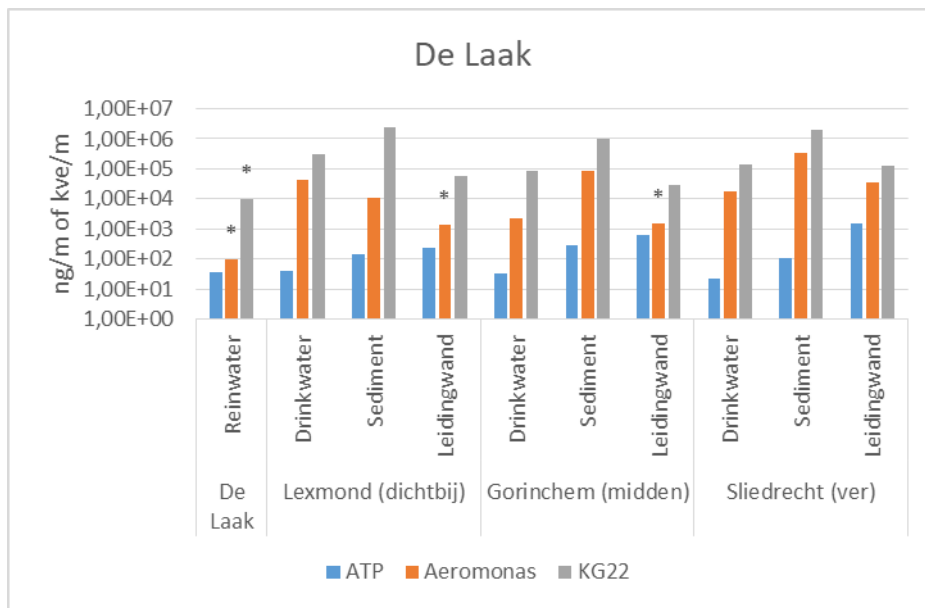
De relatieve verdeling van ATP, *Aeromonas* en KG22 over de verschillende niches zijn bepaald per monster om zo de belangrijkste niche (drinkwater, sediment, leidingwand) voor de drie microbiologische parameters vast te stellen (Figuur 3). In Fijnaart wordt de meeste ATP, *Aeromonas* en KG22 teruggevonden in het sediment >98%, het aandeel actieve biomassa (ATP) van de biofilm op de leidingwand was 1,7% en dat van drinkwater 0,3%. In Helwijk wordt 2,3% van de actieve biomassa aangetroffen in het drinkwater, 66,3% in het sediment en 31,4% in de biofilm op de leidingwand. Voor *Aeromonas* wordt 0,1% aangetroffen in het drinkwater, 98,7% in het sediment en 1,2% op de leidingwand. Voor KG22 wordt 2,1% aangetroffen in het drinkwater, 94,9% in het sediment en 3,0% op de leidingwand. In Willemstad wordt 1,5% van de actieve biomassa aangetroffen in het drinkwater, 70,4% in het sediment en 28,1% op de leidingwand. Voor *Aeromonas* wordt 99,5% aangetroffen in het sediment en de rest op de leidingwand. Voor KG22 wordt 0,7% aangetroffen in het drinkwater, 94,8% in het sediment en de overige 4,5% op de leidingwand. Deze resultaten laten zien dat het sediment een zeer dominante niche is voor KG22 en *Aeromonas*. De meeste actieve biomassa bevindt zich ook in het sediment, maar ook de biofilm op de leidingwand bevat een belangrijk deel van de actieve biomassa.



Figuur 3 Percentage ATP, *Aeromonas* en KG22 van de drie verschillende monsters per locatie in het voorzieningsgebied van productielocatie Seppe van Brabant Water.

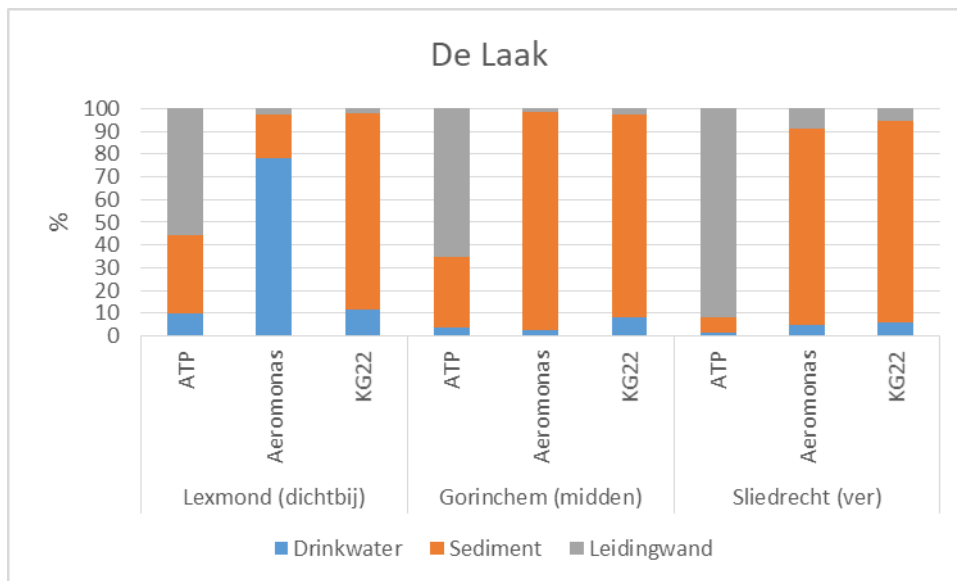
3.2.2 Productielocatie De Laak

De ATP, KG22 en *Aeromonas* resultaten van de productielocatie De Laak zijn weergegeven in Figuur 4. De ATP concentratie in het reinwater, omgerekend naar een meter leiding, is 38 ng m^{-1} . Op de locatie dichtbij (Lexmond) de productielocatie is de ATP concentratie van het drinkwater omgerekend 41 ng m^{-1} , van het sediment 140 ng m^{-1} en op de leidingwand 228 ng m^{-1} . Op de middenlocatie (Gorinchem) is de ATP concentratie van het drinkwater omgerekend 33 ng m^{-1} , van het sediment 299 ng m^{-1} en op de leidingwand 622 ng m^{-1} . Bij de locatie veraf (Sliedrecht) van de productielocatie is de ATP concentratie van het drinkwater omgerekend 23 ng m^{-1} , van het sediment 110 ng m^{-1} en op de leidingwand 1486 ng m^{-1} . De ATP-concentratie van het drinkwater lijkt tijdens transport in het distributiesysteem af te nemen, terwijl de ATP-concentratie van de biofilm lijkt toe te nemen met de afstand/verblijftijd tot de productielocatie. De aantallen van KG22 variëren van $9,5 \times 10^3 \text{ kve m}^{-1}$ tot $2,6 \times 10^6 \text{ kve m}^{-1}$, waarbij de hoogste aantallen in het sediment worden aangetroffen. In het voorzieningsgebied van De Laak wordt *Aeromonas* in de meeste monsters waargenomen. Uitzonderingen hierop zijn het reinwater en twee van de drie leidingwandbiofilmmonsters. De *Aeromonas* aantallen variëren van $2,4 \times 10^3 \text{ kve m}^{-1}$ tot $3,3 \times 10^5 \text{ kve m}^{-1}$, waarbij de hoogste aantallen ook in het sediment worden aangetroffen. De KG22 en *Aeromonas* aantallen van het water en biofilm lijken geen duidelijke trend te laten zien met afstand/verblijftijd tot de productielocatie.



Figuur 4 ATP concentratie en aantallen KG22 en *Aeromonas* in het (rein) water en de biofilm (omgerekend naar meter leiding met diameter 110 mm), en op drie locaties (begin, midden en eind) in het voorzieningsgebied van productielocatie De Laak van Oasen. De asterisken geven het onder de detectiegrens is.

De percentages ATP, *Aeromonas* en KG22 zijn bepaald per monster om zo de belangrijkste niche vast te stellen (Figuur 5). In Lexmond is 10,0% van de actieve biomassa aangetroffen in het drinkwater, 34,2% in het sediment en 55,8% in de biofilm op de leidingwand. Voor *Aeromonas* is 78,3% aangetroffen in het drinkwater, 19,1% in het sediment en 2,5% in de biofilm op de leidingwand en voor KG22 is 11,5% aangetroffen in het drinkwater, 86,4% in het sediment en 2,0% in de biofilm op de leidingwand. In Gorinchem is 3,5% actieve biomassa aangetroffen in het drinkwater, 31,4% in het sediment en 65,2% in de biofilm op de leidingwand. Voor *Aeromonas* is 2,7% aangetroffen in het drinkwater 95,6% in het sediment en 1,7% op de leidingwand, terwijl voor KG22 8,0% is aangetroffen in het drinkwater, 89,3% in het sediment en 2,8% in de biofilm op de leidingwand. In Sliedrecht is 1,4% van de actieve biomassa aangetroffen in het drinkwater, 6,8% in het sediment en 91,8% in de biofilm op de leidingwand. Voor *Aeromonas* is 4,7% aangetroffen in het drinkwater, 86,4% in het sediment en 8,9% in de biofilm op de leidingwand. Voor KG22 is 6,2% aangetroffen in het drinkwater, 88,2% in het sediment en de overige 5,7% in de biofilm op de leidingwand. Uit deze resultaten volgt dat KG22 voornamelijk in het sediment aanwezig zijn op deze drie locaties in het distributiesysteem van de Laak. *Aeromonas* was op twee van de drie locaties ook voornamelijk aanwezig in het sediment, maar op de andere locatie domineerde *Aeromonas* in het drinkwater. Daarentegen is de actieve biomassa (ATP) vooral aanwezig in de biofilm op de leidingwand.

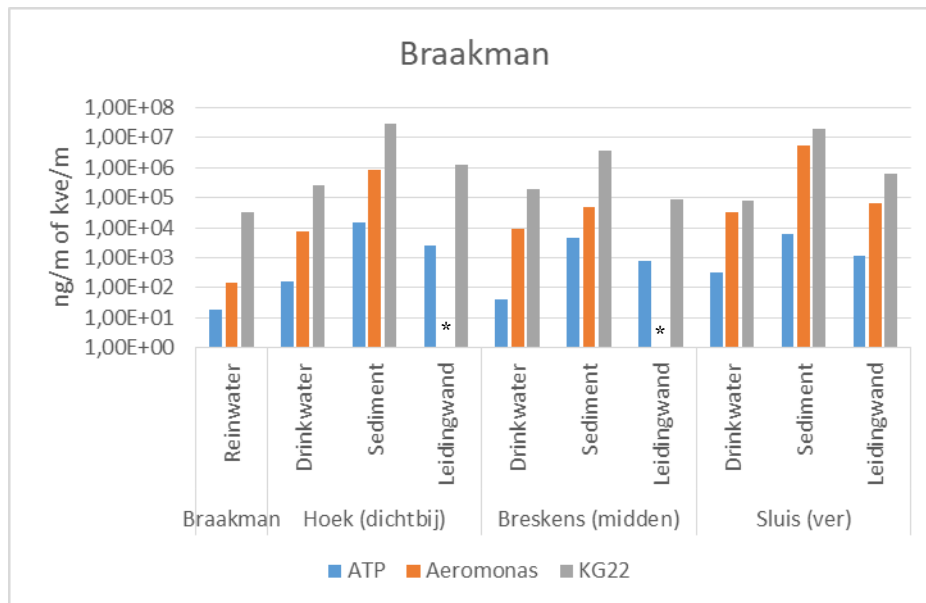


Figuur 5 Percentage ATP, *Aeromonas* en KG22 van de monsters per locatie in het voorzieningsgebied van productielocatie De Laak van Oasen.

3.2.3 Productielocatie Braakman

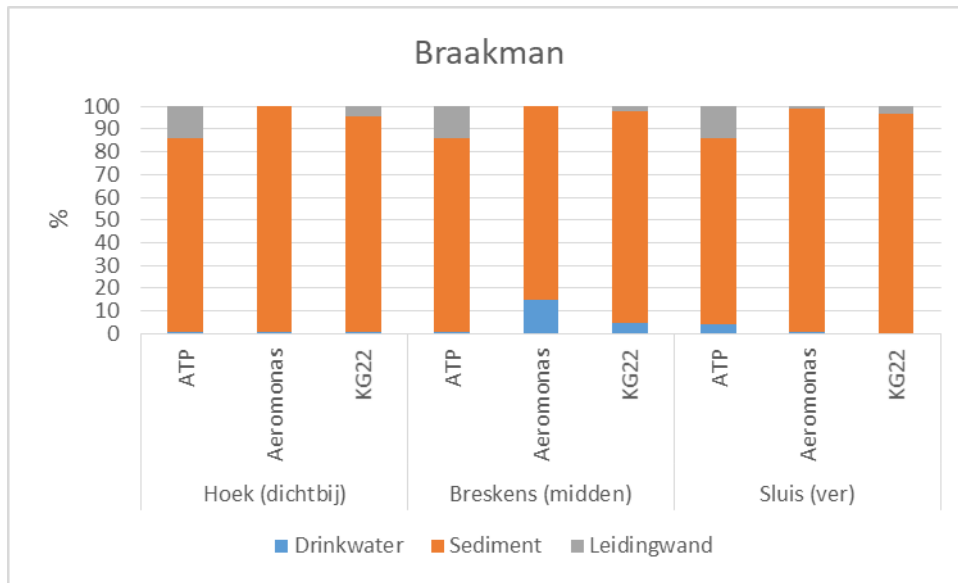
De ATP, KG22 en *Aeromonas* resultaten van productielocatie Braakman zijn weergegeven in

Figuur 6. De ATP concentratie in het reinwater, omgerekend naar een meter leiding, is 19 ng m^{-1} . Op de locatie dichtbij (Hoek) de productielocatie is de ATP concentratie van het drinkwater omgerekend 162 ng m^{-1} , van het sediment 15.039 ng m^{-1} en op de leidingwand 2453 ng m^{-1} . Op de middenlocatie (Breskens) is de ATP concentratie van het drinkwater omgerekend 41 ng m^{-1} , van het sediment 4.614 ng m^{-1} en op de leidingwand 760 ng m^{-1} . Bij de locatie veraf (Sluis) van de productielocatie is de ATP concentratie van het drinkwater omgerekend 314 ng m^{-1} , van het sediment 6431 ng m^{-1} en op de leidingwand 1106 ng m^{-1} . De aantallen van KG22 variëren van $3,3 \times 10^5 \text{ kve m}^{-1}$ tot $2,8 \times 10^7 \text{ kve m}^{-1}$; de hoogste aantallen worden in het sediment aangetroffen. In het voorzieningsgebied van Braakman is ook *Aeromonas* waargenomen in alle monsters. De aantallen variëren daarbij van 143 kve m^{-1} tot $5,4 \times 10^6 \text{ kve m}^{-1}$, met de hoogste aantallen in het sediment. Helaas ontbreken de *Aeromonas* aantallen van de leidingwand van Hoek en Breskens. De ATP-concentratie, KG22 en *Aeromonas* aantallen van het water en biofilm lijkt geen duidelijke trend te laten zien met afstand/verblijftijd tot de productielocatie.



Figuur 6 ATP concentratie en aantallen KG22 en *Aeromonas* in het (rein) water en de biofilm (omgerekend naar meter leiding met diameter 110 mm), en op drie locaties (begin, midden en eind) in het voorzieningsgebied van productielocatie Braakman van Evides. De asterisk geeft de missende waardes aan.

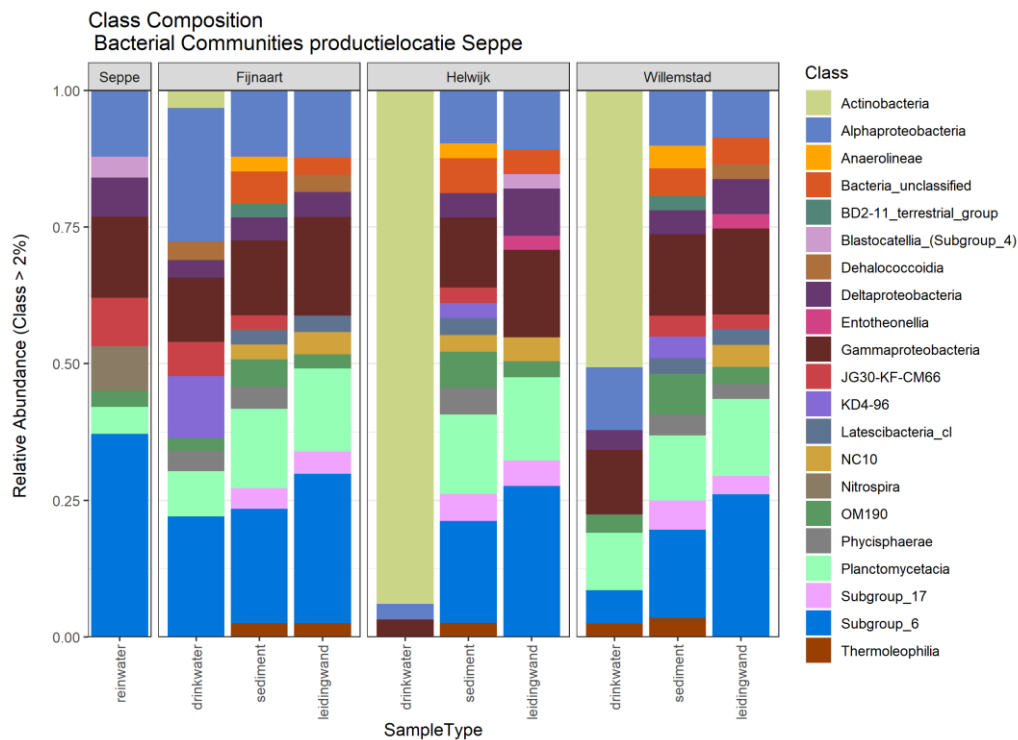
De percentages ATP, *Aeromonas* en KG22 zijn bepaald per monster om zo de belangrijkste niche vastte stellen (Figuur 7). In Hoek wordt 0,9% van de actieve biomassa aangetroffen in het drinkwater, 85,2% in het sediment en 13,9% in de biofilm op de leidingwand. Voor *Aeromonas* wordt 0,9% aangetroffen in het drinkwater en de overige 99,1% in het sediment. 0,9% van de KG22 wordt aangetroffen in het drinkwater, 94,8% in het sediment en 4,3% op de leidingwand. In Breskens wordt 0,8% van de actieve biomassa aangetroffen in het drinkwater, 85,2% in het sediment en 14,0% op de leidingwand. Voor *Aeromonas* wordt 15% aangetroffen in het drinkwater, en de overige 85% in het sediment. Voor KG22 wordt 4,9% aangetroffen in het drinkwater, 92,8% in het sediment en 2,3% op de leidingwand. In Sluis wordt 4,0% van de actieve biomassa aangetroffen in het drinkwater, 81,9% in het sediment en 14,1% in de biofilm op de leidingwand. Voor *Aeromonas* wordt 0,6% aangetroffen in het drinkwater, 98,3% in het sediment en 1,1% op de leidingwand. Voor KG22 wordt 0,4% aangetroffen in het drinkwater, 96,3% in het sediment en de overige 3,3% in de biofilm op de leidingwand. Het is duidelijk te zien dat *Aeromonas* en KG22 vooral in sediment aanwezig zijn. De actieve biomassa (ATP) is ook voornamelijk aanwezig in het sediment, maar een substantieel deel (~ 14%) is ook aanwezig in de biofilm op de leidingwand.



Figuur 7 Percentage ATP, *Aeromonas* en KG22 van de monsters per locatie in het voorzieningsgebied van productielocatie Braakman van Evides.

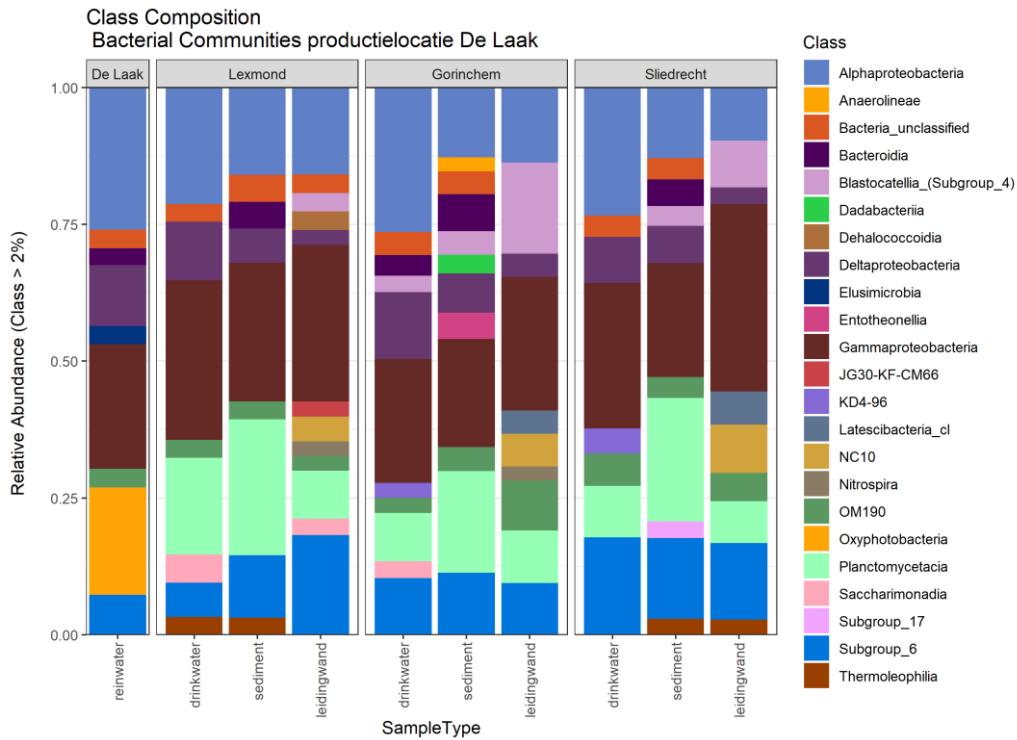
3.3 Microbial profiling

Naast ATP, *Aeromonas* en KG22 is ook de samenstelling van de bacteriegemeenschap van de verschillende monsters bepaald met microbial profiling. Met deze analyse zijn in totaal 140.746 unieke OTU's in de monsters aangetroffen. Figuur 8 laat de sequentieverdeling over de taxonomische Klassen zien, waarbij alleen de Klassen zijn weergegeven waarbij de sequenties die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie van elk monster van productielocatie Seppe. Te zien is dat een deel van aangetroffen Klassen bij de meeste monsters genomen in het voorzieningsgebied en reinwater van ps Seppe zijn aangetroffen. Monsters die hier een uitzonderingen op zijn, zijn de drinkwatermonsters van Helwijk en Willemstad, waar beduidend meer *Actinobacteria* aanwezig zijn dan in de andere monsters. Sowieso is de Klasse *Actinobacteria* alleen met meer dan 2% in drinkwater en niet in sediment of op de leidingwand aangetroffen. Vrijwel alle Klassen die met meer dan 2% in het reinwater worden aangetroffen, worden ook met meer dan 2% waargenomen in het drinkwater en/of sediment en leidingwand behalve *Nitrospira*. De Klassen 'Subgroep 17', 'NC10' en 'Bacteria unclassified' zijn wel met meer dan 2% in de biofilm van de leidingwand en sediment waargenomen, maar niet in het drinkwater. De Klassen *Anaerolineae* en 'BD2-11 terrestrial group' zijn alleen met meer dan 2% in het sediment aangetroffen en niet in de andere twee matrices, terwijl *Entotheonellia* alleen met meer dan 2% in de biofilm op de leidingwand is waargenomen. *Alphaproteobacteria* en *Gammaproteobacteria* komen in ieder monster met meer dan 2% voor.



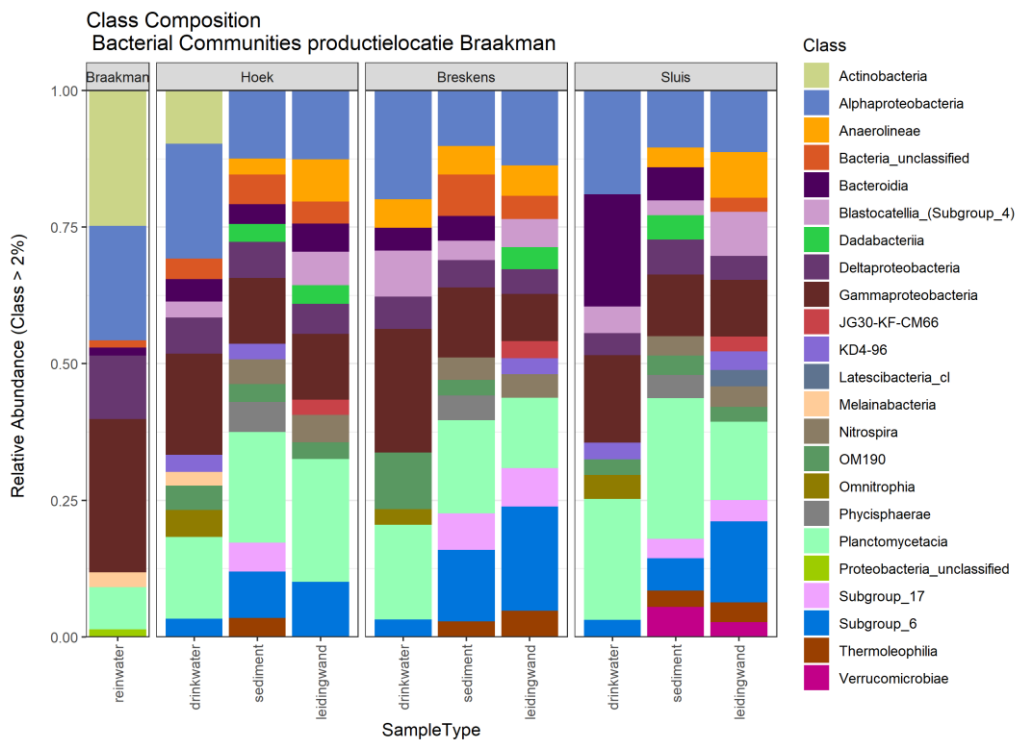
Figuur 8 Klassen die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie in water en biofilm monsters van voorzieningsgebied Seppe van Brabant Water.

Figuur 9 laat de Klassen zien die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie van elk monster van voorzieningsgebied De Laak. Te zien is dat de monsters op Klassenniveau op elkaar lijken, *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, OM190 en Subgroup_6 komt in ieder monster met meer dan 2% voor. Klasse *Elusimicrobia* en *Oxyphotobacteria* komen alleen met meer dan 2% voor in het reinwater van De Laak voor. *Entotheonellia*, *Dadabacteria*, *Anaerolineae* en 'subgroup 17' zijn alleen met meer dan 2% in het sediment aangetroffen, maar slechts bij één van de drie sedimentmonsters. Nitrospira, 'NC10', Latescibacteria, 'JG30-KF-CM66' en Dehalococcoidia zijn allen met meer dan 2% in de biofilm op de leidingwand waargenomen.



Figuur 9 Klassen die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie in water en biofilm monsters in voorzieningsgebied De Laak van Oasen.

Figuur 10 laat de Klassen zien die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie van elk monster van productielocatie Braakman. Te zien is dat de monsters op Klassenniveau op elkaar lijken, maar de drinkwatermonsters lijken minder op de sediment- en biofilmmonsters. De Klassen *Melainabacteria* en *Actinobacteria* komen alleen met meer dan 2% voor in het reinwater en in het drinkwatermonster van Hoek. Klasse *Omnitrophia* komt met meer dan 2% voor in alle drinkwatermonsters, maar niet in het sediment of in de biofilm op de leidingwand in het voorzieningsgebied van productielocatie Braakman. *Verrucomicrobiae*, *Thermoleophilia*, 'subgroep 17', *Nitrospira*, 'KD4-96' en *Dadabacteria* komen alleen met meer dan 2% voor in de biofilm op het sediment en leidingwand. *Physicphaerae* is de enige Klasse die met meer dan 2% voorkomt in alle sedimentmonsters, maar niet in de andere matrices. 'JG30-KF-CM66' en *Latescibacteria* zijn alleen met meer dan 2% aangetroffen in de biofilm op de leidingwand, waarbij de eerste Klasse in alle drie de biofilmmonsters werd aangetroffen en de laatste slechts in één van de drie leidingwandbiofilmmonsters. *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* en *Planctomycetacia* komen met meer dan 2% in ieder monster voor.



Figuur 10 Klassen die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie in water en biofilm monsters van voorzieningsgebied Braakman van Evides.

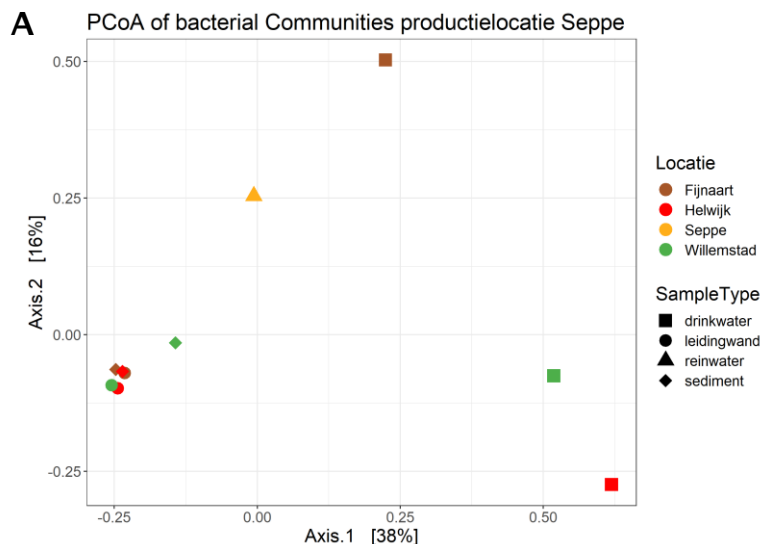
De bacteriesamenstelling tussen de verschillende monsters (reinwater, drinkwater, sediment en leidingwand) is ook op OTU niveau bepaald en het verschil in de OTU-samenstelling tussen monsters is weergegeven met behulp van een Principle Coordinate analysis (PCoA). Des te dichter monsters bij elkaar liggen in een PCoA plot, des te minder de bacteriesamenstelling tussen de monsters verschillen. In Figuur 11 zijn dergelijke PCoA plot weergegeven voor de monsters genomen bij productielocatie Seppe. In dit figuur worden de verschillende matrices weergegeven door verschillende symbolen en de verschillende bemonsterde locaties hebben verschillende kleuren. Daarnaast heeft de figuur twee assen die gebaseerd zijn op factoren die de variantie

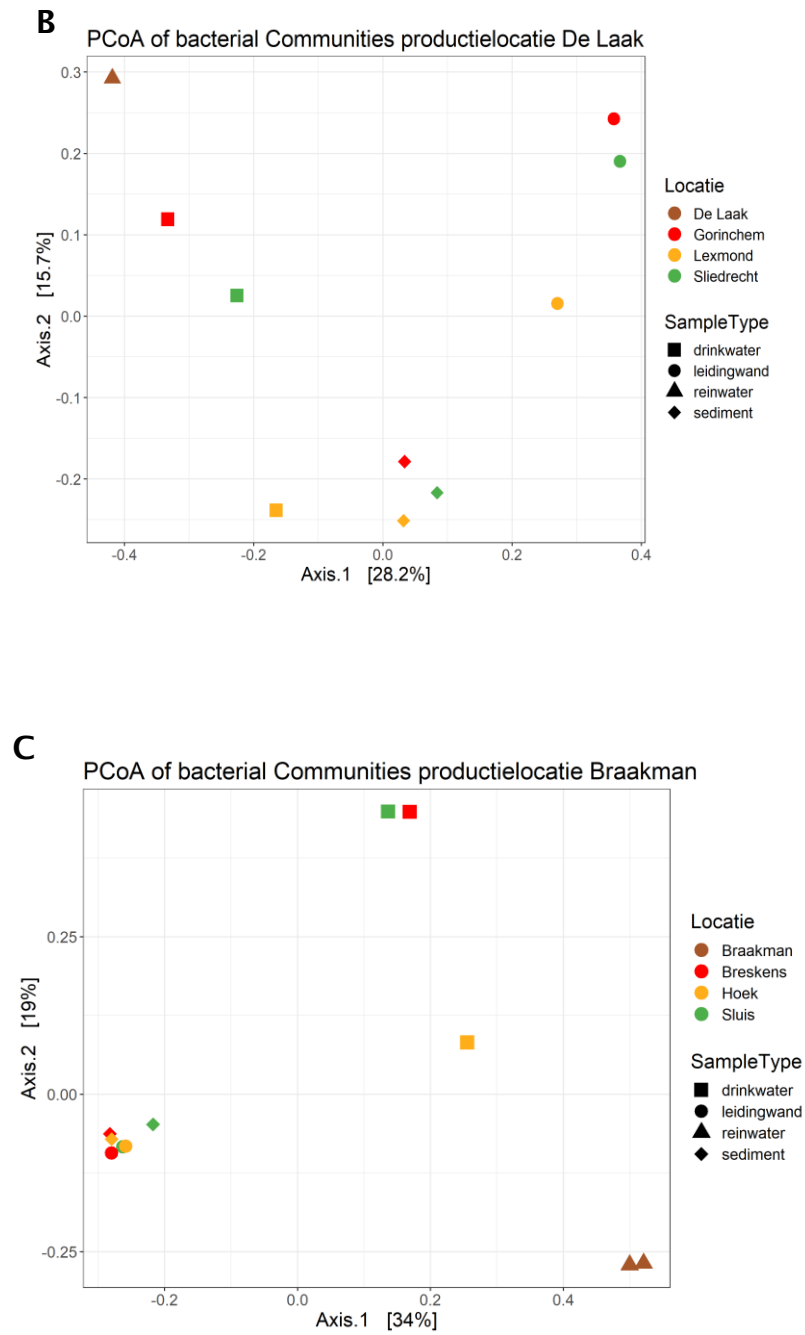
uitleggen. In Figuur 11 A bijvoorbeeld wordt 54% (38+16%) van de variantie verklaard met deze twee assen.

De resultaten gevisualiseerd in Figuur 11A laten zien dat voor productielocatie Seppe de bacteriesamenstelling van het sediment en de leidingwand dicht bij elkaar clusteren, terwijl de drinkwatermonsters en reinwater uit elkaar liggen. De bacteriesamenstelling van het sediment en op de leidingwand zijn dus vergelijkbaar met elkaar, maar niet met de bacteriesamenstelling van het drinkwater. Daarnaast verschilt de bacteriesamenstelling van de drie drinkwatermonsters uit het distributiesysteem en van het reinwater onderling ook van elkaar.

Bij productielocatie De Laak wordt waargenomen dat de bacteriesamenstelling van alle verschillende matrices apart van elkaar clusteren (Figuur 11B). De bacteriesamenstelling van de drie sedimentmonsters clusteren bij elkaar en zijn dus vergelijkbaar. Twee van de drie leidingwandmonsters clusteren ook dicht bij elkaar en lijken dus qua bacteriesoortensamenstelling ook op elkaar, maar het derde leidingwandmonster heeft een andere soortensamenstelling. De drie drinkwatermonsters en het reinwater clusteren niet bij elkaar, dus ieder drinkwatermonster heeft zijn eigen specifieke soortensamenstelling.

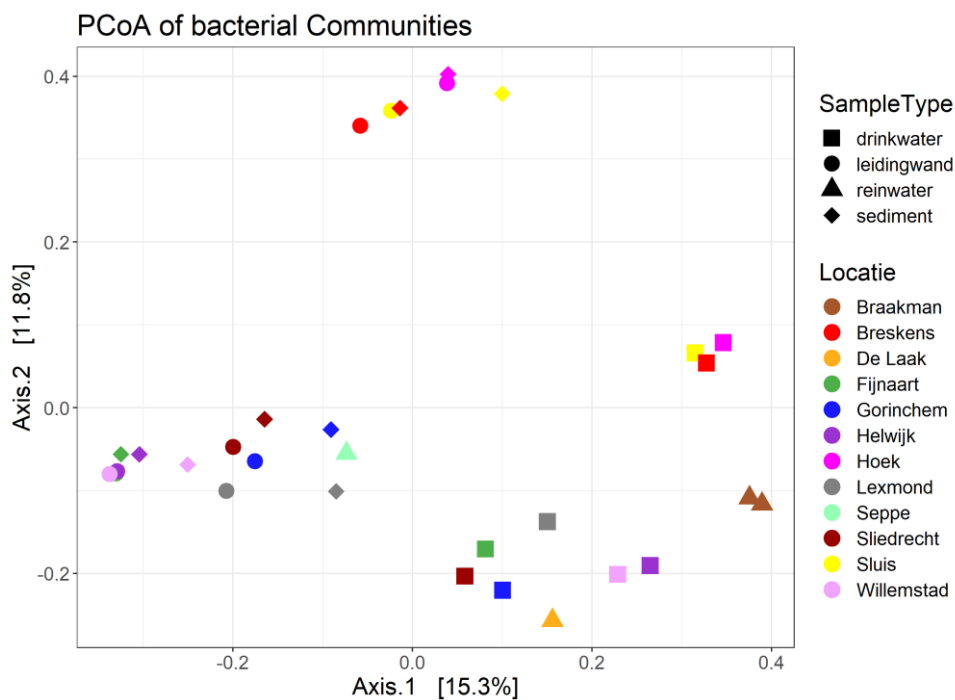
De bacteriesamenstelling van het sediment en de leidingwand bij productielocatie Braakman clusteren dicht bij elkaar en de bacteriesoortensamenstelling van deze twee matrices is dus vergelijkbaar (Figuur 11C). De drinkwatermonsters clusteren niet met de sediment- en leidingwandmonsters en hebben dus een andere bacteriesoortensamenstelling. Bij twee van de drie drinkwatermonsters was deze samenstelling vergelijkbaar, maar anders dan die van het reinwater.





Figuur 11 PCoA van alle OTU's van alle water-, sediment- en biofilm-monsters (verschillende symbolen) van de verschillende locaties (verschillende kleuren) A) productielocatie Seppe van Brabant Water, B) productielocatie De Laak van Oasen C) productielocatie Braakman van Evides.

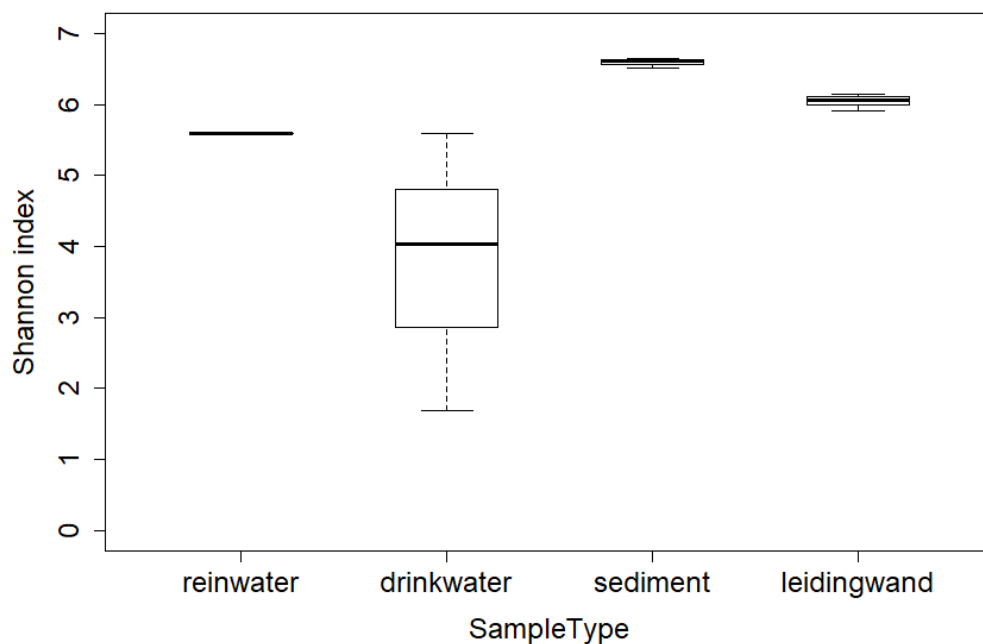
Een PCoA analyse en plot is ook gemaakt van alle monsters van alle productielocaties tezamen en deze is weergegeven in Figuur 12. Uit deze figuur volgt dat de drinkwatermonsters van productielocatie Braakman (Hoek, Breskens en Sluis) apart clusteren van de drinkwatermonsters van productielocatie Seppe (Fijnaart, Helwijk en Willemstad) en productielocatie De Laak (Gorinchem, Lexmond en Sliedrecht). Naast de drinkwatermonsters clusteren ook de sediment- en leidingwandmonsters van productielocatie Braakman apart van de sediment- en leidingwandmonsters van productielocaties Seppe en De Laak. De bacteriesoortensamenstelling in het distributiesysteem van Braakman is dus duidelijk anders dan die in het distributiesysteem van Seppe en De Laak, terwijl de bacteriesoortensamenstelling in het distributiesysteem van Seppe en De Laak enigszins vergelijkbaar zijn.



Figuur 12 PCoA van alle OTU's van alle water-, sediment- en biofilmmonsters (verschillende symbolen) van productielocatie Braakman (Hoek, Breskens en Sluis), Seppe (Fijnaart, Helwijk en Willemstad) en De Laak (Gorinchem, Lexmond en Sliedrecht) (verschillende kleuren).

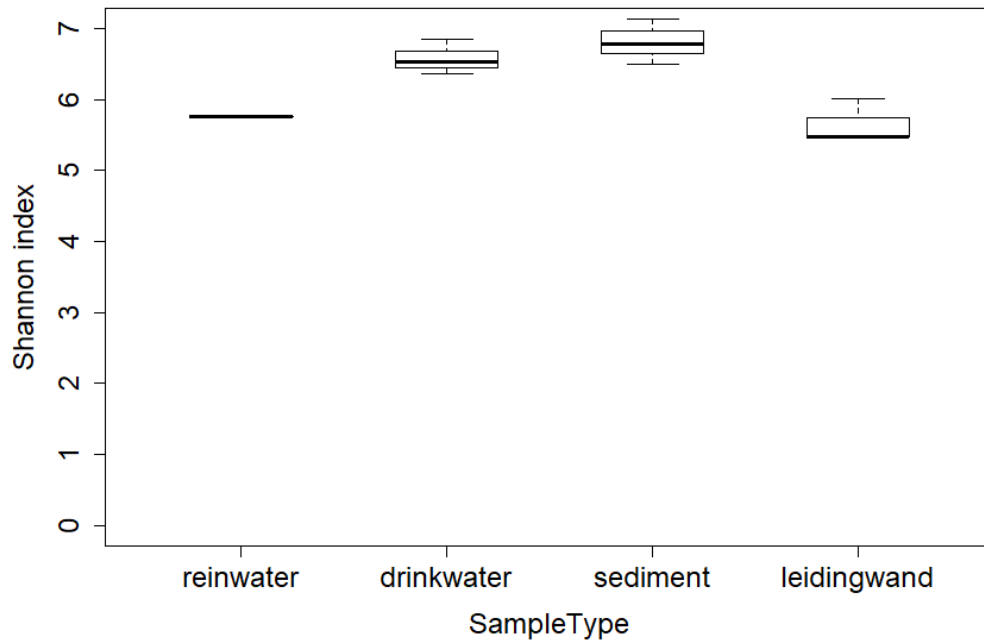
In Figuur 13 - 15 is de diversiteit (Shannon index) van de verschillende matrices van de drie voorzieningsgebieden weergegeven in een boxplot. Daarbij zijn de drie bemonsterde locaties per matrix gepoold. Elke box toont het eerste, tweede (mediaan) en derde kwartiel van de indices berekend uit de kenmerken (OTU-samenstelling) van de verschillende datums. De “whiskers” representeren 1,5x de interkwartielafstand.

Voor productielocatie Seppe is te zien dat het reinwater (maar 1 monster), sediment- en leidingwandmonsters nauwelijks variatie in de diversiteit vertonen, terwijl de drinkwatermonsters een hoge variatie in diversiteit vertonen (Figuur 13). De verschillen in diversiteit tussen de verschillende monstertypes zijn niet significant ($p > 0.05$).



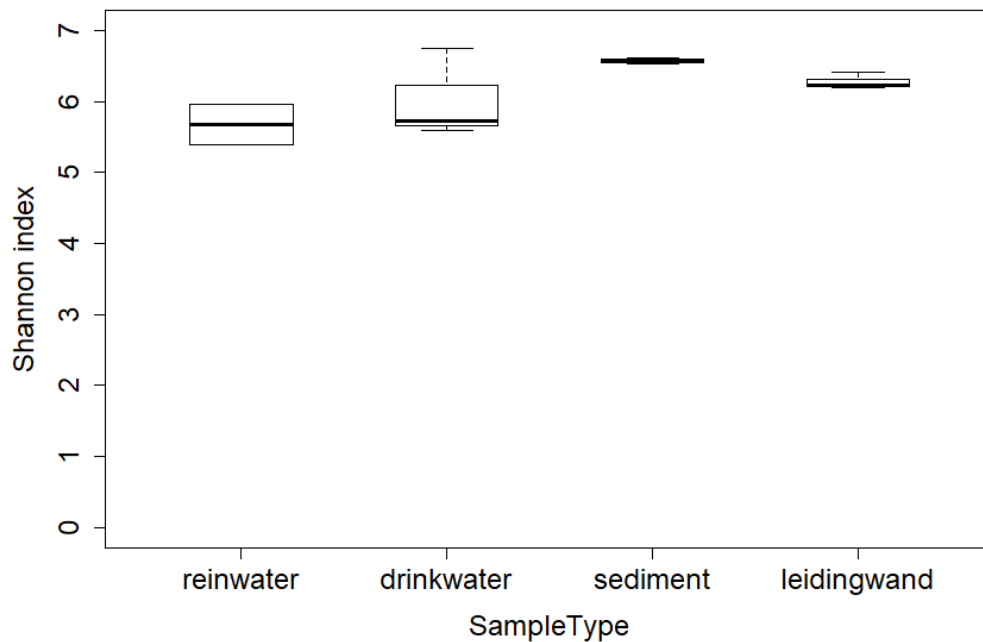
Figuur 13 Boxplots van de diversiteit van de bacteriepopulaties, weergegeven met de Shannon index, van de verschillende monsters van productielocatie Seppe van Brabant Water.

Bij productielocatie De Laak is de variatie in de diversiteit vergelijkbaar voor iedere matrix (Figuur 14). De verschillen in diversiteit tussen de verschillende monstertypes zijn niet significant ($p > 0.05$).



Figuur 14 Boxplots van de diversiteit van de bacteriepopulaties, weergegeven met de Shannon index, van de verschillende monsters van productielocatie De Laak van Oasen.

Bij productielocatie Braakman zijn de monsters uit het voorzieningsgebied op twee achtereenvolgende dagen genomen, waardoor ook twee reinwatermonsters werden genomen (Figuur 15). De variatie in de diversiteit van de drinkwatermonsters was hoger dan de variatie in diversiteit waargenomen voor de sediment- en leidingwandmonsters. De diversiteit tussen de verschillende matrices is niet significant verschillend ($p > 0,05$).

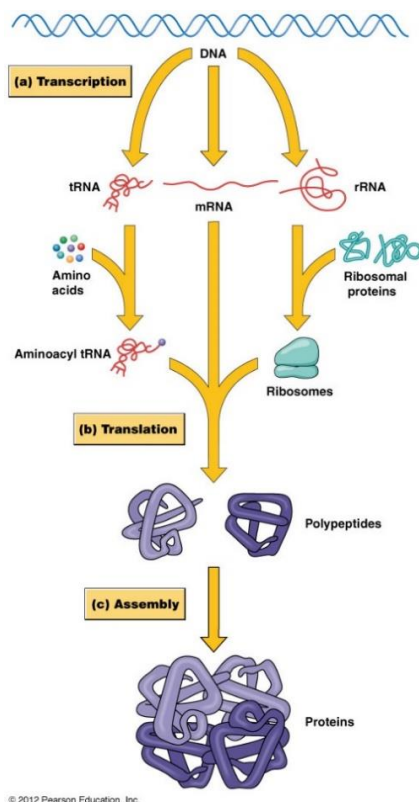


Figuur 15 Boxplots van de diversiteit van de bacteriepopulaties, weergegeven met de Shannon index, van de verschillende monsters van productielocatie Braakman van Evides.

De samenstelling van de bacteriepopulatie is niet alleen bepaald op basis van het DNA van het 16S rRNA gen, maar ook op basis van het 16S rRNA. De samenstelling van de bacteriepopulaties op basis van het RNA zijn weergegeven in Bijlage VI. De samenstelling van de bacteriepopulatie op basis van het RNA verschilde niet veel van de samenstelling op basis van het DNA. Dit kan betekenen dat de bacteriën die aanwezig zijn (detectie door middel van DNA) ook actief zijn (detectie door middel van RNA). Het kan ook betekenen dat het RNA niet sneller degradeert dan DNA en dus niet representatief is voor de actieve populatie. Dit laatste zou mogelijk kunnen zijn, gezien de biologische activiteit in distributiesystemen laag is en er dus weinig afbraak plaats zal vinden. Daarnaast is drinkwater oligotroof en zijn de micro-organismen mogelijk aangepast aan dit milieu door veel energie in onderhoud te investeren. Dit kan dan resulteren in langzame groei en sterfte.

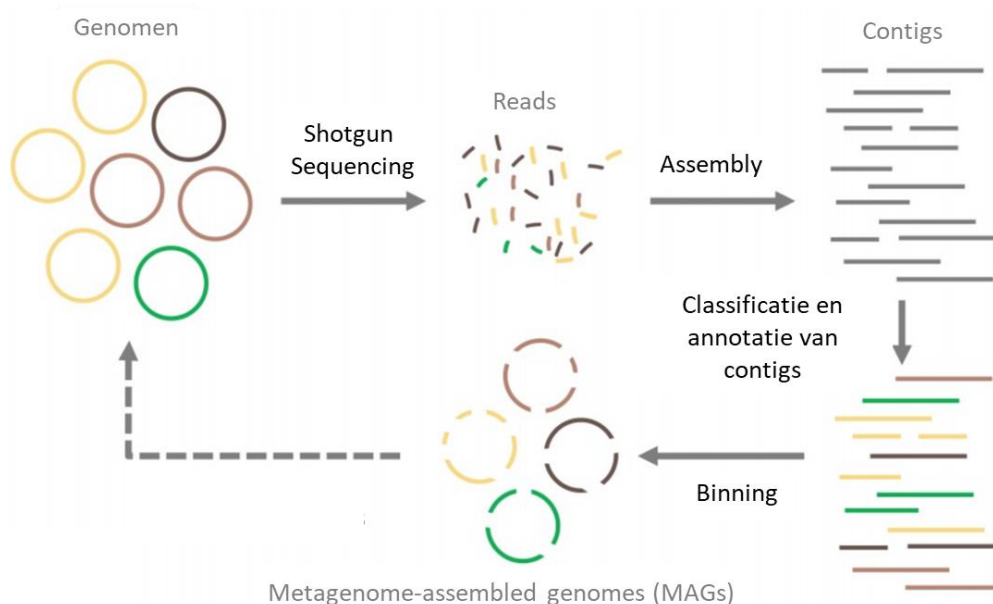
4 Metagenoomanalyse

Bij metagenomics beperkt de analyse zich niet tot één specifiek gen (zoals het 16S rRNA gen bij microbial profiling), maar wordt sequentie-informatie gegenereerd van al het DNA wat in een monster aanwezig is. De term 'metagenomics' komt van de term 'genomics'. Een 'genome' (= 'genoom' in Nederlands) bestaat uit *alle* genen die aanwezig zijn in één organisme. Een 'metagenoom' zijn dus *alle* genen die aanwezig zijn in *alle* organismen in één monster. Een deel van die genen codeert voor eiwitten en heten daarom 'functionele genen'. De andere genen coderen bijvoorbeeld voor functioneel RNA (rRNA, tRNA, etc.) of zijn betrokken bij regulatie van transcriptie (omzetting van DNA naar RNA) en translatie (omzetting van RNA naar eiwit; Figuur 16). Wanneer een micro-organisme een bepaald metabolisme uitvoert, heeft deze daar enzymen en andere eiwitten voor nodig. De functionele genen worden in dat geval herschreven (transcriptie) naar messenger RNA (mRNA) en vervolgens vertaald (translatie) naar eiwitten. Een deel van deze eiwitten (vaak de enzymen) maken deel uit van de metabole routes (pathways) die in de cel plaatsvinden om stoffen om te zetten. Metagenoomanalyses geven daarom o.a. inzicht in de metabole potentie die het ecosysteem heeft voor het uitvoeren van bepaalde biochemische processen.



Figuur 16 Schematische weergave van de wijze van transcriptie van DNA naar RNA en translatie van RNA naar eiwitten in de cel, waarbij ook onderscheid wordt gemaakt tussen de verschillende functionele RNA's.

Bij metagenomics wordt al het DNA in een monster (dus alle 'genomen') gesequencet met zogenaamd shotgun sequencing (Figuur 17). Hierbij ontstaan korte sequenties ('reads') die aan elkaar geplakt worden ('assembly'), wanneer stukjes van identieke sequenties overlappen. Zo ontstaan langere sequenties ('contigs') die geïdentificeerd en geannoteerd worden zodat duidelijk wordt welke functionele genen op elke contig aanwezig zijn ("functional profiling", zie paragraaf 2.6 voor specifieke uitleg).



Figuur 17 Schematische weergave van het metagenomics proces waarbij al het DNA van een monster (alle 'genomen') wordt gesequencet met shotgun sequencing, waarbij uiteindelijk contigs geproduceerd worden. Deze contigs kunnen gebind worden om tot metagenome-assembled genomes (MAGs) te komen.

Als men wilt weten wat de metabole potentie van specifieke micro-organismen in een ecosysteem is, dan probeert men het metagenoom te scheiden zodat er per micro-organisme weer een genoom ontstaat. Dit proces heet 'binning', omdat van het gehele metagenoom alle genen die bij één micro-organisme horen in één bin terecht komen. Deze bins worden normaal op kwaliteit, contaminatie en compleetheid gecheckt. De bins die uiteindelijk aan alle eisen voldoen worden metagenoomgeassembleerde genomen (MAGs) genoemd. Van deze MAGs kan dan gekeken worden welke functionele genen in die MAGs zitten en of deze onderdeel uitmaken van metabole routes. Daarbij kan worden onderzocht of alle genen die onderdeel uitmaken van één metabole route aanwezig zijn in één MAG, wat het aannemelijk maakt dat dit micro-organisme de potentie heeft om die metabole route te gebruiken. Deze informatie kan dus niet verkregen worden uit metagenoomdata zonder deze MAGs met binning te construeren.

In Tabel 3 is het aantal fragmenten waarvan de sequentie is bepaald ("sequence reads") en de kwaliteit van de gegenereerde sequentiedata weergegeven. Hierbij wil een score van 30 zeggen dat de foutenratio van de DNA sequentie één op de 1.000 nucleotiden is en een score van 40 één op 10.000 gesequencete nucleotiden. De resultaten laten zien dat er per monster gemiddeld 19 miljoen reads ($\pm 1,3$ miljoen) met hoge kwaliteit zijn (gemiddelde score van 36,2).

Tabel 3 Resultaten sequentieanalyse voor metagenomics met het aantal sequenties en de kwaliteitsscores van de gegenereerde sequentiedata voor ieder monster.

Productielocatie		Aantal 'sequence reads'	Kwaliteits score
Seppe	Drinkwater	18.732.379	36,2
	Sediment	18.576.131	36,2
	Leidingwand	20.809.707	36,2
De Laak	Drinkwater	18.710.499	36,1
	Sediment	19.615.202	36,2
	Leidingwand	21.645.195	36,2
Braakman	Drinkwater	17.105.522	36,1
	Sediment	18.597.793	36,2
	Leidingwand	19.314.009	36,1

4.1 Resultaten metagenoomanalyses

Om de samenstelling van het DNA uit de watermonsters (“metagenomen”) te onderzoeken zijn er analyses uitgevoerd om te bepalen welke genen er aanwezig zijn en bij welke processen deze genen betrokken kunnen zijn (“functional profiling”).

4.1.1 Functional profiling

Om inzicht te krijgen in de functionele processen die kunnen plaatsvinden in de verschillende watermonsters is gebruik gemaakt van metagenomen om alle functionele genen in kaart te brengen. De sequenties uit de metagenomen zijn vergeleken met sequenties uit de KEGG databases (Kanehisa et al., 2012), en bij het vinden van voldoende sequentieovereenkomst (50 bits op fragmenten van 30-40 aminozuurparen) wordt de metagenoomsequentie gekoppeld aan een functioneel gen. Ook wordt de metabole route gegeven waar dit gen bij betrokken is. De abundantie van die metabole route wordt berekend door de abundantie van functionele genen die in die route horen te sommeren. Dit zegt niets over de aanwezigheid van de metabole routes in de monsters, maar alleen over de aanwezigheid van de functionele genen die deel uitmaken van die route. Aanwezigheid van gehele metabole routes kan alleen bepaald worden door de metagenomen te binnen in MAGs en dan per MAG (= per micro-organisme) te kijken of deze complete metabole routes bevat. Pas wanneer de metabole route compleet is, kan gezegd worden dat deze route aanwezig is. Wanneer in dit rapport metagenoomdata zonder binning wordt toegelicht en wordt gesproken over abundantie van metabole routes, wordt dus altijd gedoeld op abundantie van de functionele genen *in* metabole routes.

De metabole routes die betrokken zijn bij het centrale metabolisme van cellen en DNA-replicatie en -reparatie (bijvoorbeeld “ko03430_mismatch repair”), zijn niet in verdere analyses meegenomen, omdat deze processen niet direct betrokken zijn bij functionele processen die voor dit project van interesse zijn. Daarnaast zijn er veel metabole routes die niet gerelateerd zijn aan een prokaryoot (bacteriën en archaea) metabolisme, maar meer aan een eukaryoot (dieren, schimmels en planten) metabolisme. Dit is logisch omdat al het DNA van het drinkwater gesequencet is, dus ook plant, humaan en ander dierlijk DNA. Deze metabole routes zijn ook niet meegenomen in verdere analyses.

4.1.2 Abundante functionele genen

De abundantie van functionele genen wordt bepaald door te kijken naar de relatieve abundantie, d.w.z. de abundantie van het gen t.o.v. het totaal aantal genen in een

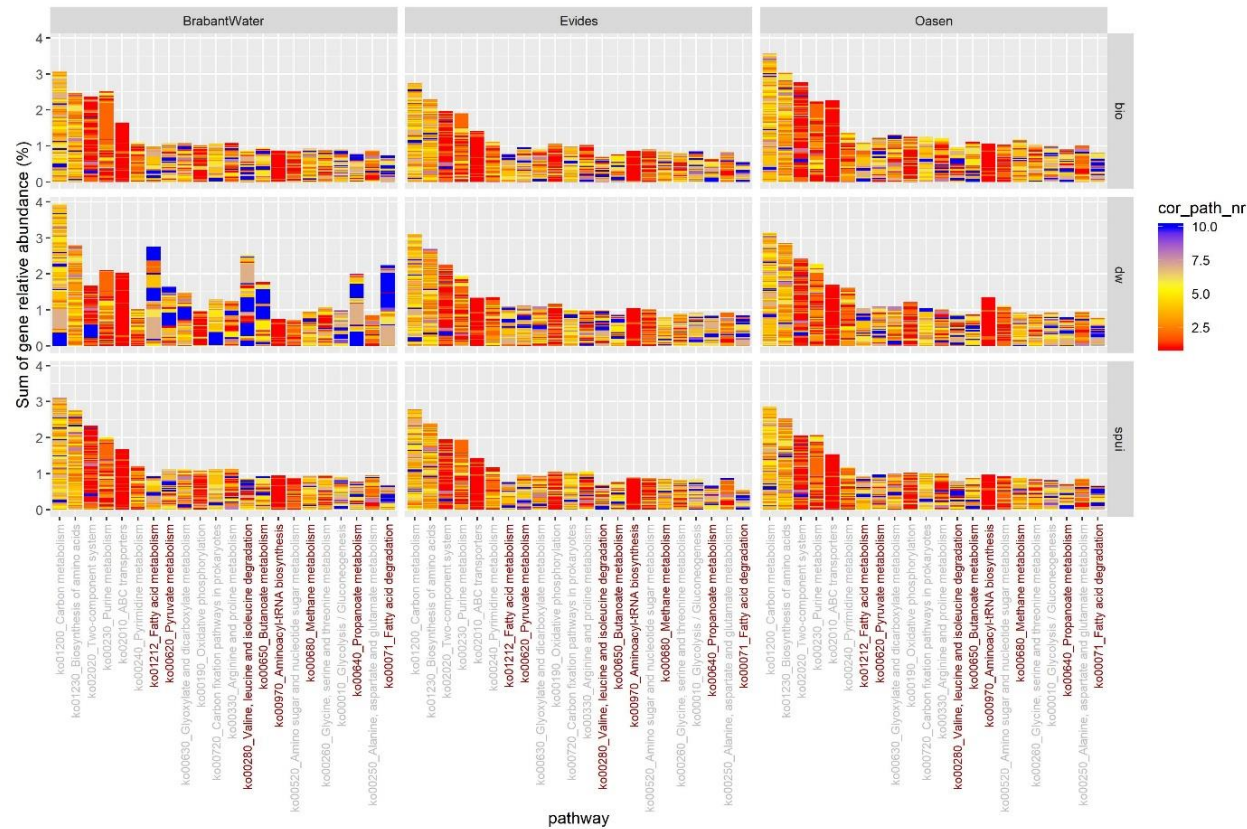
monster. Omdat elk monster een ander totaal aantal genen heeft (reads) (Tabel 3) moet er dus genormaliseerd worden voordat deze data vergeleken kan worden. De meeste functionele genen van metabole routes die zijn gevonden komen met soortgelijke relatieve abundantie voor in alle monsters. De 22 metabole routes waarvan functionele genen het meest abundant zijn in alle monsters (drinkwater, sediment, leidingwand) zijn weergegeven in Figuur 18. Elke staaf staat voor de relatieve abundantie van functionele genen van een metabole route. De metabole route "ko001200_Carbon metabolism" heeft in alle monsters de meest abundante genen. Elk blokje van de staaf geeft de relatieve abundantie van de functionele genen behorende bij die route weer. Deze blokjes zijn gekleurd naar aanleiding van het aantal metabole routes waar dat gen in voor kan komen, zie legenda ("cor_path_nr"). De genen die uniek zijn voor bepaalde metabole routes zijn het meest van belang (rood gekleurde blokjes), omdat dit unieke functionele genen zijn. Generalistische functionele genen (blauwe blokjes) zijn genen die coderen voor eiwitten die voor veel processen nodig zijn en dus minder informatief omdat deze genen minder informatie geven over de metabole route die mogelijk gebruikt wordt. Een abundant gen in de koolstofmetabolisme ('carbon metabolism') is het gen dat codeert voor het enzym 'Acetyl-CoA C-acetyltransferase'. Dit enzym is bij zeer veel processen betrokken, omdat het Acetyl-CoA, dat een intermediair is in vele metabolische processen, omzet. Het 'cor_path_nr' is voor dit gen dan ook zeer hoog en geeft daardoor geen informatie over de functie in het drinkwatersysteem. Van alle metabole routes die het meest abundant zijn in de monsters, werden dus zoveel mogelijk de unieke functionele genen uitgekozen (rode blokjes).

In het algemeen zijn er geen grote verschillen tussen de meeste monsters en zijn dezelfde genen in metabole routes dominant. Dit betreft zeer algemene metabole routes, zoals koolstofmetabolisme ('carbon metabolism'), biosynthese van aminozuren ('biosynthesis of amino acids') en oxidatieve fosforylatie ('oxidative phosphorylation'), etc.

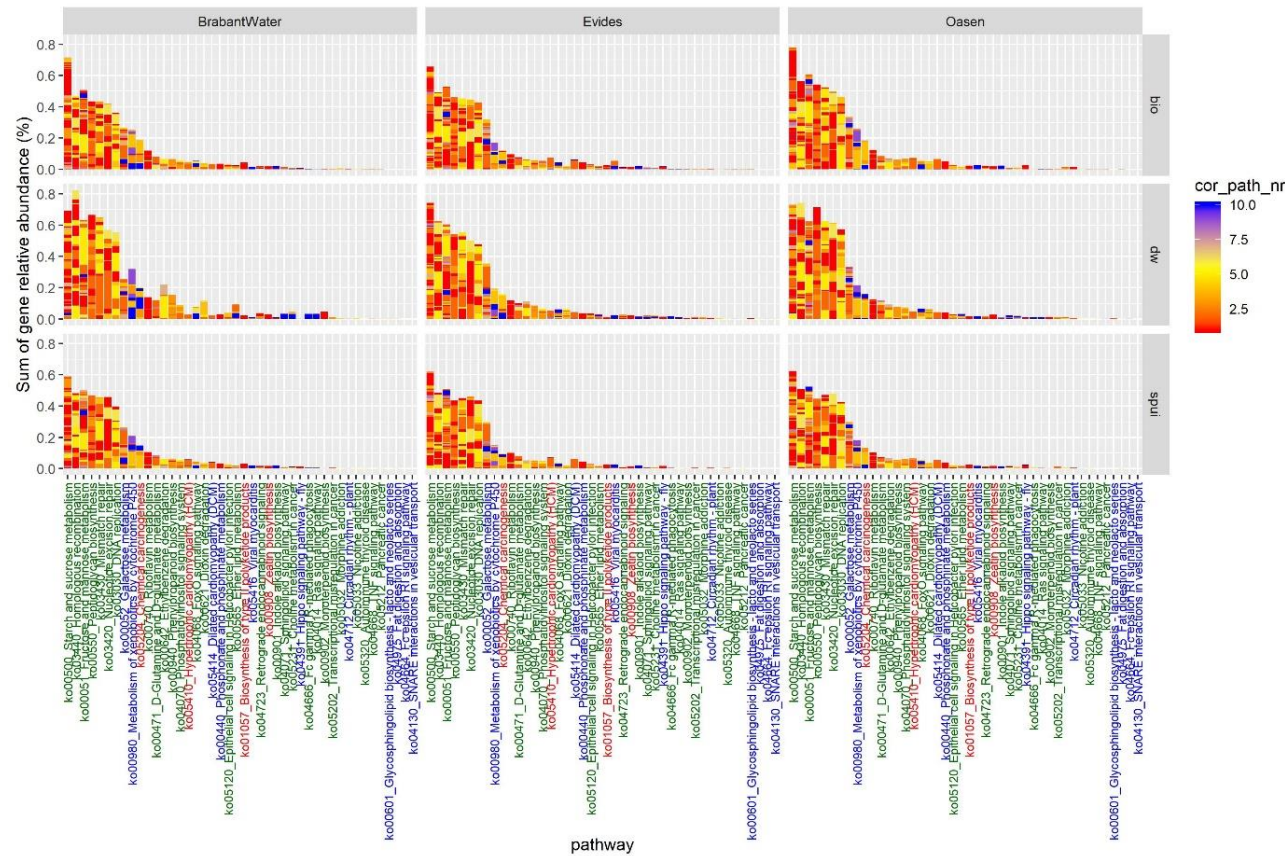
Na het toepassen van de criteria benoemd in 4.1.1, zijn de volgende genen geselecteerd en het meest abundant in alle monsters:

1. Vetzuren
 - a. Koolstofmetabolisme en vetzuurmetabolisme; acyl-CoA dehydrogenase: Betrokken bij afbraak van vetzuren via betaoxidatie.
 - b. Vetzuurmetabolisme; Enoyl-CoA hydratase: betrokken bij metabolisme van vetzuren via betaoxidatie.
 - c. Vetzuurmetabolisme en vetzuurdegradatie; 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase, long-chain acyl-CoA synthetase, fatty acid synthase: allen betrokken bij productie of afbraak van vetzuren
 - d. Butanoaat/butyraatmetabolisme; butanol dehydrogenase: Betrokken bij butaan afbraak tot butanoaat dat weer afgebroken kan worden in de betaoxidatie (vetzuurafbraak)
 - e. Butanoaatmetabolisme; meso-butanediol dehydrogenase: zet butanediol om in acetoïne (betrokken bij butyraatafbraak).
 - f. Butanoaatmetabolisme en vetzuurdegradatie; butyryl CoA dehydrogenase: betrokken bij afbraak van korte vetzuren gebonden aan CoA (zoals butanoaat/butyraat).
 - g. Propanoaatmetabolisme; propionyl-CoA synthetase; afbraak van propionaat naar propionyl-CoA.
 - h. Vetzuurdegradatie; 3-phenylpropionate/trans-cinnamate dioxygenase ferredoxin reductase: betrokken bij afbraak van 3-phenyl propanoaat of cinnamaat.
2. Aminozuren

- a. Biosynthese van aminozuren; acetolactate synthase: betrokken bij eerste stap in productie van een aantal aminozuren, zoals valine, leucine en isoleucine. Kan ook reversibel zijn en dus betrokken zijn bij afbraak van deze aminozuren.
3. Beide
 - a. Glyoxylaal/dicarboxylaalmetabolisme, Propanoaatmetabolisme en valine-, leucine- en isoleucinedegradatie; Propionyl-CoA carboxylase: betrokken bij afbraak van cholesterol, oneven ketenige vetzuren, methionine, isoleucine, threonine.
4. Overig
 - a. Methaanmetabolisme; aerobic carbon-monoxide dehydrogenase



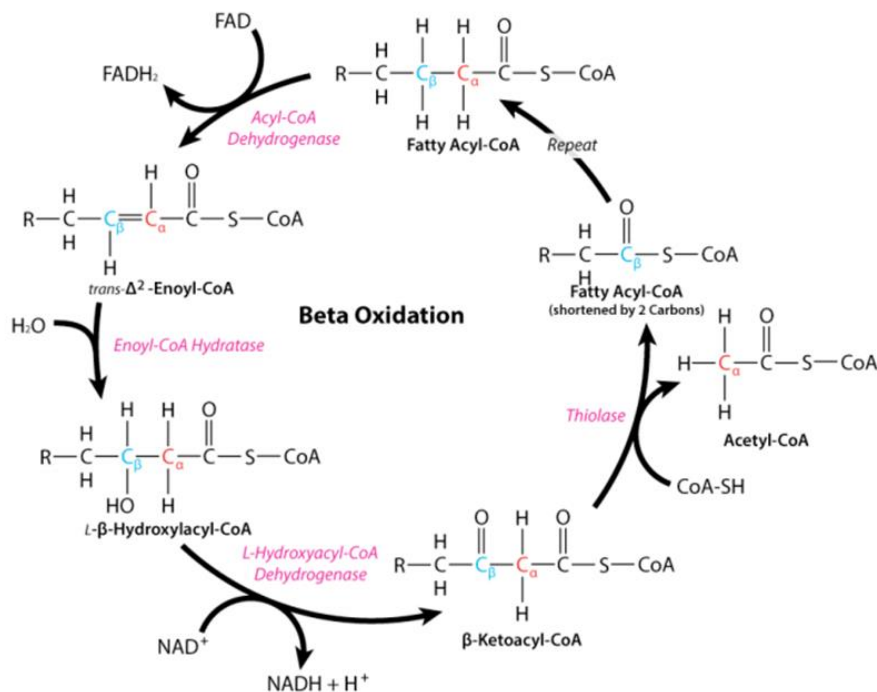
Figuur 18 Metabole route abundantie berekend aan de hand van de som van de relatieve abundantie van de genen (%). Alleen de top 22 metabole routes zijn weergegeven. Elke staaf staat voor de relatieve abundantie van een metabole route. Elk blokje van de staaf geeft de relatieve abundantie van de functionele genen behorende bij die route weer. Deze blokjes zijn gekleurd naar aanleiding van het aantal metabole routes waar dat gen in voor kan komen, zie legenda ("cor_path_nr"). Hoe blauwer het blokje, des te minder uniek is dit gen voor deze metabole route. Op de x-as zijn acht pathways rood gemaakt, dat betekent dat deze pathways afwijken in relatieve abundantie (%) voor één van de monsters.



Figuur 19 Metabole routes die verschillend zijn in relatieve abundantie, berekend aan de hand van de som van de relatieve abundantie van de genen (%). Elke staaf staat voor de relatieve abundantie van een metabole route. Elk blokje van de staaf geeft de relatieve abundantie van de functionele genen behorende bij die route weer. Deze blokjes zijn gekleurd naar aanleiding van het aantal metabole routes waar dat gen in voor kan komen, zie legenda ("cor_path_nr"). Hoe blauwer het blokje, des te minder uniek is dit gen voor deze metabole route. Op de x-as zijn pathways gekleurd wanneer deze verschillen tussen monstertype (groen), productielocatie (blauw) of allebei (rood).

Deze resultaten tonen dat na het toepassen van de selectiecriteria, dat de overgebleven genen vooral betrokken zijn bij afbraak en synthese van vetzuren, aminozuren en methaan.

Van de zeer algemene metabole routes die veel voorkomen (Figuur 18), zoals koolstofmetabolisme ('carbon metabolism'), is ook nog gekeken welke genen van deze routes het meest abundant zijn. Een van de meest abundante genen die in de metabole route van de koolstofmetabolisme hoort, is 'acyl-CoA dehydrogenase'. Acyl-CoA dehydrogenase is een enzym dat betrokken is bij de eerste stap van de oxidatie van vetzuren. Dit proces vindt plaats in veel bacteriën die vetzuren afbreken via betaoxidatie, maar ook in de mitochondriën van eukaryoten (planten, dieren zoals protozoën en schimmels). Uit een vergelijking van de getransleerde functionele genen met de internationale database NCBI (blast: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), blijkt dat het gevonden gen in veel gevallen van bacteriële afkomst is. Dit geeft dus aan dat in het drinkwatersysteem (water, biofilm, sediment) waarschijnlijk bacteriën aanwezig zijn die functionele genen bezitten die betrokken zijn bij de afbraak van vetzuren. Welke vetzuren kan op basis van de verkregen informatie niet worden aangegeven. De afbraakroute van vetzuren is namelijk een zeer algemene metabole route waarin de meeste lange en korte vetzuurketens afgebroken kunnen worden. De afbraakproducten van vetzuren zijn veelal vetzuren met lengtes van twee of drie koolstofketens, acetaat en propionaat, afhankelijk of er even- of onevenketenige vetzuren zijn afgebroken (Figuur 20). Daarnaast kan deze metabole route ook in omgekeerde richting lopen waarbij vetzuren worden gesynthetiseerd voor het opbouwen van biomassa. Metagenoomanalyse kan niet vaststellen welke richting (afbraak of synthese) deze metabole route op gaat.



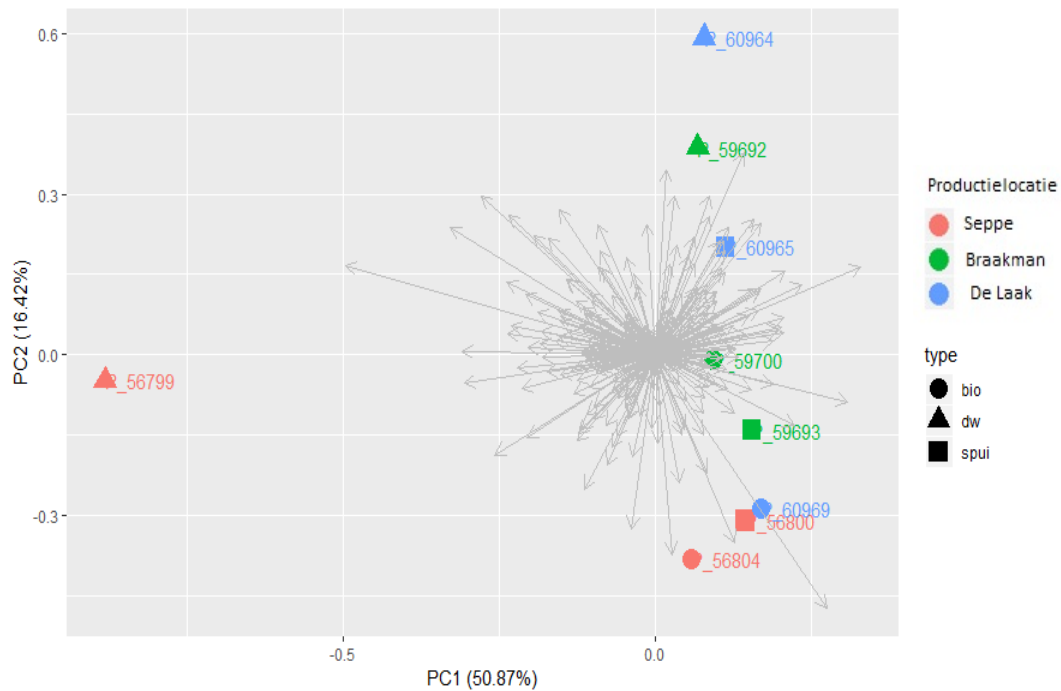
Figuur 20 Betaoxidatie route die gebruikt wordt voor de afbraak van vetzuren.

4.1.3 Differentiële verschillen tussen functionele genen

Zoals hierboven vernoemd, komen de meeste metabole routes met soortgelijke relatieve abundantie voor in alle monsters. Desondanks is onderzocht of er verschillen zijn in de aanwezige metabole routes tussen monstertype en productielocaties. Hiervoor zijn de abundanties van de metabole routes log-getransformeerd zodat de data normaal verdeeld is. Vervolgens zijn de verschillen tussen monsters op twee manieren geïdentificeerd.

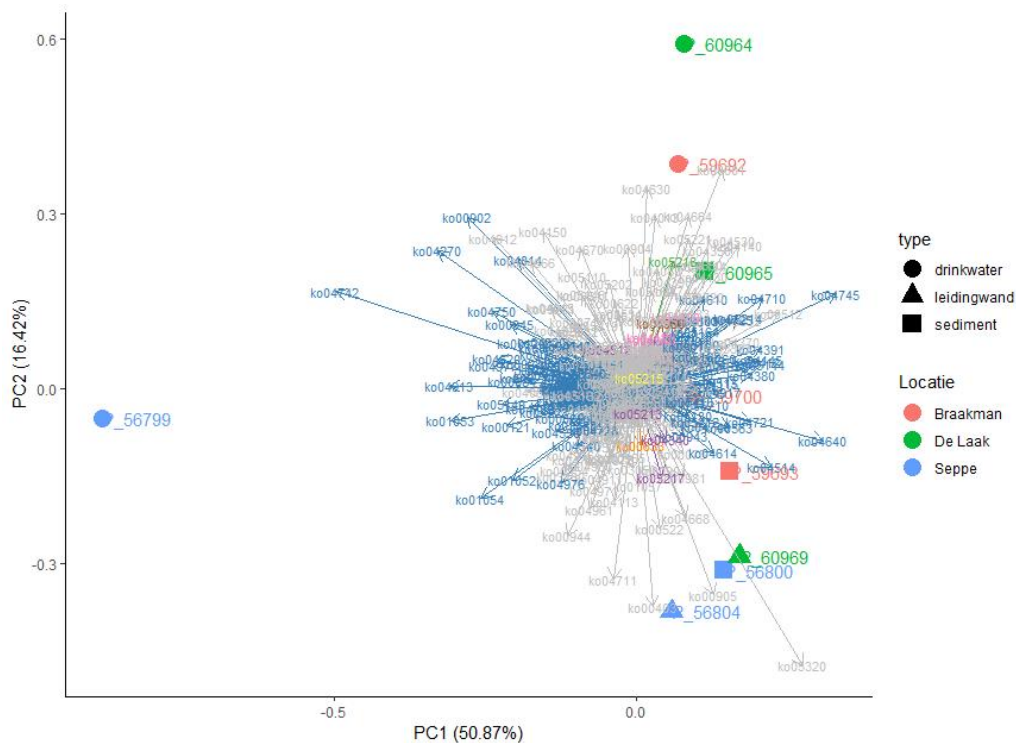
1. Afwijkingsdetectie; als een metabole route ± 2 keer de standaard deviatie (SD) van het gemiddelde voorkomt, wordt dit geregistreerd en gezien als een afwijking. Deze afwijkingen zijn dus genen in metabole routes die verschillen in relatieve hoeveelheid tussen bepaalde monsters en productielocaties en die mogelijk verklarend zijn voor de verschillen.
2. Statistische test met 2-way ANOVA; hiermee wordt getest of de abundantie van de metabole routes tussen productielocaties of monstertypen significant verschillen ($p < 0,05$).

De loggetransformeerde abundanties van de verschillende genen in de metabole routes zijn per monster getoond in een Principal Component Analysis (PCA) (Figuur 21). Te zien is dat de abundantie van de verschillende genen in het drinkwater van Seppe duidelijk anders is dan van de andere monsters; de drinkwatermonsters van de andere twee productielocaties clusteren samen op de x-as en de sediment- en leidingwandmonsters van alle drie de locaties clusteren ook samen op de x-as. Bij de meeste productielocaties lijken de sediment- en leidingwandmonsters meer op elkaar dan het drinkwater, behalve bij De Laak. Dit resultaat komt overeen met de resultaten van de microbial profiling op basis van het 16S rRNA gen (figuren 8-10). Dit betekent dat de potentiële functionaliteit van de bacteriële populatie mogelijk gelinkt is aan de fylogenie van de bacteriën die er voorkomen.



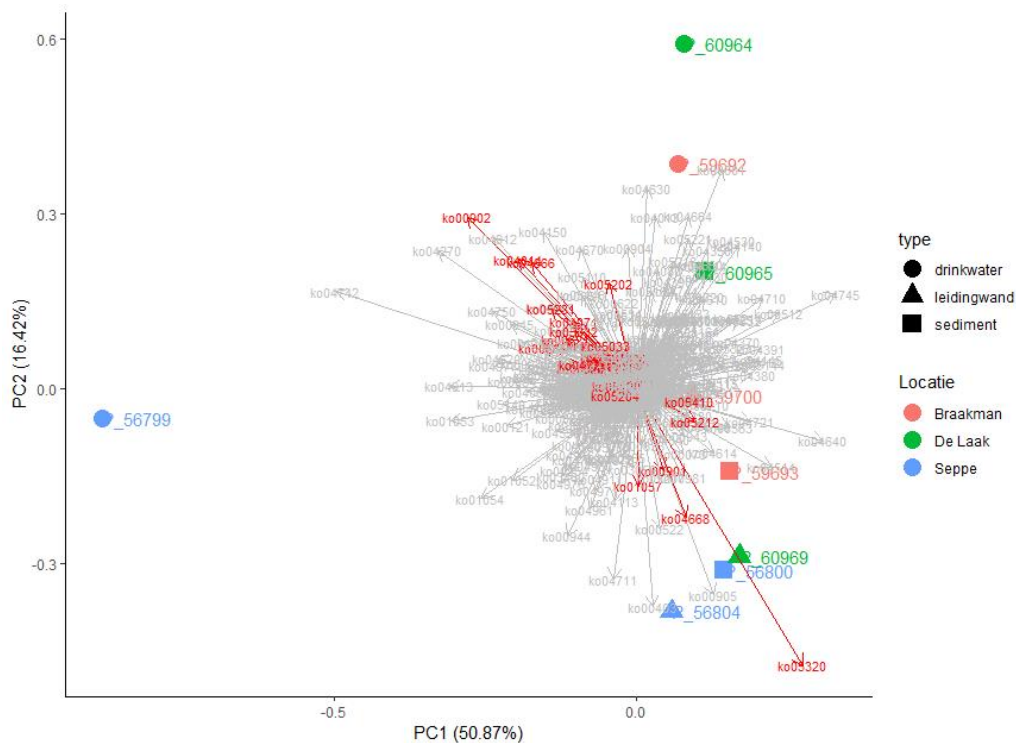
Figuur 21 PCA van metabole route abundantie van alle monsters, berekend aan de hand van genen abundantie (op log getransformeerde data) in de betreffende pathways. Productielocaties zijn verschillende kleuren en type monsters zijn verschillende symbolen. De grijze pijlen zijn metabole routes die gecorreleerd zijn met de verschillen tussen monsters. Wanneer een pijl in dezelfde richting wijst als een groep monsters, betekent dit dat de aanwezigheid van deze metabole route ervoor zorgt dat deze monsters op elkaar lijken.

In Figuur 22 is hetzelfde te zien als in Figuur 21, waarbij de genen in metabole routes die afwijkend zijn voor bepaalde monsters (meer dan ± 2 SD van het gemiddelde afwijken) in blauw zijn weergegeven. In totaal zijn 161 van de 371 metabole routes afwijkend; 136 metabole routes zijn afwijkend voor het drinkwater van Seppe (monster P_56799), één route voor het sediment van Seppe (monster P_56800), vier routes voor leidingwand van Seppe (monster P_56804), één route voor het drinkwater van Braakman (monster P_59692), twee routes voor sediment van Braakman (monster P_59693), één route voor leidingwand van Braakman (monster P_59700), zeven routes voor het drinkwater van de Laak (monster P_60964) en negen routes voor leidingwand van de Laak (monster P_60969). De details hiervan zijn gegeven in Tabel S1. Het is dus duidelijk uit deze resultaten dat de vele unieke functionele genen die werden gevonden voor het drinkwater van Seppe, er voor zorgen dat dit monster apart clusterd van de andere monsters (zie Figuur 22).



Figuur 22 PCA van metabole route abundantie van alle monsters, berekend aan de hand van genen abundantie (op log getransformeerde data) in de betreffende metabole routes. Productielocaties zijn verschillende kleuren en type monsters zijn verschillende symbolen. De grijze pijlen geven de abundantie van pathways aan en hoe deze gecorreleerd zijn met bepaalde monsters. Wanneer een pijl in dezelfde richting wijst als een groep monsters, betekent dit dat de aanwezigheid van deze metabole route ervoor zorgt dat deze monsters op elkaar lijken. De blauw gekleurde pijlen zijn pathways die anomaliteiten zijn in bepaalde monsters (observaties die meer dan ± 2 SD van het gemiddelde afwijken). Veel van deze blauw gekleurde pijlen wijzen richting monster P56799, wat aangeeft dat deze routes een anomaliteit zijn in dat monster.

De statistische test ANOVA op verschillen tussen productielocaties en monstertypen laat zien dat de abundantie van een aantal functionele genen significant verschillend zijn. 33 metabole routes zijn significant verschillend tussen de drie monstertypen drinkwater, sediment en leidingwand, 15 metabole routes tussen de drie productielocaties Seppe, De Laak en Braakman en vier metabole routes verschillend voor zowel monstertype als productielocatie (Tabel S2). De genen in metabole routes die significant verschillend zijn tussen de monstertypen zijn rood gekleurd in Figuur 23 (2-way ANOVA, $p < 0,05$).



Figuur 23 PCA van metabole route abundantie van alle monsters, berekend aan de hand van genen abundantie (op log getransformeerde data) in de betreffende pathways. Productielocatie zijn verschillende kleuren en type monsters zijn verschillende symbolen. De grijze pijlen geven de abundantie van pathways aan en hoe deze gecorreleerd zijn met bepaalde monsters. Wanneer een pijl in dezelfde richting wijst als een groep monsters, betekent dit dat de aanwezigheid van deze metabole route ervoor zorgt dat deze monsters op elkaar lijken. De rood gekleurde pijlen zijn metabole routes (ko nummers) waarbij monstertype een significant effect heeft (ANOVA, $p < 0.05$). significant.

In Figuur 18 op de x-as zijn de metabole routes rood gemaakt die afwijkend zijn voor één van de monsters, in totaal zijn dit er acht. Omdat deze acht metabole routes de meest abundante zijn, zullen deze metabole routes de grote verschillen verklaren die is waargenomen tussen de monsters (zie Figuren 14-16). Zo is bijvoorbeeld het vetzuurmetabolisme afwijkend voor Seppe drinkwater en 'methaanmetabolisme voor De Laak biofilm (Tabel S1).

In Figuur 19 zijn alleen de metabole routes weergegeven die significant verschillen (2-way ANOVA, $p < 0,05$) tussen monstertype of productielocatie. De metabole routes die verschillen tussen monstertype zijn groen gemaakt, tussen productielocatie zijn blauw en allebei zijn rood. Uit deze resultaten volgt dat de genen in metabole routes die verschillend zijn tussen de monsters niet de meest abundante zijn. Ook laten de resultaten zien dat bijvoorbeeld de metabole route 'ko00980_Metabolisme van xenobiotica' significant verschilt tussen productielocaties (blauwgekleurd). Hierbij heeft productielocatie Braakman een lagere relatieve abundantie van genen van deze metabole route dan de andere productielocaties. Verder zijn bijvoorbeeld de metabole routes "ko00550_Peptidoglycan biosynthese", "ko00642_ethylbenzeendegradatie" en "ko00621_Dioxinedegradatie" significant verschillend tussen watertypen (groengekleurd), waarbij deze routes relatief meer aanwezig zijn in het drinkwater dan in sediment en leidingwand. Voor details, zie Tabel S2.

Deze genen zijn soms dezelfde genen als die zijn geïdentificeerd met de afwijkingenanalyse (Figuur 22), maar vaak ook anderen. Monstertype en/of productielocatie kunnen dus een significant effect hebben op de abundantie van bepaalde genen, zonder dat deze genen afwijkend zijn in minstens één monster. Omdat de monsters in enkelvoud zijn geanalyseerd (drie monsters genomen en gepooled), kan de afwijkingenanalyse gevoelig zijn voor uitschieters die niet zozeer met het monster te maken hebben. Daarom wordt in de rest van het rapport alleen de genen in metabole routes beschreven die significant verschillen tussen monstertype of productielocatie, en worden de 'anomaliteiten' niet meer verder behandeld. Doordat productielocatie Seppe afwijkend is, zal dit ook de 2-way ANOVA analyse beïnvloeden, maar minder dan de anomaliteitsanalyse.

Van alle routes die niet abundant zijn maar wel significant verschillend tussen productielocatie en monstertype (2-way ANOVA, op log getransformeerde data), zijn zoveel mogelijk de unieke functionele genen uitgekozen, zoals hierboven gedaan voor de abundante metabole routes. Genen die verschillend zijn in abundantie tussen monsters:

1. Suikers/Fermentatie
 - a. Zetmeel- en sucrosemetabolisme; endoglucanase: betrokken bij afbraak van suikers. glycogen phosphorylase: glycogeen afbraak (dierlijk). Komt significant minder voor in sediment dan in drinkwater of leidingwand.
 - b. Galactosemetabolisme; betagalactosidase: betrokken bij afbraak van suikers. Komt significant minder voor bij productielocatie Seppe dan bij de Laak of Braakman.
 - c. Fructose- en mannosemetabolisme; butanol dehydrogenase: productie van butanol tijdens fermentatie van suikers. Komt significant meer voor in drinkwater dan in sediment of leidingwand.
2. Celwandsynthese
 - a. Glutamine- en Glutamaatmetabolisme; UDP-N-acetylmuramate--alanine ligase: is betrokken bij biosynthese van peptidoglycan, dat bacteriën gebruiken voor de celwand. Komt significant meer voor in drinkwater dan in sediment en leidingwand.
 - b. Peptidoglycanbiosynthese; productie van celwandmateriaal door bacteriën. Komt significant meer voor in drinkwater dan in sediment en leidingwand.
 - c. Etherlipidemetabolisme; alkylidihydroxyacetonephosphate synthase, phospholipase D1/2, phospholipase C: allen betrokken bij productie van fosfolipiden en etherlipiden die nodig zijn voor de celwand van archaea en sommige bacteriën. Komt significant meer voor in drinkwater dan in sediment en leidingwand.
3. Afbraak van xenobiotica
 - a. Metabolisme van xenobiotica; glucuronosyltransferase: betrokken bij additie van glucuronzuurgroep aan xenobiotica, zodat xenobioticum kan worden afgebroken. Vergelijking van een paar van deze genen met de database bevestigt dat het gaat om bacteriële glucuronosyltransferase en glycosyltransferases. Dit gen komt significant minder voor in monsters van productielocatie Braakman dan Seppe en De Laak.
 - b. Ethylbenzeendegradatie; acetyl-CoA acyltransferase (in veel metabole routes betrokken), ethylbenzene dioxygenase (andere naam is Biphenyl dioxygenase) en 2,3-dihydroxyethylbenzene 1,2-dioxygenase: allen

- betrokken bij omzetting van biphenyl (phenylbenzeen) naar benzoaat. Komt significant meer voor in drinkwater dan in sediment en leidingwand.
- c. Dioxinedegradatie; salicylate hydroxylase: betrokken bij omzetting van salicylzuur naar catechol. Komt significant meer voor in drinkwater dan in sediment en leidingwand.
 - d. Dioxinedegradatie; biphenyl 2,3-dioxygenase subunit alpha: betrokken bij omzetting van bifenyyl. Komt significant meer voor in drinkwater dan in sediment en leidingwand.
 - e. Dioxinedegradatie; 4-hydroxy 2-oxoalderate aldolase: betrokken bij afbraak van veel stoffen zoals bifenyyl, toluen en benzoaat. Komt significant meer voor in drinkwater dan in sediment of leidingwand.
 - f. Dioxinedegradatie; 2-keto-4-pentenoate hydratase: betrokken bij afbraak van toluen, benzoaat, xyleen en fluoreen. Komt significant meer voor in drinkwater dan in sediment en leidingwand.
4. Overig
5. Riboflavinemetabolisme; 3,4-dihydroxy 2-butanone 4-phosphate synthase / GTP cyclohydrolase II: betrokken bij synthese van riboflavine (vitamine B2) dat veel micro-organismen nodig hebben voor hun metabolisme. Komt significant meer voor in drinkwater dan in sediment en leidingwand.
 6. Biosynthese van type II polyketideproducten; tetracenomycine F1 monooxygenase: betrokken bij biosynthese van het antibioticum tetracenomycine in fungi. Komt significant minder voor in drinkwater dan in sediment en leidingwand.
 7. Biosynthese van type II polyketideproducten; tetracycline 7-halogenase / FADH2 O2-dependent halogenase: betrokken bij productie van het antibioticum chloortetracycline in actinomyceten. Komt significant minder voor in drinkwater dan in sediment en leidingwand.

De meeste genen waarop het monstertype een significant effect heeft lijken meer voor te komen in drinkwater dan in sediment en leidingwand. Alle genen voor celwand synthese en het grootste deel van de genen voor de afbraak van xenobiotica komen meer voor in drinkwater. Het gaat hier echter om *relatieve* abundantie van deze genen, dus de genen betrokken bij celwandsynthese komen relatief meer voor in drinkwatermonsters. Dit resultaat betekent dat de micro-organismen in het drinkwater relatief meer van deze genen in hun genoom hebben dan de organismen in sediment en leidingwand. Micro-organismen variëren in het algemeen sterk in celwandstructuur en dus in functionele genen die coderen voor de synthese van celwandmateriaal (Madigan et al., 2018). Doordat het sediment en leidingwand veel meer actieve biomassa bevatten en dus waarschijnlijk meer cellen en dus genen, kunnen de absolute abundantie van deze genen mogelijk hoger zijn in sediment en/of leidingwand dan in drinkwater.

De genen betrokken bij antibioticaproductie door schimmels en *Actinomyceten* lijken meer in leidingwand en sediment voor te komen. De laatste groep van micro-organismen (Actinomyceten) kunnen ook geur en smaakklachten veroorzaken in drinkwater (van der Kooij & van der Wielen, 2014).

Significante verschillen in genen van metabole routes tussen productielocaties zijn minder vaak waargenomen dan tussen monstertypen (33 tussen monstertype versus 15 metabole routes) en die verschillen zitten vooral in genen van eukaryote metabole routes (dieren, schimmels en planten in dit geval). Er zijn maar twee bacteriële

metabole routes die verschillen tussen de drie productielocaties. Deze routes zijn betrokken bij afbraak van galactose en xenobiotica. De vier metabole routes die significant verschillen tussen monstertypen en productielocaties zijn allen eukaryoot (plant, schimmel en dier). We kunnen hierdoor concluderen dat mogelijke verschillen in prokaryote processen in het distributiesysteem tussen productielocaties in dit onderzoek niet gevonden zijn.

4.1.4 Metagenomic binning

Met metagenomic binning is getracht om de functionele genen uit de metagenoomdata in te delen in bins. Na kwaliteitsfiltering van deze bins ontstaan metagenoom geassembleerde genomen (MAGs) waarbij elke MAG van een afzonderlijke operationele taxonomische unit (OTU) (één bacteriesoort) afkomstig is (Figuur 17). De verwachting is dat de meeste functionele genen in de monsters afkomstig zijn van de dominante OTU's in de monsters. Wanneer de functionele genen van deze OTU's bij elkaar gesorteerd worden in een MAG, kan er bepaald worden welke metabole routes wat betreft de benodigde genen compleet zijn. Dit geeft informatie over het potentieel metabolisme van deze dominante OTU's in biofilm, sediment en drinkwater.

De resultaten van het binning proces zijn in Tabel 4 weergegeven. Elk monster heeft een bepaalde metagenoomgrootte (metagenome_size, weergegeven in aantal nucleotiden) en een aantal bins (Nr_bins), dat de verzameling van genen voorstelt die waarschijnlijk van één OTU afkomstig is. Binning resulteert meestal in dat slechts een deel van het gehele metagenoom is gebind (metagenome_size_binned), vaak <40% van alle reads (%metagenome_size_binned). Dit betekent dat van alle genen in één monster minder dan 40% toegewezen konden worden in bins.

Tabel 4 Resultaten van het binning process van metagenomics data van alle gepoolde monsters. Gegeven zijn hoeveel bins er per monster ontstaan zijn en hoe groot deze bins zijn (in bp). Aan de hand van de grootte van de bins en de grootte van het metagenoom dat niet gebind is, is het percentage berekend dat gebind is.

Sample_ID			Nr scaffolds	Metagenoom -grootte (bp)	Nr_bins	Nr scaffolds gebind	Metagenoom grootte (bp) gebind	Metagenoom - grootte (bp) niet geclassificeerd	%Metagenoom-grootte gebind
P_56799	Seppe	Drinkwater	670.156	257.382.976	17	70.342	86.119.376	171.263.600	33
P_56800		Sediment	1.477.158	461.289.666	17	97.037	83.618.285	377.671.381	18
P_56804	Braakman	leidingwand	1.444.225	519.225.677	24	15426	159.556.273	359.669.404	31
P_59692		Drinkwater	1.099.490	412.294.034	26	108.675	132.141.068	280.152.966	32
P_59693		Sediment	1.470.931	467.331.714	15	97.992	91.635.829	375.695.885	20
P_59700	De laak	Leidingwand	1.489.017	492.575.386	20	105.574	109.374.867	383.200.519	22
P_60964		Drinkwater	1.398.471	467.307.191	36	91.975	111.671.515	355.635.676	24
P_60965		Sediment	1.602.348	497.872.277	14	75.165	75.864.095	422.008.182	15
P_60969		Leidingwand	1.338.987	534.318.749	35	164.434	190.516.960	343.801.789	36

4.1.4.1 Kwaliteitscontrole bins

Van de bins is een kwaliteitscontrole nodig om te bepalen welke bins van genoeg kwaliteit zijn zodat we kunnen spreken van een MAG. Hierbij wordt ook de compleetheid en de grootte van de bins bepaald. Zoals hierboven beschreven is elke bin als het goed is afkomstig van één OTU, dus één bacteriesoort. Als een bin 100% compleet is, betekent dit dat het hele genoom van deze OTU uit het metagenoom is gereconstrueerd. Over het algemeen moeten bins >80% compleet zijn om te kunnen analyseren welk potentieel metabolisme deze bin heeft. Als een bin namelijk minder dan 80% compleet is, dan mist het teveel genen en is de kans dat een metabole route ten onrechte niet compleet is erg groot. De meeste bins van de geanalyseerde drinkwater-, sediment- en leidingwandmonsters, uit het distributiesysteem van de drie onderzochte productielocaties, zijn niet compleet. Van de 204 gevonden bins zijn er 30 bins (14,7%) voor meer dan 80% compleet. Dit aantal is zo laag door (i) de relatief hoge diversiteit van de bacteriële populatie in de monsters, (ii) de kwaliteit van de metagenoomsequenties en (iii) de analysemethode. Voor monsters met een zeer diverse bacteriegemeenschap is het logischerwijs moeilijker om de metagenomen te binnen dan bij monsters waar maar enkele bacteriesoorten in voorkomen.

De metagenoomanalyse en binning is door een DNA sequencebedrijf (Baseclear) uitgevoerd op ruwe (ongefilterde) data met behulp van de tool MaxBin onder standaardinstellingen, waarbij gekozen is voor een minimum contig lengte van 150 bp. Een alternatief is om alleen langere contigs mee te nemen in de analyse. Lange contigs zijn namelijk makkelijker te sorteren en dus geven deze eerder complete bins. Ook is van langere contigs beter in te schatten of ze van goede kwaliteit zijn omdat ze meer sequentie-informatie bevatten. Dit aspect is ook besproken met een externe expert Charlotte Vavourakis (die niet verbonden is aan het DNA sequencebedrijf) op het gebied van metagenoombinning van micro-organismen. Deze expert heeft aangegeven dat in het vervolg alleen de langere contigs meegenomen zouden moeten worden in de analyse. Daardoor zal het percentage bins met >80% compleetheid hoger worden.

Van de 30 bins die meer dan 80% compleet waren, zijn alleen de bins bekeken die een genoomgrootte kleiner dan 8 MB hadden. Gemiddeld is een bacterieel genoom namelijk minder dan 8 MB groot (Nayfach & Pollard, 2015), waarbij het grootste genoom dat ooit is gesequencet uit 14 MB bestaat (*Sorangium cellulosum*). Een bacterieel genoom groter dan 8 MB is daarom verdacht en geeft dus een indicatie dat deze bin niet goed gesorteerd is en daardoor uit meerdere bacteriesoorten bestaat. Van de 30 bins die meer dan 80% compleet waren, hebben zes bins een genoom dat groter is dan 8 MB en worden dus verworpen. In totaal voldoen dus 24 bins aan de kwaliteitseis voor compleetheid van het genoom en genoomlengte.

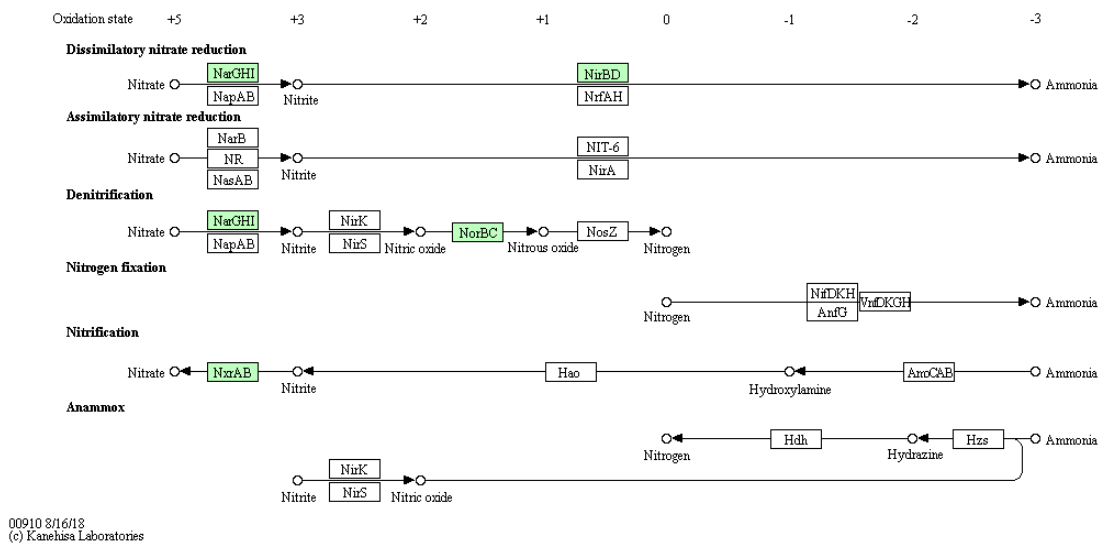
Naast incompleet gesorteerde bins en bins met een te groot genoom, kunnen ook contaminaties optreden in bins, dat wil zeggen dat verkeerd gesorteerd is waardoor DNA van verschillende micro-organismen in één bin terecht zijn gekomen. Dit aspect is ook besproken met de eerder genoemde externe expert. Uit dit gesprek werd duidelijk dat een dergelijke contaminatiecontrole noodzakelijk is om tot betrouwbare binning te komen. Doordat deze kwaliteitscontrole niet is uitgevoerd door het sequencebedrijf, is het niet bekend of contigs van verschillende micro-organismen in één bin terecht zijn gekomen. Dit probleem zal vooral optreden met de kortere contigs, omdat die moeilijker zijn toe te wijzen aan een OTU. Om toch een eerste aanzet tot contaminatiecontrole toe te passen op deze bins, is gekozen om een beperkte handmatige contaminatiecontrole uit te voeren. Deze controle is uitgevoerd door van deze 24 bins willekeurig minstens vijf bins uit te kiezen waarvan de contigs binnen een

bin met elkaar vergeleken zijn om te zien of de bin daadwerkelijk goed geconstrueerd was. Dit wordt gedaan door de contigs te vergelijken met een online database (NCBI blast: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Bins die goed gesorteerd zijn zouden namelijk contigs moeten hebben die overeen komen met dezelfde micro-organismen (dezelfde taxonomie) in de database. Er zijn zes bins overgebleven die goed gesorteerd lijken te zijn. De resultaten hiervan staan in Bijlage IV, waarbij deze bins in blauw gemarkeerd zijn.

Doordat een volledige softwarematige contaminatiecontrole niet is uitgevoerd op de bins, is het uiteindelijk niet mogelijk om van elke bin na te gaan welke bins voldoende betrouwbaar zijn om tot een MAG te behoren en volledig te beschrijven. Om toch te laten zien wat voor informatie een binbeschrijving kan opleveren, is besloten om twee bins verder te beschrijven. Eén van deze twee bins is aangetroffen in het drinkwater van Seppe. Deze bin voldeed niet aan de kwaliteitscontrole van de compleetheid van het genoom (het genoom was 71% in plaats van de gewenste meer dan 80% compleet). Doordat echter uit de taxonomische identificatie kwam dat deze bin behoorde tot *Mycobacterium* en uit de microbial profiling naar voren is gekomen dat *Mycobacterium* één van de dominante genera was in het drinkwater van Seppe, is besloten om deze bin toch in meer detail te beschrijven. De tweede bin die wordt beschreven is aangetroffen in het drinkwater van Braakman. Deze bin voldeed aan het criterium voor compleetheid van het genoom en genoomgrootte, én de contigs die van deze bin handmatig zijn gecontroleerd behoorde tot dezelfde soort.

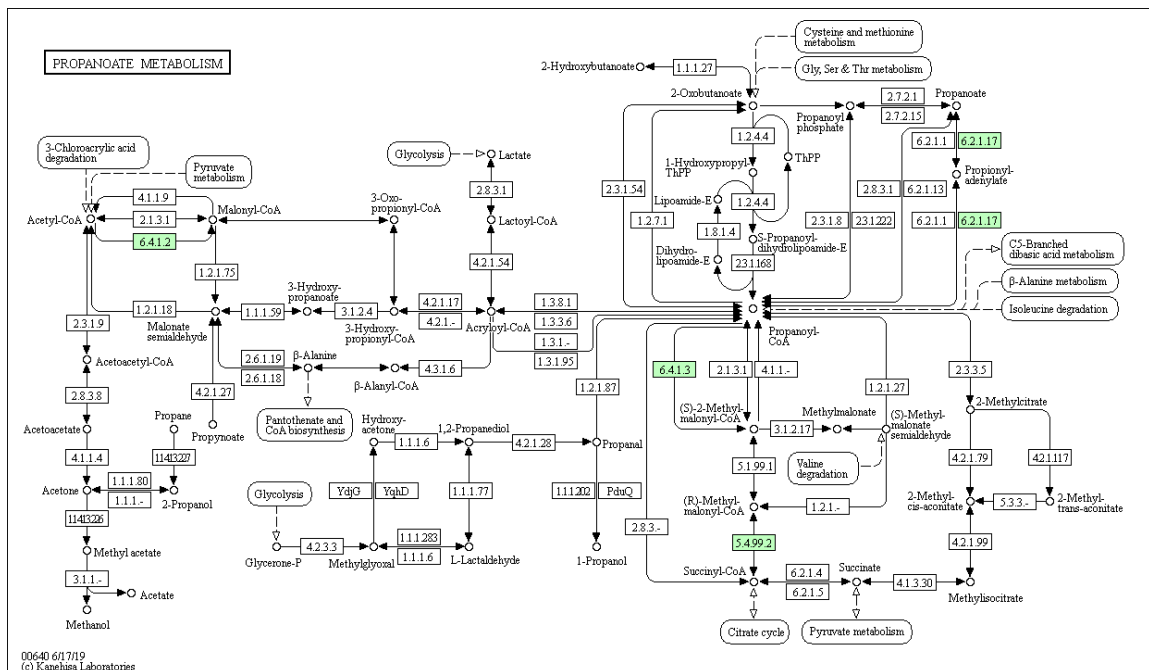
4.1.4.2 Bin P_56799_150.003

Bin P_56799_150.003 is afkomstig uit de gepoolde drinkwatermonsters van Seppe. Het vergelijken van een aantal lange contigs met de database m.b.v. BLAST, geeft dat deze gerelateerd zijn aan *Mycobacterium*. In de meeste watermonsters van Seppe is dit een dominant organisme (zie Bijlage V). Dit heeft het wellicht makkelijker gemaakt om bins te krijgen van dit organisme. Ondanks dat deze bin maar voor 71% compleet is, kan wel aangegeven worden welk metabolisme dit organisme waarschijnlijk heeft. Zo bevat deze bin alle genen die betrokken zijn bij nitraatreductie (nitraatomzetting naar ammonium) en een aantal genen die betrokken zijn bij denitrificatie (nitraat omzetting naar N₂) (Figuur 24). Het is ook bekend uit de literatuur dat *Mycobacterium* nitraat kan reduceren als zuurstof niet aanwezig is (Khan & Sarker, 2012), maar doordat het drinkwater zuurstofrijk is zal dit in het distributiesysteem waarschijnlijk niet optreden.



Figuur 24 Schematische weergave van de verschillende metabole routes waarin nitraat omgezet wordt. De pijlen geven aan welk proces plaatsvindt. De afkortingen in de blokken zijn de functionele genen die coderen voor enzymen die dit proces mogelijk maken. Groene blokken staan voor aanwezigheid en witte blokken voor afwezigheid van deze genen in bin P_56799_150.003.

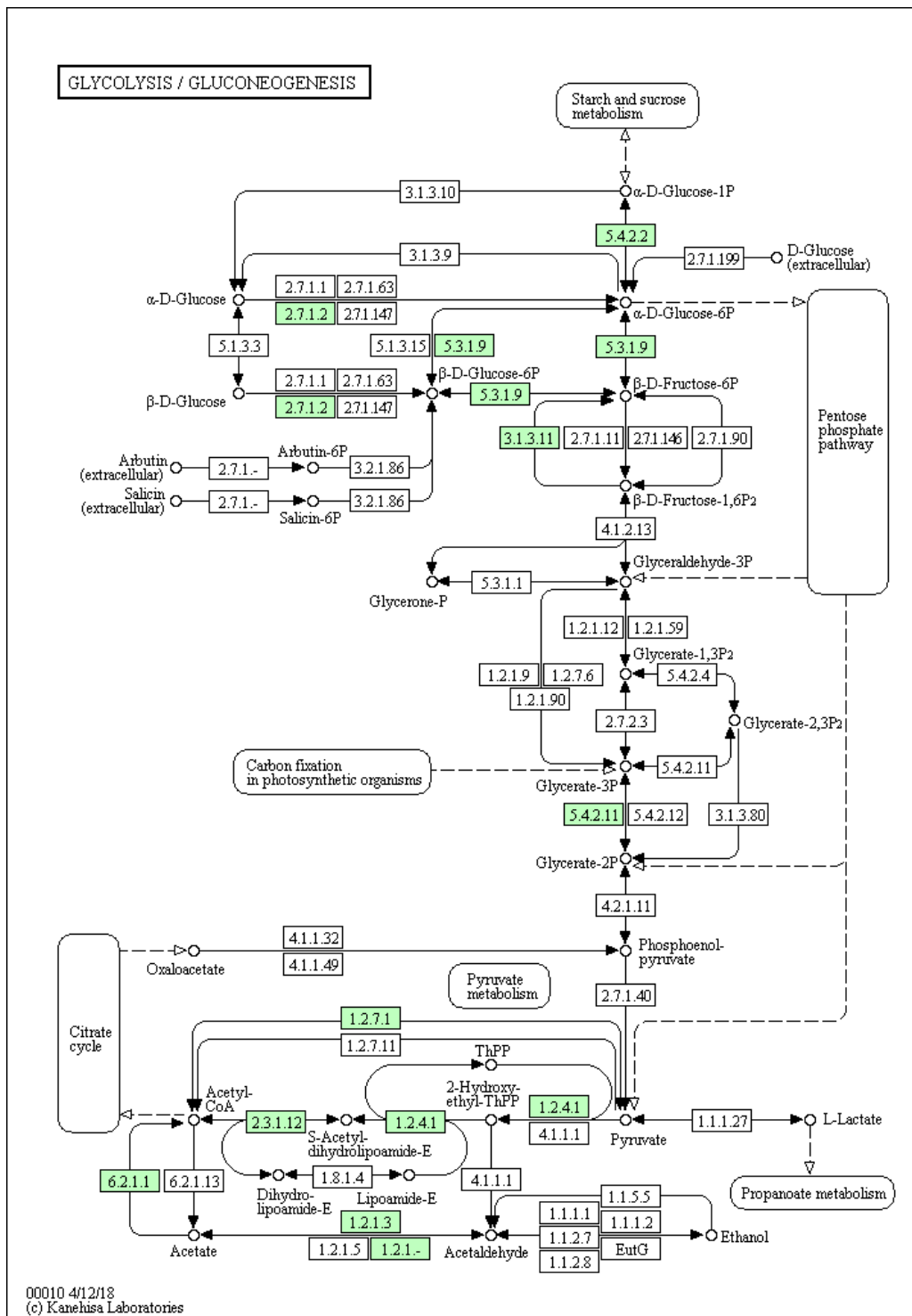
Verder bezit deze bin veel genen voor de omzetting van propanoaat (de geconjugeerde base van het vetzuur propionaat). Het bevat ook alle genen om propionaat om te zetten in propionyl-CoA en om dit verder om te zetten naar succinyl-CoA (Figuur 25). Dit is belangrijk, aangezien van onevenketenige vetzuren tijdens de betaoxidatie acetyl-CoA en propionyl-CoA geproduceerd worden in *Mycobacterium*. Deze worden respectievelijk omgezet via de glyoxylaatcyclus en de methylcitraatcyclus en worden bouwstenen geproduceerd die voor anabole doeleinden kunnen dienen (Upton & McKinney, 20017). *Mycobacterium* heeft veel genen die coderen voor de betaoxidatie (Williams et al., 2011). In deze bin zijn ook de essentiële genen voor betaoxidatie aanwezig, namelijk acyl-CoA dehydrogenase en acetyl-CoA acyltransferase. Dit kan verklaren dat genen voor vetzuurafbraak in de monsters van Seppe verhoogd aanwezig waren. Deze monsters worden namelijk gedomineerd door *Mycobacterium*. Er is ook aangetoond dat *Mycobacterium* geïsoleerd uit dierlijke longen de voorkeur geeft aan vetzuren voor groei (Williams et al, 2011). Hieruit kan geconcludeerd worden dat deze bin in het drinkwater van Seppe de potentie heeft om vetzuren volledig af te breken tot CO₂ en H₂O.



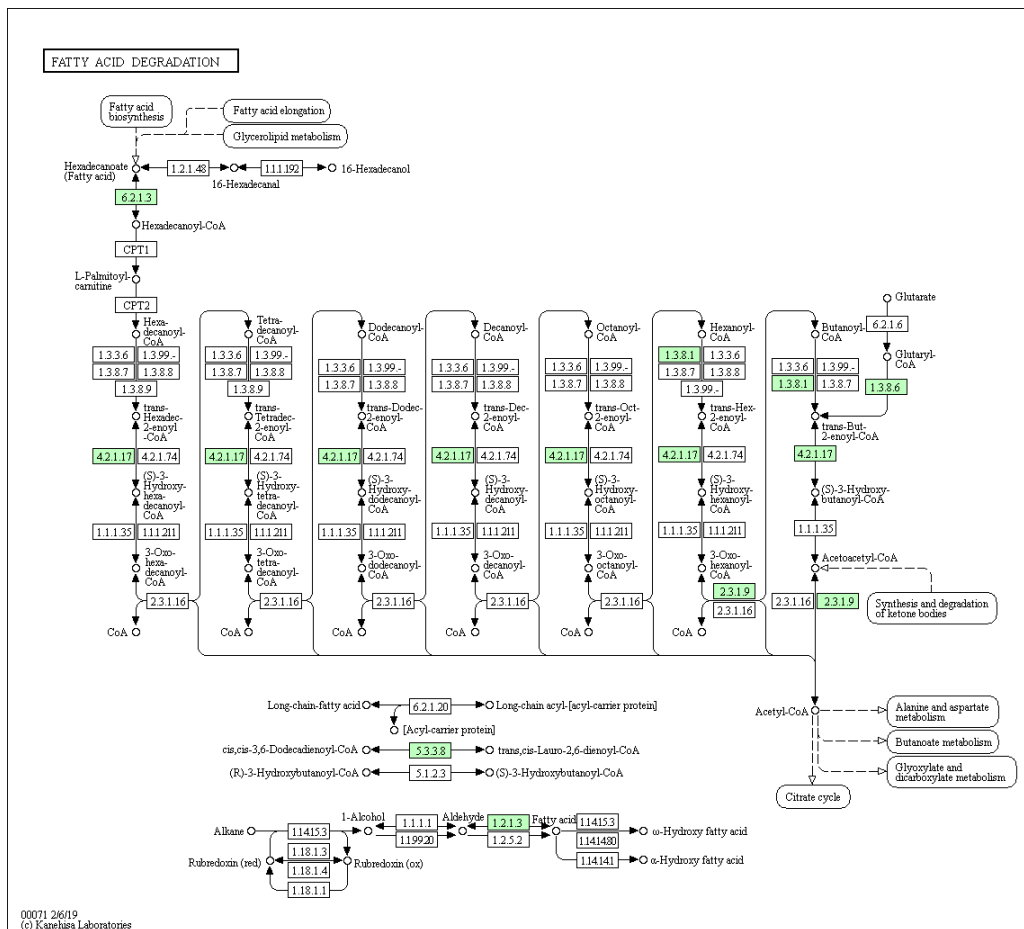
Figuur 25 Schematische weergave van de verschillende metabole routes betrokken bij propionaat metabolisme. De pijlen geven aan welk proces plaatsvindt. De afkortingen in de blokken zijn de functionele genen die coderen voor enzymen die dit proces mogelijk maken. Groene blokken staan voor aanwezigheid en witte blokken voor afwezigheid van deze genen in bin P_56799_150.003.

4.1.4.3 Bin P_59692.001

Bin P_59692.001 is afkomstig uit de gepoolde drinkwatermonsters van Braakman en is zeer compleet (95,3%). Het vergelijken van een aantal (de eerste 8) lange contigs met de database m.b.v. BLAST, geeft dat deze bin gerelateerd lijkt aan *Immundisolibacter cernigliae*. Dit genus komt voor in drinkwatermonsters van Braakman en De Laak, maar niet in Seppe (zie Bijlage V). Volgens de literatuur is het een aerob micro-organisme dat het beste groeit met pyruvaat als koolstofbron. Tevens is gerapporteerd dat *Immundisolibacter cernigliae* polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAHs) kan afbreken, en ook een gelimiteerd aantal organische zuren (Coteselli et al., 2017; Singleton et al., 2016). In die studies werden 91 substraten getest voor groei, waaronder meerdere suikers en vetzuren. De enige substraten die groei veroorzaakten waren 2-oxobutanzuur (α -Ketobutyrat), methylpyruvaat, mono-methyl-succinaat en α -ketovaleriaat. Dit komt overeen met de bevindingen dat deze bin niet alle genen bevat voor glycolyse (afbraak van suikers) (Figuur 26) of voor de betaoxidatie (afbraak van langketenige vetzuren) (Figuur 27). De bin bevat wel, zoals ook voor bin P_56799_150.003 is waargenomen, alle genen om propionaat om te zetten naar propionyl-CoA en vervolgens naar succinyl-CoA. Ook zijn genen gevonden die 2-oxobutyrat om kunnen zetten naar propionyl-CoA en later succinyl-CoA. Het succinyl-CoA komt vervolgens in de citroenzuurcyclus terecht om energie (ATP) te genereren. Deze gegevens samen impliceren dat bin P_59692.001 niet de potentie heeft om suikers en lange-keten vetzuren af te breken, maar vooral kortketenige vetzuren kan afbreken.



Figuur 26 Schematische weergave van de glycolyse. De pijlen geven aan welk proces plaatsvindt. De afkortingen in de blokken zijn de functionele genen die coderen voor enzymen die dit proces mogelijk maken. Groene blokken staan voor aanwezigheid en witte blokken voor afwezigheid van deze genen in bin_P_59692.001.



Figuur 27 Schematische weergave van de metabole route voor vetzuur afbraak via beta-oxidatie. De pijlen geven aan welk proces plaatsvindt. De afkortingen in de blokken zijn de functionele genen die coderen voor enzymen die dit proces mogelijk maken. Groene blokken staan voor aanwezigheid en witte blokken voor afwezigheid van deze genen in bin P_59692.001.

5 Discussie

5.1 ATP, KG22 en *Aeromonas*

De resultaten van de drie onderzochte productielocaties laten zien dat de hoeveelheid actieve biomassa het hoogst is in het sediment (Seppe en Braakman) of op de leidingwand (De Laak). Deze resultaten komen overeen met de studie van Liu et al. (2014) waarin werd berekend wat het aandeel actieve biomassa was voor drie matrices in het voorzieningsgebied van een productielocatie van Oasen: bulk water en opgeloste deeltjes; sediment en biofilm. Zij vonden dat het aandeel biomassa in bulk water en opgeloste deeltjes minder dan 2% was, terwijl dit meer dan 98% was in de biofilm op de leidingwand en sediment. Het is onduidelijk waarom in het voorzieningsgebied van De Laak de meeste actieve biomassa in de biofilm op de leidingwand werd gevonden en bij de twee andere productielocaties in het sediment. Waarschijnlijk speelt de sedimenthoeveelheid en de sedimentsamenstelling hierbij een rol. Zo hadden de spuiwatermonsters uit het voorzieningsgebied van De Laak over het algemeen de laagste sedimentvolumes. Aanvullend onderzoek naar de relatie tussen sedimentvolume en -samenstelling en de hoeveelheid actieve biomassa is echter nodig om hier betrouwbare uitspraken over te kunnen doen. KG22 en *Aeromonas* waren vrijwel alleen in het sediment aanwezig. Dat laat zien dat de wettelijke parameters voor groei (KG22 en *Aeromonas*) voornamelijk een maat zijn voor de groei van micro-organismen in het sediment, maar niet voor groei in de biofilm op de leidingwand of waterfase. Daarmee geven de wettelijke parameters voor groei in het distributiesysteem dus een onvolledig beeld van de mate van groei in het distributiesysteem. Deze conclusie is ook al eerder getrokken op basis van BTO onderzoek uit 2018 (Learbuch & Wullings, 2018). In ieder geval laten de resultaten zien dat de microbiologische activiteit voornamelijk plaatsvindt in de biofilm op de leidingwand en sediment, wat betekent dat de microbiologische processen in deze niches in het distributiesysteem domineren zoals ook al eerder is **gevonden (gang, wielen en lut, 2016)**.

5.2 Microbial profiling

De bacteriesamenstelling, bepaald met NGS analyse, van het reinwater wijkt af van de bacteriesamenstelling van het water bemonsterd bij de watermeter bij de consument. Dit laat zien dat de bacteriesamenstelling in het drinkwater verandert tijdens distributie. Deze verandering lijkt het grootst te zijn tijdens transport van de productielocatie naar het adres dichtbij de productielocatie (eerste stuk van de drinkwaterdistributie). De drinkwatermonsters van de drie locaties hebben wel een vergelijkbare bacteriesamenstelling (Figuur 12), dus verandering tijdens verdere distributie vanaf het adres dichtbij de productielocatie naar adressen verderop in het distributiesysteem zijn beperkt. Onze resultaten wijken af van wat er in een eerdere studie is waargenomen voor een aantal drinkwaterdistributiesystemen in Nederland waar drinkwater geproduceerd van grondwater werd gedistribueerd (Roeselers et al., 2015). Voor Braakman kan het gebruik van chloordioxide als laatste zuiveringsproces een mogelijke verklaring hiervoor geven. Chloordioxide doodt namelijk de bacteriën in het reinwater grotendeels af en daardoor kunnen andere bacteriesoorten deze niche innemen. Seppe en De Laak zijn echter productielocatie waar ook drinkwater van grondwater wordt geproduceerd en daarmee vergelijkbaar met de locaties die in de studie van Roeselers et al. (2015) werden geanalyseerd.

Een verandering van bacteriesamenstelling tijdens transport is in principe minder wenselijk, omdat het een indicatie is dat het water minder biologisch stabiel blijft tijdens distributie.

In tegenstelling tot het drinkwater is de bacteriesamenstelling van de biofilmmonsters op de leidingwand en in het sediment wel vergelijkbaar met elkaar. Het lijkt dus dat de condities in een distributiesysteem leiden tot een uniforme bacteriesamenstelling in de biofilm op de leidingwand en sediment.

Als de locaties onderling worden vergeleken (zie Figuur 12) dan is te zien dat het voorzieningsgebied Braakman apart clustert van Seppe en De Laak, die meer samen clusteren. Dit kan mogelijk verklaard worden door de manier van zuivering en bron van het water (oppervlakte of grondwater). Seppe en De Laak maken beide gebruik van grondwater en zuiveren dit met beluchting en filtratie. Braakman maakt gebruik van oppervlaktewater en zuivert het water onder andere met UV, actief kool en chloordioxide.

De monsters werden zowel op DNA als RNA niveau geanalyseerd en de samenstelling van de bacteriepopulatie op RNA niveau verschilde niet veel de samenstelling op basis van DNA. Dit betekent dat de bacteriën die aanwezig zijn (detectie door middel van DNA) ook actief zijn (detectie door middel van RNA) in het drinkwatersysteem.

5.3 Metagenoomanalyse

De metagenoomanalyse is uiteindelijk alleen toegepast op het geïsoleerde DNA en niet op het geïsoleerde RNA, omdat de methode om RNA te verkrijgen onvoldoende betrouwbaar was. Tijdens de monsternamen is het RNA monster namelijk niet direct geconserveerd om RNA afbraak tegen te gaan, maar is het monster bij 4°C opgeslagen. Directe conservatie gaat afbraak van RNA tegen, terwijl opslag bij 4°C, ook voor korte tijd, kan resulteren in verandering van de RNA samenstelling door verandering in het metabolisme van de micro-organismen. Een meer uitgebreide uitleg over de problemen met RNA bemonstering en conservatie is beschreven in de volgende rapporten: Heijnen et al., 2018a en Heijnen et al., 2018b. Momenteel is een goede methode om RNA uit drinkwatermonsters te conserveren nog niet beschikbaar, dus het is belangrijk om daar verder onderzoek naar te doen, zodat in de toekomst betrouwbare RNA analyses kunnen worden uitgevoerd.

Een metagenoomanalyse is toegepast om te onderzoeken of metabole processen konden worden geïdentificeerd, die mogelijk te maken hebben met de afbraak van bepaalde stofgroepen (bv eiwitten, koolhydraten, vetzuren, aminozuren). De resultaten laten zien dat genen die met name gerelateerd zijn aan vetzuur omzetting lijken te domineren, hoewel in mindere mate ook genen gerelateerd aan aminoazuromzetting werden waargenomen. Daarnaast komen genen voor celwandsynthese en het grootste deel van de genen voor de afbraak van xenobiotica meer voor in drinkwater dan in sediment en de leidingwand. De genen betrokken bij antibioticaproductie door schimmels en *Actinomyceten* komen meer voor in de biofilm op de leidingwand en het sediment dan in het drinkwater. De laatste groep van micro-organismen (*Actinomyceten*) kunnen ook geur en smaaklachten veroorzaken in drinkwater. Tussen productielocaties werden mogelijke verschillen in microbiologische processen in het distributiesysteem niet gevonden.

Het is echter belangrijk om aan te geven dat een aantal kanttekeningen zijn te plaatsen bij de metagenoomanalyse die is uitgevoerd.

Ten eerste is DNA en geen RNA gebruikt voor de metagenoomanalyse. Bij voorkeur wordt echter RNA gebruikt, omdat met analyse op het RNA duidelijker wordt welke genen daadwerkelijk actief worden afgeschreven in het ecosysteem. Met de uitgevoerde DNA-analyses wordt alleen duidelijk welke genen in potentie aanwezig zijn, maar niet welke genen ook daadwerkelijk actief worden afgeschreven. Doordat voor conservatie van RNA uit watermonsters nog geen optimale manier is gevonden, is binnen de hier beschreven studie toch gekozen om DNA te analyseren. Ten tweede zijn dezelfde monsters uit één voorzieningsgebied gepoold, wat waarschijnlijk de oorzaak is voor de weinige significante verschillen tussen de voorzieningsgebieden. Ten derde is de data door Baseclear 'gebinned', maar is het lastig om hoogkwalitatieve bins uit de "gebinnede" data te halen die verder geanalyseerd kunnen worden.

Ondanks deze kanttekeningen werden dus voornamelijk genen gevonden die betrokken zijn bij de afbraak van vetzuren en aminozuren. Uit de literatuur blijkt dat voor vrijwel alle onderzochte drinkwaterproductielocaties in Nederland een duidelijke relatie werd gevonden tussen de wettelijke nagroei-parameters KG22/*Aeromonas* en de BP₇ of BP₇-BP₆, wat laat zien dat gemakkelijk afbreekbare stoffen een belangrijke relatie hebben met nagroei (van der Wielen, 2018). Uit de traditionele AOC bepaling blijkt dat dit veelal verbindingen zijn die door stam Nox in de AOC-test worden afgebroken. Stam Nox is gespecialiseerd in de afbraak van carbonzuren, waardoor het aannemelijk is dat carbonzuren (kortketenige vetzuren) een belangrijk substraat zijn voor microbiologische omzetting en groei in het Nederlandse drinkwater. Naast deze gemakkelijk afbreekbare stoffen, kunnen ook moeilijk afbreekbare kolstofverbindingen in het Nederlandse drinkwater aanwezig zijn, met name op enkele locaties waar drinkwater wordt bereid uit oppervlaktewater (van der Wielen, 2018). Onderzoek heeft aangetoond dat op sommige productielocaties waar oppervlaktewater wordt gewonnen voor de drinkwaterbereiding, de aanwezigheid van deeltjesgebonden en/of hoogmoleculaire organisch koolstof (PHMOC) gecorreleerd is aan resultaten verkregen met bioassays gericht op moeilijk afbreekbare koolstofbronnen zoals AOC-A3 en BPP₁₄. Daarnaast vertonen de parameters voor moeilijk afbreekbare verbindingen een correlatie met nagroei (*Aeromonas* en dierlijke organismen), terwijl de AOC-P17/NOX bioassay voor eenvoudig assimileerbaar koolstof op deze locaties niet gecorreleerd was aan nagroei (Hijnen et al., 2017). Op enkele locaties waar oppervlaktewater voor de drinkwaterbereiding wordt gebruikt, kunnen lange vetzuurketens en/of moeilijk afbreekbare aminozuren ook van belang zijn. Carbonzuren, aminozuren en langketenige vetzuren zijn eerder gevonden in drinkwater (Hammes et al., 2006, Jurado-Sanchez et al., 2014; van Bel et al., 2018) in de µg C per liter range. Voor de laatste studie geldt dat echter niet duidelijk is of de aangetroffen vetzuren en aminozuren in het drinkwater voorkwamen, of dat deze uit de plastic buisjes, waar het water in was bewaard, gelekt zijn (van Bel et al., 2018).

In dit project zijn de gedetecteerde genen voor aminozuursynthese of -afbraak specifiek voor o.a. isoleucine, leucine threonine, dus het is mogelijk dat deze aminozuren gemetaboliseerd worden in het drinkwater. Het kan echter ook betekenen dat deze aminozuren vooral geproduceerd worden. Voor de vetzuren is het lastiger te zeggen welke vetzuren mogelijk gemetaboliseerd worden, omdat de meeste vetzuren afgebroken worden via de betaoxidatieroute waarbij de genen niet specifiek zijn voor bepaalde ketenlengtes. Er zijn wel een aantal genen gevonden die betrokken zijn bij het metabolisme van kortketenige vetzuren zoals butyraat en propionaat, dat overeen komt met eerder gevonden resultaten in Nederlands drinkwater zoals in bovenstaande paragraaf is beschreven. Deze genen zijn mogelijk ook betrokken bij de verdere afbraak van langketenige vetzuren na betaoxidatie. Het 'binnen' van het metagenoom

in metagenoom-geassembleerde genomen (MAGs) zou kunnen helpen om meer te weten te komen over de functie van de meest dominante genera in de monsters. Het zou daarmee kunnen blijken of deze daadwerkelijk de gehele metabole route voor betaoxidatie hebben of dat deze genera ook andere koolstofbronnen zoals bijvoorbeeld suikers kunnen metaboliseren. Helaas heeft het 'binnen' tot MAGs te weinig kwalitatieve bins opgeleverd om hier een uitspraak over te kunnen doen. Metagenomicsresultaten in combinatie met de literatuur hebben aangetoond dat bacteriën behorende tot het genus *Mycobacterium*, welke dominant zijn in het drinkwater van productielocatie Seppe, langketenige vetzuren kunnen afbreken. Verder heeft metagenomics data aangetoond dat het genus *Immundisolibacter*, dat voorkomt in drinkwater monsters van Braakman en De Laak, niet in staat is om suikers af te breken, maar vooral kortketenige vetzuren (carbonszuren).

Bij zowel de microbial profiling resultaten als de metagenomicsresultaten werd gezien dat drinkwater en biofilm (van leidingwand en sediment) van elkaar verschillen. Dit geeft dus aan dat niet alleen de bacteriesoortensamenstelling verschilt tussen de drinkwater en biofilm, maar dat de bacteriën in drinkwater ook andere metabole processen uitvoeren dan de bacteriën in de biofilm.

6 Conclusie en aanbevelingen

6.1 Conclusies

Op basis van de resultaten kunnen we het volgende concluderen:

- De biomassaconcentratie is het hoogst in de biofilm op het sediment (Seppe en Braakman) of op de leidingwand (De Laak).
- KG22 en *Aeromonas* zijn vooral in het sediment aanwezig.
- KG22 en *Aeromonas* zijn onbetrouwbaar als voorspellende parameter voor de hoeveelheid actieve biomassa in alle niches van het distributiesysteem (sediment, leidingwand en drinkwater).
- De bacteriesamenstelling in het drinkwater verandert tijdens distributie naar de consument, deze verandering treedt op in het begin van het distributiesysteem.
- De biofilm- en sedimentmonsters zijn vergelijkbaar met elkaar en het lijkt dus dat de condities in een distributiesysteem leiden tot een uniforme bacteriesamenstelling in de biofilm op de leidingwand en sediment.
- De metagenoomanalyse impliceert dat kortketen- en langketenvetzuren waarschijnlijk gemetaboliseerd worden door de biologische processen in het distributiesysteem.
- De metagenoomanalyses geven inzicht in de metabole potentie van het drinkwater, sediment en de leidingwand. Metagenoomanalyse met binning blijkt lastig te zijn met drinkwatermonsters waar de microbiële diversiteit hoog is.
- Mogelijke verschillen in microbiologische processen in het distributiesysteem tussen productielocaties zijn in dit onderzoek niet gevonden.

6.2 Aanbevelingen

Op basis van de resultaten doen we de volgende aanbevelingen:

- In het laboratorium onder gecontroleerde condities verschillende vetzuren doseren aan biofilmmonitoren om meer duidelijkheid te krijgen over het belang van deze stoffen op biofilmvorming in het distributiesysteem. Dit onderzoek wordt momenteel uitgevoerd in het BTO (projectnummer: 402045-102). Met behulp van de resultaten van een dergelijk onderzoek kunnen de kritische condities voor biofilmvorming in het distributiesysteem worden achterhaald en gebruikt om beheersmaatregelen te definiëren.
- Onderzoek naar een betere indicator dan *Aeromonas* en KG22 voor biofilmvorming op de leidingwand. Het genus *Mycobacterium* lijkt daarbij een mogelijk geschikte kandidaat te zijn.
- De metagenoomanalyse waarbij binning en kwaliteitsfiltering optimaal zijn, zal nog meer informatie geven over de metabole potentie van dominante micro-organismen. Dit kan helpen met het ontrafelen van de metabole processen in distributienetwerken. Het vereist hoge resolutie (veel reads) d.m.v. diep sequencen en op maat gemaakte binning methodes. Pas wanneer optimale binning is toegepast kan bepaald worden wat de kracht en limitaties zijn van metagenoomanalyse in dit soort onderzoek.
- De uitgevoerde metagenoomanalyse op het DNA geeft informatie over de metabole potentie. Een dergelijke analyse op het RNA (transcriptoomanalyse) geeft informatie over de actieve metabole routes, maar voor drinkwater zijn er nog geen methoden gevonden om RNA optimaal te conserveren. Het is daarom aan te

bevelen om aanvullend onderzoek te doen naar mogelijke methoden om het RNA uit drinkwater te conserveren.

- Een ander alternatief is om de eiwitsamenstelling te onderzoeken (proteoomanalyse). Een dergelijk proteoomanalyse geeft informatie over welke enzymen (en daarmee welke metabole processen) actief zijn in een ecosysteem. Eiwitten zijn stabiel dan RNA en het zou daarom waardevol zijn om te bepalen of eiwitextractie uit drinkwater mogelijk is voor proteoomanalyse. Indien dit het geval is, zou onderzoek moeten worden of proteoomanalyse waardevolle informatie geeft voor soortgelijk onderzoek aan distributiesystemen en hoe dit metagenoomanalyse kan complementeren of vervangen.

7 Referenties

Andersen, K. S., Kirkegaard, R. H., Karst, S. M., & Albertsen, M. (2018). ampvis2: an R package to analyse and visualise 16S rRNA amplicon data. *BioRxiv*, 299537.

Corteselli, E. M., Aitken, M. D., & Singleton, D. R. (2017). Description of *Immundisolibacter cernigliae* gen. nov., sp. nov., a high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium within the class Gammaproteobacteria, and proposal of *Immundisolibacterales* ord. nov. and *Immundisolibacteraceae* fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(4), 925.

Domingo, O. (2019). Microbial ecology of *E. coli* removal mechanisms and drinking water production in slow sand filters exposed to emerging contaminants (Doctoral dissertation, NUI Galway).

Hammes, F.; Salhi, E.; Koster, O.; Kaiser, H. P.; Egli, T.; von Gunten, U., Mechanistic and kinetic evaluation of organic disinfection by-product and assimilable organic carbon (AOC) formation during the ozonation of drinking water. *Water Res* 2006, 40 (12), 2275-86.

Heijnen, L., Stuyfzand, P. J., Zandvliet, L., Houtman, C., Knezev, A., van den Bogert, T., . . . Hofman-Caris, R. (2018a). Microbial profiling en metagenomics analyses voor detailkarakterisering microbiologische processen bij duininfiltratie (Vol. KWR 2018.049). Nieuwegein: KWR

Heijnen, L. (2018b). Mogelijkheden voor toepassings van: Metatranscriptomics, Microbial profiling en MinION sequencing (Vol. BTO 2018.044). Retrieved from Nieuwegein: KWR.

Hijnen, W. A. M., Schurer, R., Bahlman, J. A., Ketelaars, H. A. M., Italiaander, R., van der Wal, A., & van der Wielen, P. W. J. J. (2018). Slowly biodegradable organic compounds impact the biostability of non-chlorinated drinking water produced from surface water. *Water research*, 129, 240-251.

Jurado-Sanchez, B., Ballesteros, E., & Gallego, M. (2014). Occurrence of carboxylic acids in different steps of two drinking-water treatment plants using different disinfectants. *Water research*, 51, 186-197.

Kanehisa, M., et al., KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(Database issue): p. D109-14.

Khan, A., & Sarkar, D. (2012). Nitrate reduction pathways in mycobacteria and their implications during latency. *Microbiology*, 158(2), 301-307.

Kultima, J. R., Sunagawa, S., Li, J., Chen, W., Chen, H., Mende, D. R., ... & Wang, J. (2012). MOCAT: a metagenomics assembly and gene prediction toolkit. *PloS one*, 7(10).

- Learbuch, K., & Wullings, B. (2018). Indicator voor biofilm in het drinkwater-distributiesysteem (Vol. BTO 2018.011). Retrieved from Nieuwegein:KWR.
- Liu, G., Bakker, G.L., Li, S., Vreeburg, J.H., Verberk, J.Q., Medema, G.J., Liu, W.T. and Van Dijk, J.C. (2014) Pyrosequencing reveals bacterial communities in unchlorinated drinking water distribution system: an integral study of bulk water, suspended solids, loose deposits, and pipe wall biofilm. *Environmental Science & Technology* 48(10), 5467-5476.
- Madigan, M. T.; Bender, K. S.; Buckley, D. H.; Sattley, W. M.; Stahl, D. A., *Brock biology of microorganisms*. 2018.
- McMurdie and Holmes (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*. 8(4):e61217
- Liu, G., Tao, Y., Zhang, Y., Lut, M., Knibbe, W.-J., van der Wielen, P., Liu, W., Medema, G. and van der Meer, W. (2017) Hotspots for selected metal elements and microbes accumulation and the corresponding water quality deterioration potential in an unchlorinated drinking water distribution system. *Water Research* 124, 435-445.
- Nayfach, S., & Pollard, K. S. (2015). Average genome size estimation improves comparative metagenomics and sheds light on the functional ecology of the human microbiome. *Genome biology*, 16(1), 51.
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., & Pevzner, P. A. (2017). metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome research*, 27(5), 824-834.
- Pinto, A. J.; Xi, C.; Raskin, L., Bacterial community structure in the drinking water microbiome is governed by filtration processes. *Environ Sci Technol* 2012, 46 (16), 8851-8859.
- Roeselers, G.; Coolen, J.; van der Wielen, P. W.; Jaspers, M. C.; Atsma, A.; de Graaf, B.; Schuren, F., Microbial biogeography of drinking water: patterns in phylogenetic diversity across space and time. *Environ Microbiol* 2015, 17 (7), 2505-2514.
- Singleton, D. R., Dickey, A. N., Scholl, E. H., Wright, F. A., & Aitken, M. D. (2016). Complete genome sequence of a bacterium representing a deep uncultivated lineage within the Gammaproteobacteria associated with the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Genome Announc.*, 4(5), e01086-16.
- Upton, A. M., & McKinney, J. D. (2007). Role of the methylcitrate cycle in propionate metabolism and detoxification in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*, 153(12), 3973-3982.
- van Bel, N. (2018). Vrijkomen van stoffen uit Asellus in drinkwater (Vol. KWR 2018.013). Nieuwegein: KWR.
- van der Kooij, D., & van der Wielen, P. (2009). Invloed van watersamenstelling, afstand en seizoen op ATP in water en sediment uit het leidingnet van zes pompstations (BTO 2009.044). Nieuwegein: KWR.

van der Kooij, D.; van der Wielen, P. W. J. J., *Microbial growth in drinking-water supplies. Problems, causes, control and research needs*. IWA Publishing: London, UK, 2014; p 453.

van der Kooij, D., & Veenendaal, H. R. (2014). Bepaling van de biomassaproductiepotentie (BPP) van drinkwater. (Vol. BTO 2014.038) Nieuwegein: KWR

van der Wielen, P.W.J.J. and Lut, M.C. (2016) Distribution of microbial activity and specific microorganisms across sediment size fractions and pipe wall biofilm in a drinking water distribution system. *Water Science and Technology: Water Supply* 16(4), 896-904.

van der Wielen, P.W.J.J. (2018) Aandachtswaarden nieuwe methoden biologische stabiliteit. BTO 2018.049. Nieuwegein: KWR

Williams, K. J., Boshoff, H. I., Krishnan, N., Gonzales, J., Schnappinger, D., & Robertson, B. D. (2011). The Mycobacterium tuberculosis β -oxidation genes echA5 and fadB3 are dispensable for growth in vitro and in vivo. *Tuberculosis*, 91(6), 549-555.

Wu, Y. W., Tang, Y. H., Tringe, S. G., Simmons, B. A., & Singer, S. W. (2014). MaxBin: an automated binning method to recover individual genomes from metagenomes using an expectation-maximization algorithm. *Microbiome*, 2(1), 26.

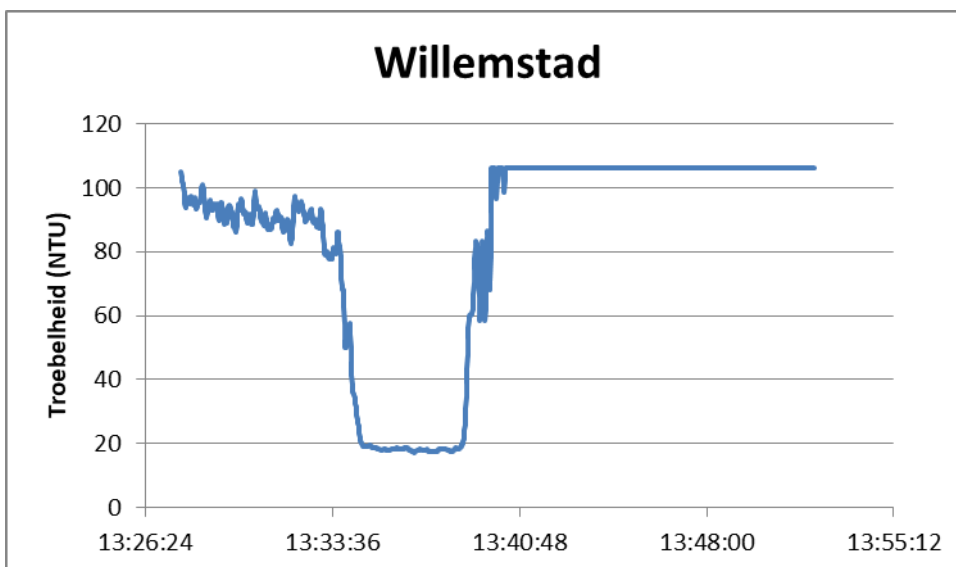
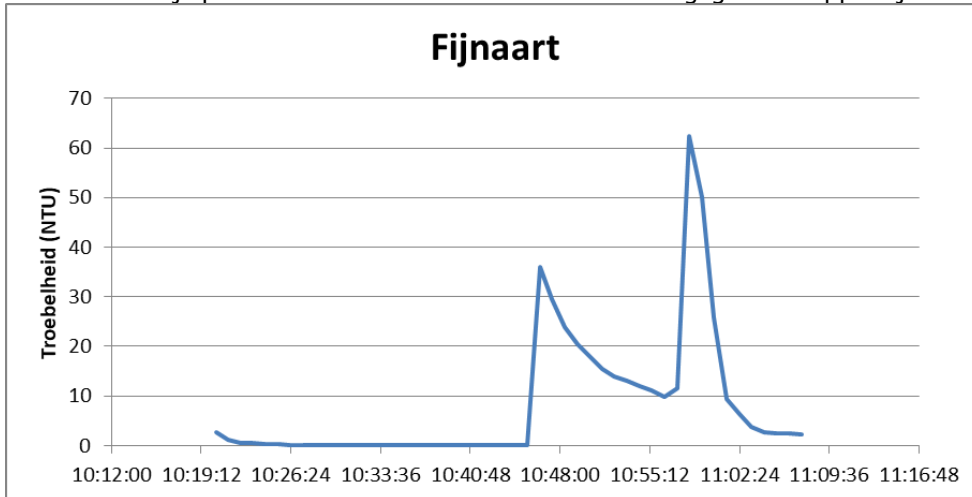
Bijlage I Bemonsteringsprotocol leidinguitname

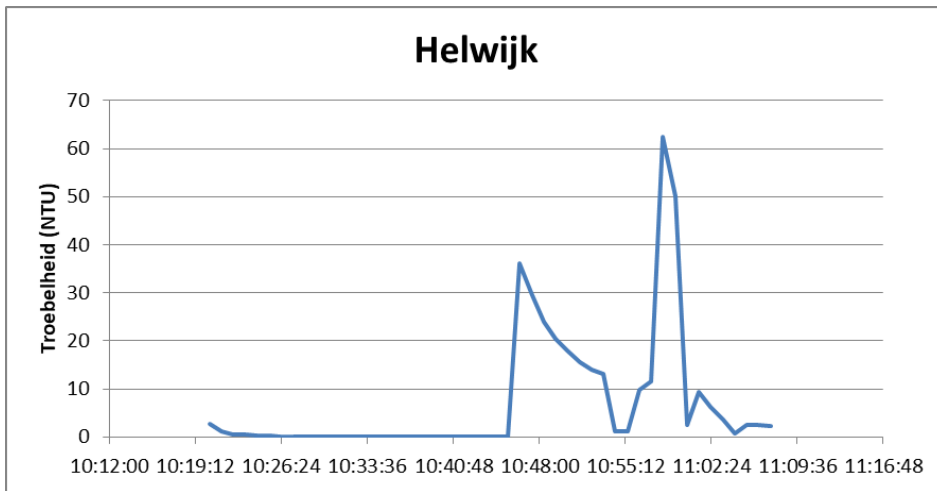
Leidinguitname protocol

- Leiding wordt uitgegraven en rondom vrijgemaakt van de bodem;
- Plastic bescherming plaatsen in de put, om de put schoon te houden;
- Ontwateren: wanneer de leiding onder de grondwaterspiegel ligt wordt een ontwateringspomp gebruikt om de put vrij te houden van water;
- Afsluiters voor en na uitnamepunt dicht/ druk eraf;
- Buitenkant leiding wordt goed schoongemaakt met chloorwater;
- Even aftekenen met een watervaste marker: wat de stroomrichting is en wat de bovenkant is;
- Zaag voor gebruik schoonmaken met chloorwater.;
- Leiding wordt ontwaterd door een sleufje te zagen in de buiswand. Zorg er voor dat de put vrij blijft van water;
- Nadat het meeste water is weggelopen uit de leiding, wordt met twee zaagsneden, het stuk leiding van 0,5 m (maximaal de breedte van de koelbox!) uitgezaagd. Vermijd tijdens het verwijderen van het stuk leiding sterke mechanische trillingen en schokken. Ook mag het stuk leiding in- en uitwendig niet in aanraking komen met het bodemmateriaal of met het grondwater.
- Als de leiding water of de bodem heeft geraakt, is dit geen bruikbaar monster meer en zal de leidinguitname opnieuw dienen te gebeuren.
- Het leidingstuk wordt (zonder water) in een steriele zak gedaan en met een kabelbinder (tyrap) dichtgemaakt. Vervolgens wordt het geheel in nog een steriele zak gedaan en ook weer dicht gemaakt met een kabelbinder (tyrap). Dit is zodat er geen water van het ijs bij de leiding kan komen. Vervolgens wordt het geheel in de koelbox met ijs geplaatst en vervoerd naar het laboratorium.

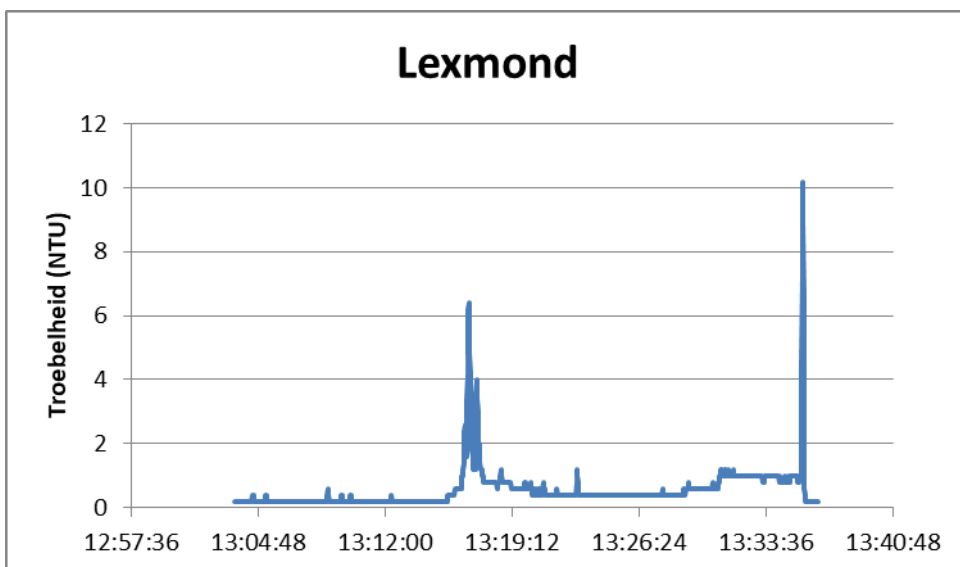
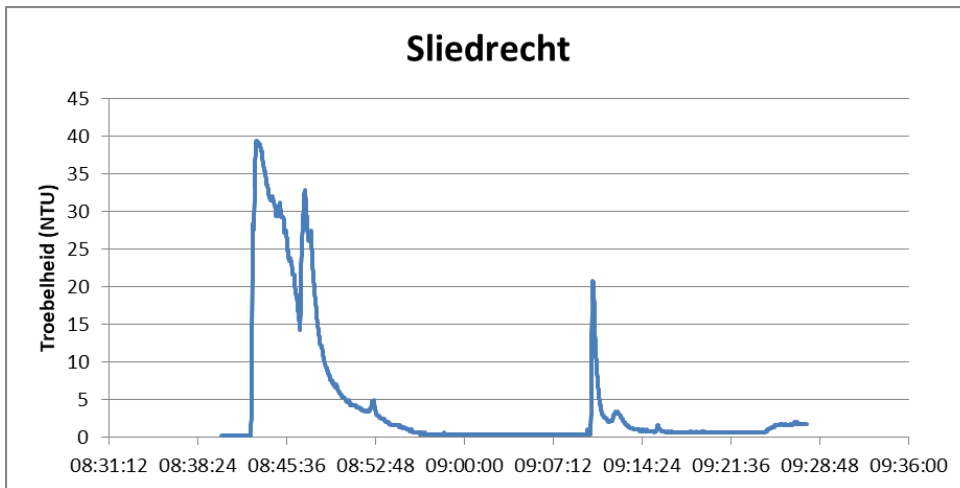
Bijlage II Troebelheidsmetingen

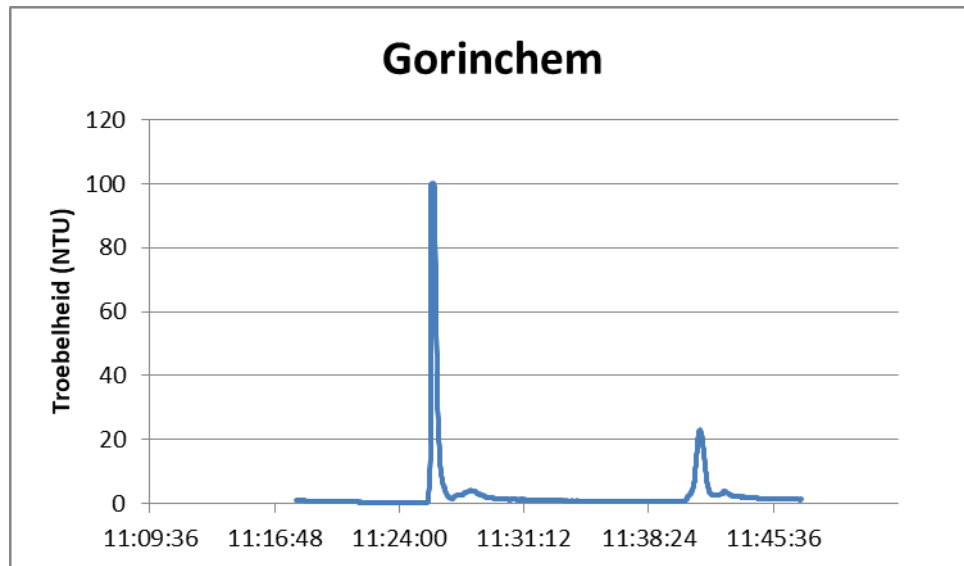
Troebelheid bij spuiacties van Brabant Water in voorzieningsgebied Seppe 3 juli 2018.



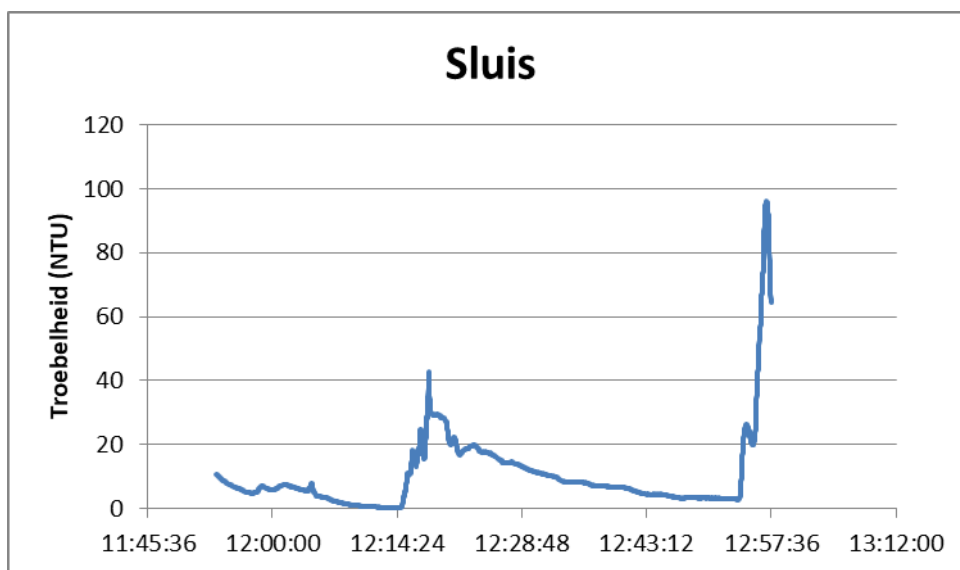
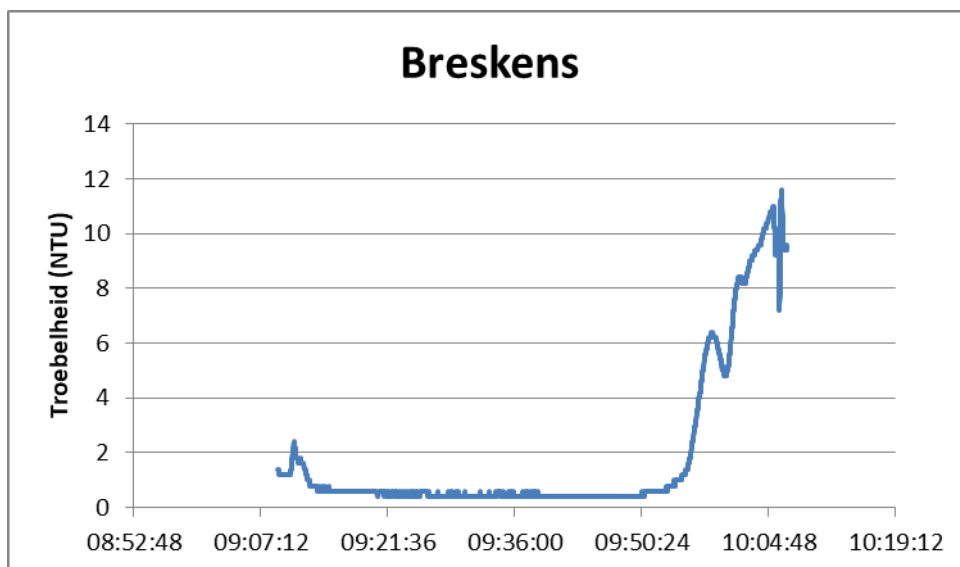


Troebelheid bij spuiacties van Oasen in voorzieningsgebied De Laak 20 september 2018.

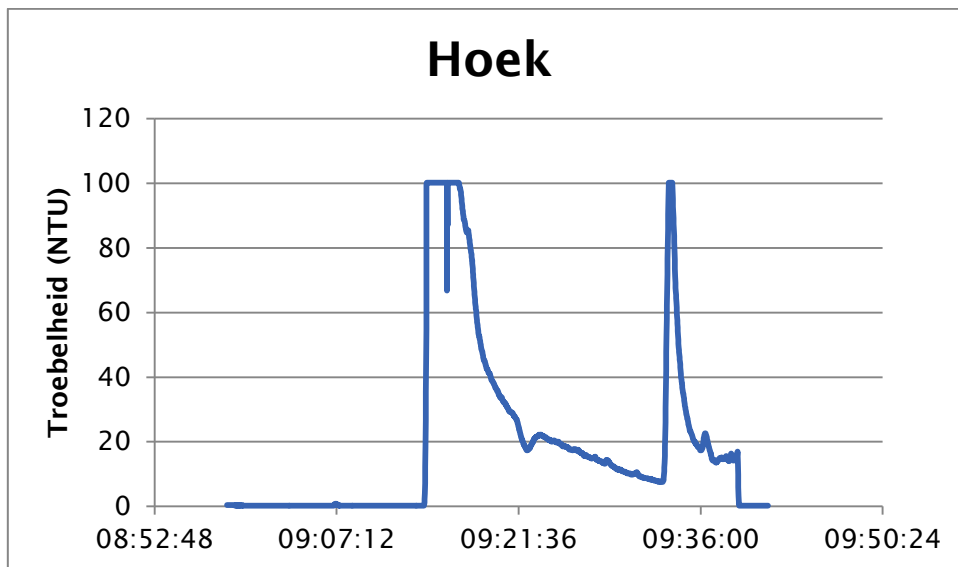




Troebelheid bij spuiacties van Evides in voorzieningsgebied Braakman 13 en 14 september 2018.



14 september 2018



Bijlage III Metabole route data

Tabel S1: Alle metabole routes die in minstens één monster een anomaliteit zijn (observaties die meer dan ± 2 SD van het gemiddelde afwijken). De reatieve abundantie van metabole routes (%) is berekend aan de hand van de som van de relatieve abundantie van de genen (%). pathID = het KEGG nummer behorende bij een specifieke route, path_name = de naam van deze route, anomaly_sample = het sample waarvoor de route een anomaliteit is, Sample_name = de naam van het sample waarvoor de route een anomaliteit is, WB = wanneer Waterbedrijf een significant effect heeft op metabole route abundantie is een '1' gegeven (2-way ANOVA, $p < 0.05$), type = wanneer monstertype een significant effect heeft op metabole route abundantie is een '1' gegeven (2-way ANOVA, $p < 0.05$).

pathID	path_name	anomaly_sample	Sample_name	WB	type
ko00030	Pentose phosphate pathway	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00040	Pentose and glucuronate interconversions	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00061	Fatty acid biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00062	Fatty acid elongation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00071	Fatty acid degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00072	Synthesis and degradation of ketone bodies	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00120	Primary bile acid biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00121	Secondary bile acid biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00195	Photosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00232	Caffeine metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00261	Monobactam biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00280	Valine, leucine and isoleucine degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00281	Geraniol degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00300	Lysine biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00310	Lysine degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00311	Penicillin and cephalosporin biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00332	Carbapenem biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00340	Histidine metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00350	Tyrosine metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00360	Phenylalanine metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00362	Benzoate degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00363	Bisphenol degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00380	Tryptophan metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00410	beta-Alanine metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0

ko00472	D-Arginine and D-ornithine metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00510	N-Glycan biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00513	Various types of N-glycan biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00540	Lipopolysaccharide biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00561	Glycerolipid metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00562	Inositol phosphate metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00563	Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00565	Ether lipid metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	1
ko00590	Arachidonic acid metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00591	Linoleic acid metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00592	alpha-Linolenic acid metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00603	Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00620	Pyruvate metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00624	Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00625	Chloroalkane and chloroalkene degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00626	Naphthalene degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00627	Aminobenzoate degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00640	Propanoate metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00642	Ethylbenzene degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	1
ko00650	Butanoate metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00780	Biotin metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00791	Atrazine degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00830	Retinol metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00860	Porphyrin and chlorophyll metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00900	Terpenoid backbone biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00902	Monoterpenoid biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	1
ko00903	Limonene and pinene degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00930	Caprolactam degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00940	Phenylpropanoid biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	1
ko00941	Flavonoid biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00943	Isoflavonoid biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00945	Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00983	Drug metabolism - other enzymes	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko00984	Steroid degradation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0

ko01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko01051	Biosynthesis of ansamycins	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko01052	Type I polyketide structures	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko01053	Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko01054	Nonribosomal peptide structures	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko01055	Biosynthesis of vancomycin group antibiotics	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko01212	Fatty acid metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko01220	Degradation of aromatic compounds	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko01501	beta-Lactam resistance	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko01503	Cationic antimicrobial peptide (CAMP) resistance	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko02030	Bacterial chemotaxis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko02060	Phosphotransferase system (PTS)	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko03020	RNA polymerase	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko03040	Spliceosome	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko03320	PPAR signaling pathway	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko03450	Non-homologous end-joining	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04014	Ras signaling pathway	P_56799	Seppe_drinkwater	0	1
ko04024	cAMP signaling pathway	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04066	HIF-1 signaling pathway	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04111	Cell cycle - yeast	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04115	p53 signaling pathway	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04122	Sulfur relay system	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04144	Endocytosis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04145	Phagosome	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04146	Peroxisome	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04151	PI3K-Akt signaling pathway	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04260	Cardiac muscle contraction	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04270	Vascular smooth muscle contraction	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04320	Dorso-ventral axis formation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04380	Osteoclast differentiation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04391	Hippo signaling pathway - fly	P_56799	Seppe_drinkwater	1	0
ko04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04540	Gap junction	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04550	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04610	Complement and coagulation cascades	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04611	Platelet activation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04614	Renin-angiotensin system	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0

ko04620	Toll-like receptor signaling pathway	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04623	Cytosolic DNA-sensing pathway	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04640	Hematopoietic cell lineage	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04710	Circadian rhythm	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04721	Synaptic vesicle cycle	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04722	Neurotrophin signaling pathway	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04724	Glutamatergic synapse	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04725	Cholinergic synapse	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04727	GABAergic synapse	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04728	Dopaminergic synapse	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04730	Long-term depression	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04740	Olfactory transduction	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04742	Taste transduction	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04745	Phototransduction - fly	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04750	Inflammatory mediator regulation of TRP channels	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04810	Regulation of actin cytoskeleton	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04913	Ovarian steroidogenesis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04917	Prolactin signaling pathway	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04922	Glucagon signaling pathway	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04923	Regulation of lipolysis in adipocytes	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04964	Proximal tubule bicarbonate reclamation	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04973	Carbohydrate digestion and absorption	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04976	Bile secretion	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko04977	Vitamin digestion and absorption	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05016	Huntington disease	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05100	Bacterial invasion of epithelial cells	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05130	Pathogenic Escherichia coli infection	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05140	Leishmaniasis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05144	Malaria	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05152	Tuberculosis	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05161	Hepatitis B	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05164	Influenza A	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05168	Herpes simplex virus 1 infection	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05210	Colorectal cancer	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05212	Pancreatic cancer	P_56799	Seppe_drinkwater	0	1
ko05214	Glioma	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0

ko05223	Non-small cell lung cancer	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05230	Central carbon metabolism in cancer	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05340	Primary immunodeficiency	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05410	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	P_56799	Seppe_drinkwater	1	1
ko05412	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	P_56799	Seppe_drinkwater	0	0
ko05218	Melanoma	P_56800	Seppe_sed	0	0
ko04340	Hedgehog signaling pathway	P_56804	Seppe_biofilm	0	0
ko04512	ECM-receptor interaction	P_56804	Seppe_biofilm	0	0
ko05213	Endometrial cancer	P_56804	Seppe_biofilm	0	0
ko05217	Basal cell carcinoma	P_56804	Seppe_biofilm	0	0
ko00633	Nitrotoluene degradation	P_59692	Braakman_drinkwater	0	0
ko01056	Biosynthesis of type II polyketide backbone	P_59693	Braakman_sed	0	0
ko05215	Prostate cancer	P_59693	Braakman_sed	0	0
ko04966	Collecting duct acid secretion	P_59700	Braakman_biofilm	0	0
ko00473	D-Alanine metabolism	P_60964	De Laak_drinkwater	0	0
ko00710	Carbon fixation in photosynthetic organisms	P_60964	De Laak_drinkwater	0	0
ko00970	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	P_60964	De Laak_drinkwater	0	0
ko03010	Ribosome	P_60964	De Laak_drinkwater	0	0
ko04120	Ubiquitin mediated proteolysis	P_60964	De Laak_drinkwater	0	0
ko04330	Notch signaling pathway	P_60964	De Laak_drinkwater	0	0
ko04970	Salivary secretion	P_60964	De Laak_drinkwater	0	0
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	P_60969	De Laak_biofilm	0	0
ko00053	Ascorbate and aldarate metabolism	P_60969	De Laak_biofilm	0	0
ko00523	Polyketide sugar unit biosynthesis	P_60969	De Laak_biofilm	0	0
ko00660	C5-Branched dibasic acid metabolism	P_60969	De Laak_biofilm	0	0
ko00680	Methane metabolism	P_60969	De Laak_biofilm	0	0
ko00770	Pantothenate and CoA biosynthesis	P_60969	De Laak_biofilm	0	0
ko04152	AMPK signaling pathway	P_60969	De Laak_biofilm	0	0
ko04310	Wnt signaling pathway	P_60969	De Laak_biofilm	0	0
ko04712	Circadian rhythm - plant	P_60969	De Laak_biofilm	1	0

Tabel S2: Alle metabole routes waarbij waterbedrijf, monstertype, of beide een significant effect hebben op de relatieve abundantie van metabole routes (2-way ANOVA, $p < 0,05$). Relatieve metabole route abundantie (%) is berekend aan de hand van de som van de relatieve abundantie van de genen (%). pathID = het KEGG nummer behorende bij een specifieke route, path_name = de naam van deze route en anomaly_sample = het sample nummer waarin deze route een anomaliteit is (observaties die meer dan ± 2 SD van het gemiddelde afwijken).

Pathways waar waterbedrijf significant effect heeft (15)			
pathID	path_name	Anomaly_sample	Sample_sample
ko00052	Galactose metabolism	none	
ko00440	Phosphonate and phosphinate metabolism	none	
ko00601	Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	none	
ko00908	Zeatin biosynthesis	none	
ko00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	none	
ko01057	Biosynthesis of type II polyketide products	none	
ko04130	SNARE interactions in vesicular transport	none	
ko04391	Hippo signaling pathway - fly	P_56799	Seppe_drinkwater
ko04664	Fc epsilon RI signaling pathway	none	
ko04712	Circadian rhythm - plant	P_60969	De Laak_biofilm
ko04975	Fat digestion and absorption	none	
ko05204	Chemical carcinogenesis	none	
ko05410	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	P_56799	Seppe_drinkwater
ko05414	Dilated cardiomyopathy (DCM)	none	
ko05416	Viral myocarditis	none	
Pathways waar monstertype significant effect heeft (33)			
pathID	path_name	Anomaly_sample	Sample_sample
ko00051	Fructose and mannose metabolism	none	
ko00471	D-Glutamine and D-glutamate metabolism	none	
ko00500	Starch and sucrose metabolism	none	
ko00550	Peptidoglycan biosynthesis	none	
ko00565	Ether lipid metabolism	P_56799	Seppe_drinkwater
ko00621	Dioxin degradation	none	
ko00642	Ethylbenzene degradation	P_56799	Seppe_drinkwater
ko00740	Riboflavin metabolism	none	
ko00901	Indole alkaloid biosynthesis	none	
ko00902	Monoterpenoid biosynthesis	P_56799	
ko00908	Zeatin biosynthesis	none	
ko00940	Phenylpropanoid biosynthesis	P_56799	Seppe_drinkwater
ko01057	Biosynthesis of type II polyketide products	none	
ko03030	DNA replication	none	
ko03420	Nucleotide excision repair	none	
ko03430	Mismatch repair	none	
ko03440	Homologous recombination	none	
ko04014	Ras signaling pathway	P_56799	Seppe_drinkwater

ko04068	FoxO signaling pathway	none	
ko04070	Phosphatidylinositol signaling system	none	
ko04071	Sphingolipid signaling pathway	none	
ko04666	Fc gamma R-mediated phagocytosis	none	
ko04668	TNF signaling pathway	none	
ko04723	Retrograde endocannabinoid signaling	none	
ko05032	Morphine addiction	none	
ko05033	Nicotine addiction	none	
ko05120	Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	none	
ko05202	Transcriptional misregulation in cancer	none	
ko05204	Chemical carcinogenesis	none	
ko05212	Pancreatic cancer	P_56799	Seppe_drinkwater
ko05231	Choline metabolism in cancer	none	
ko05320	Autoimmune thyroid disease	none	
ko05410	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	P_56799	
Pathways waar beide significant effect hebben (4)			
pathID	path_name	Anomaly_sample	Sample_sample
ko00908	Zeatin biosynthesis	none	
ko01057	Biosynthesis of type II polyketide products	none	
ko05204	Chemical carcinogenesis	none	
ko05410	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	P_56799	Seppe_drinkwater

Bijlage IV Binning resultaten

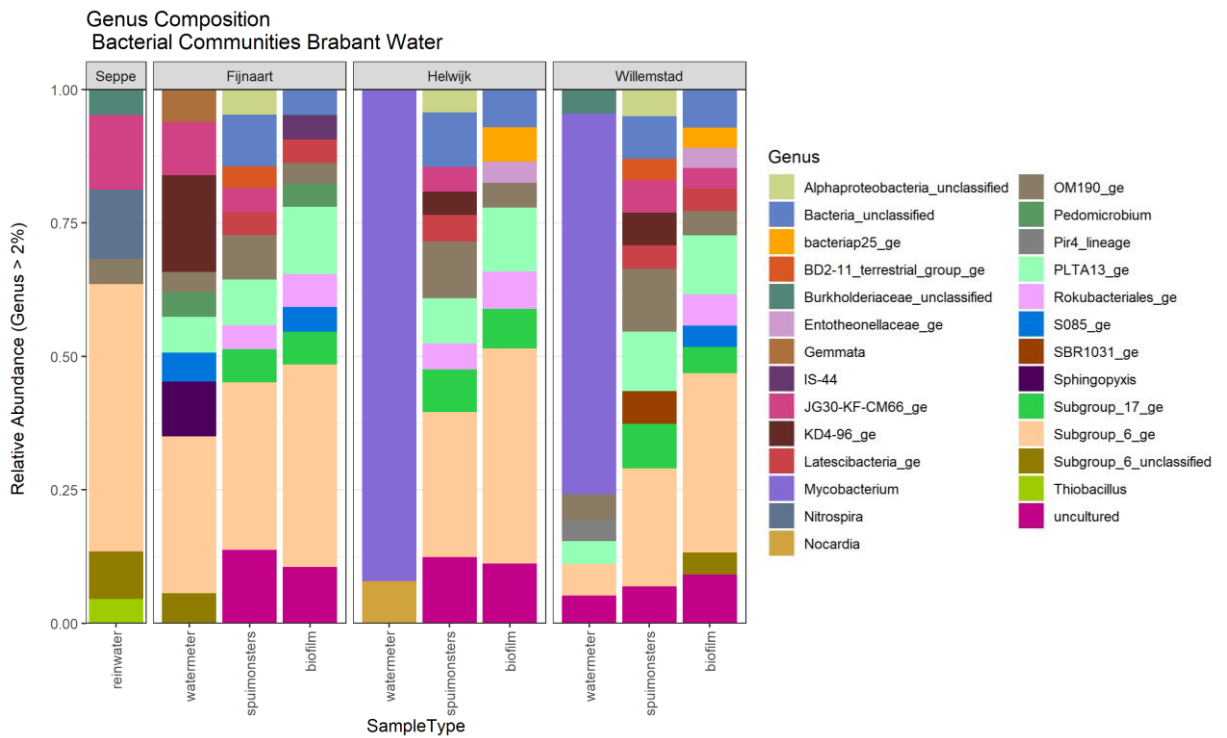
Tabel S-4: Binning resultaten waarbij voor elk monster de compleetheit van het genoom is gegeven (% compleet) en de genoomgrootte (in Megabase, Mb) en de bijbehorende taxonomy die is bepaald door handmatig en steekproefgewijs contigs van het genoom te vergelijken met de online NCBI datase d.m.v de tool BLAST (zie resultaten voor uitleg).

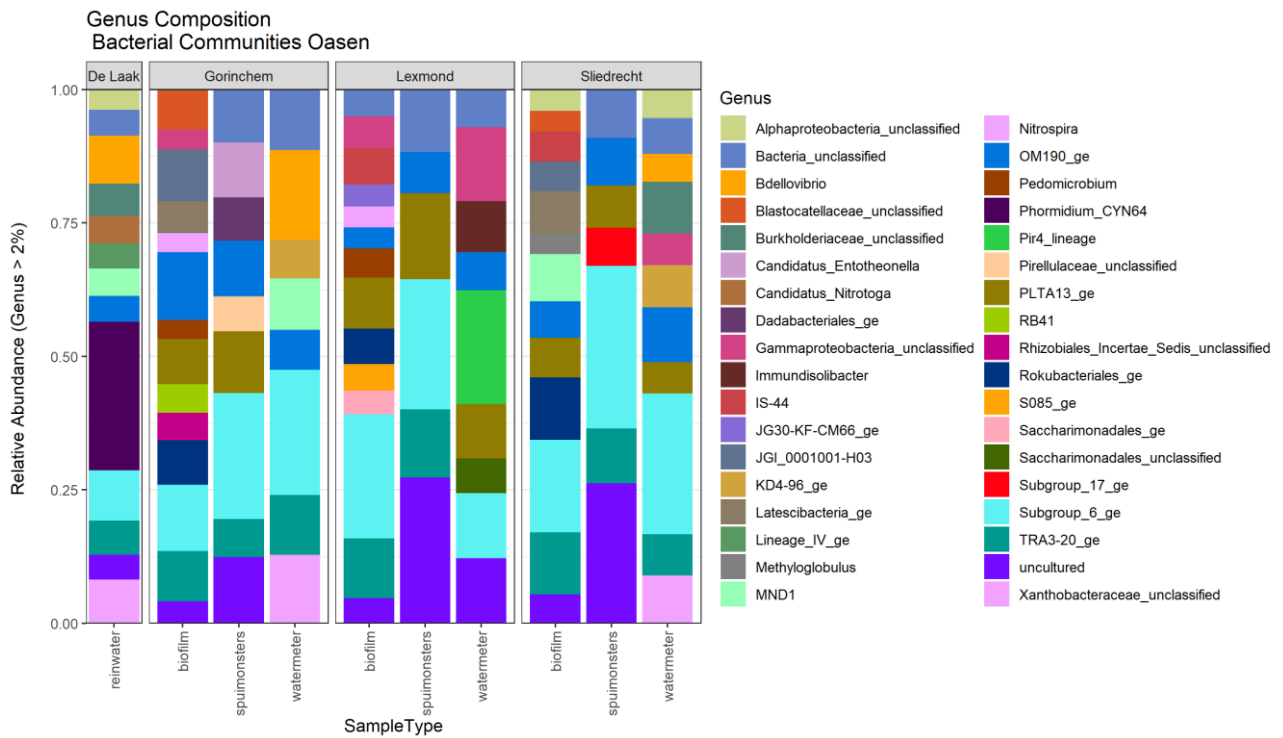
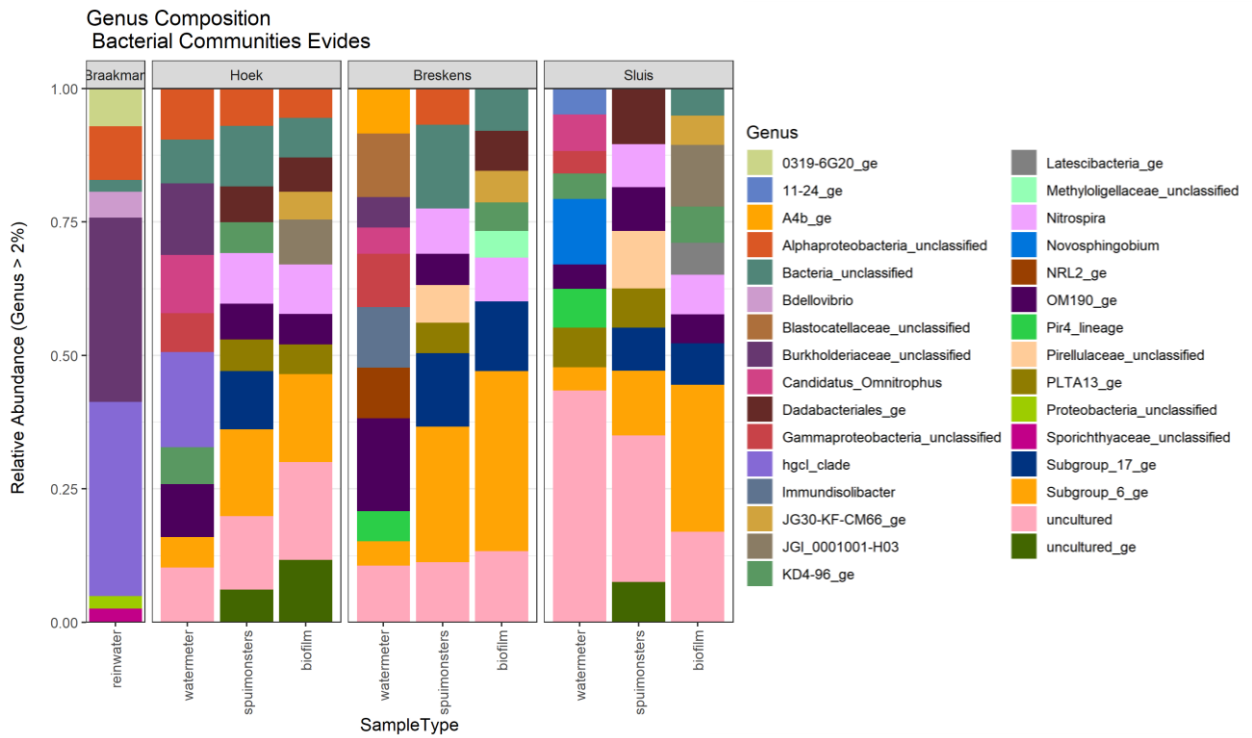
	Completeness	Genome size (MB)	Taxonomy
Seppe_drinkwater			
P_56799_150.003.fasta	71%	7	Mycobacterium
P_56799_150.011.fasta	88%	5	Many different organisms, bad bin
Seppe_sediment			
P_56800.001.fasta	95%	3	Many different microorganisms, bad bin
P_56800.004.fasta	47%	3	Luteitalea pratensis (subdivision 6 Acidobacteria)
Seppe_biofilm			
P_56804.001.fasta	96%	3	Many different microorganisms, bad bin
P_56804.010.fasta	57%	7	Luteitalea pratensis (subdivision 6 Acidobacteria), Acidisarcina polymorpha (Acidobacteria)
Braakman_drinkwater			
P_59692.001.fasta	95%	4	Immundisolibacter
P_59692.003.fasta	97%	3	Many different microorganisms, bad bin
P_59692.005.fasta	80%	3	Belliella baltica (Flavobacteria)
P_59692.006.fasta	94%	4	Aequorivita sublithincola, Chryseobacterium (Flavobacteria)
P_59692.007.fasta	88%	5	Pseudorhodoplanes sinuspersici (alpha proteo), Caulobacter henricii (alpha proteo)
P_59692.009.fasta	91%	6	Caulobacteraceae
Braakman_sediment			
P_59693.001.fasta	92%	5	Many different microorganisms, bad bin
Braakman_biofilm			
P_59700.005.fasta	83%	3	Many different microorganisms, bad bin
De Laak_DW			
P_60964.001.fasta	100%	3	Ectothiorhodospira, Thiohalobacter \ (Gammaproteo)
P_60964.004.fasta	82%	7	Many different microorganisms, bad bin
P_60964.006.fasta	92%	6	Sorangium cellulosum (Delta proteo), Planctomycetes
P_60964.007.fasta	95%	2	Candidatus Nitrotoga sp.
P_60964.017.fasta	80%	6	Many different microorganisms, bad bin
De Laak_sediment			
P_60965.002.fasta	94%	3	Solimonas sp. (Gammaproteo), Immundisolibacter (Gammaproteo)
De Laak_biofilm			
P_60969.004.fasta	88%	5	No similarities

P_60969.008.fasta	94%	6	Many different microorganisms, bad bin
P_60969.011.fasta	83%	4	Many different microorganisms, bad bin
P_60969.012.fasta	86%	7	Candidatus Nitrospira (Nitrospira)
P_60969.019.fasta	86%	7	Many different microorganisms, bad bin
P_60969.021.fasta	83%	6	Many different microorganisms, bad bin

Bijlage V Genera bar graphs

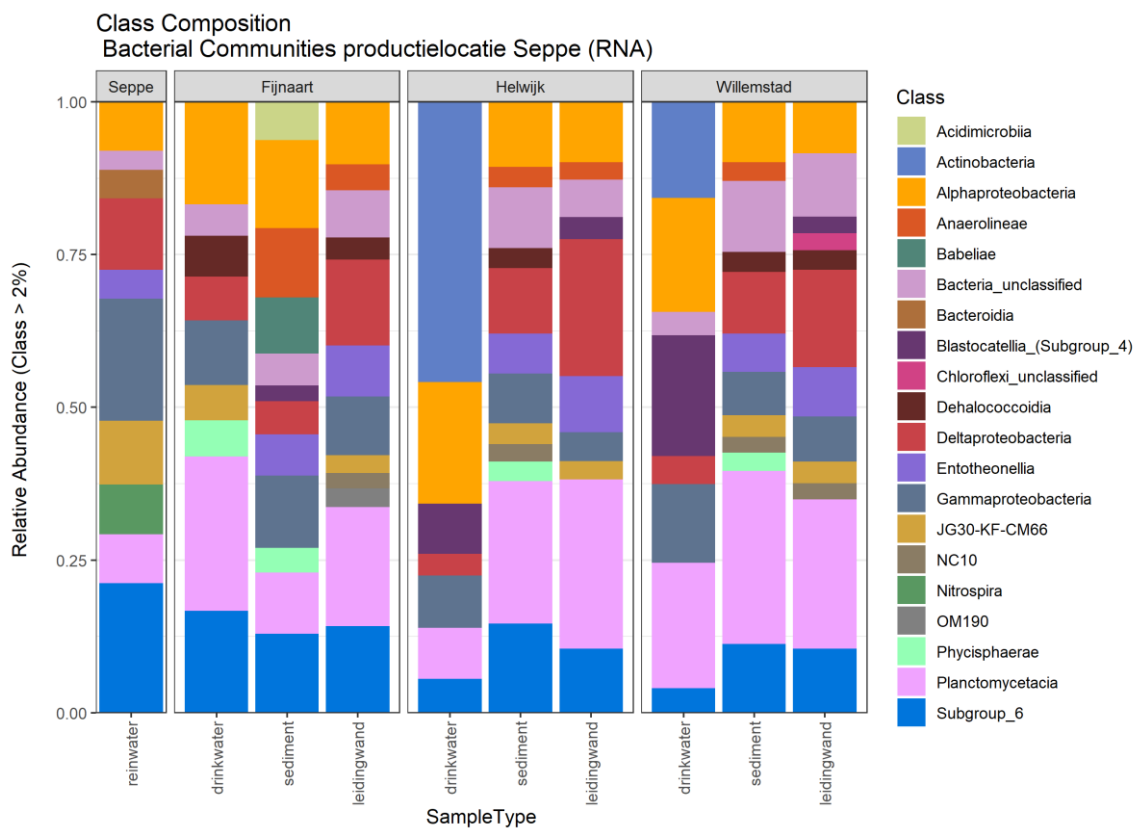
Genera die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie in water en biofilm monsters van de verschillende voorzieningsgebieden.



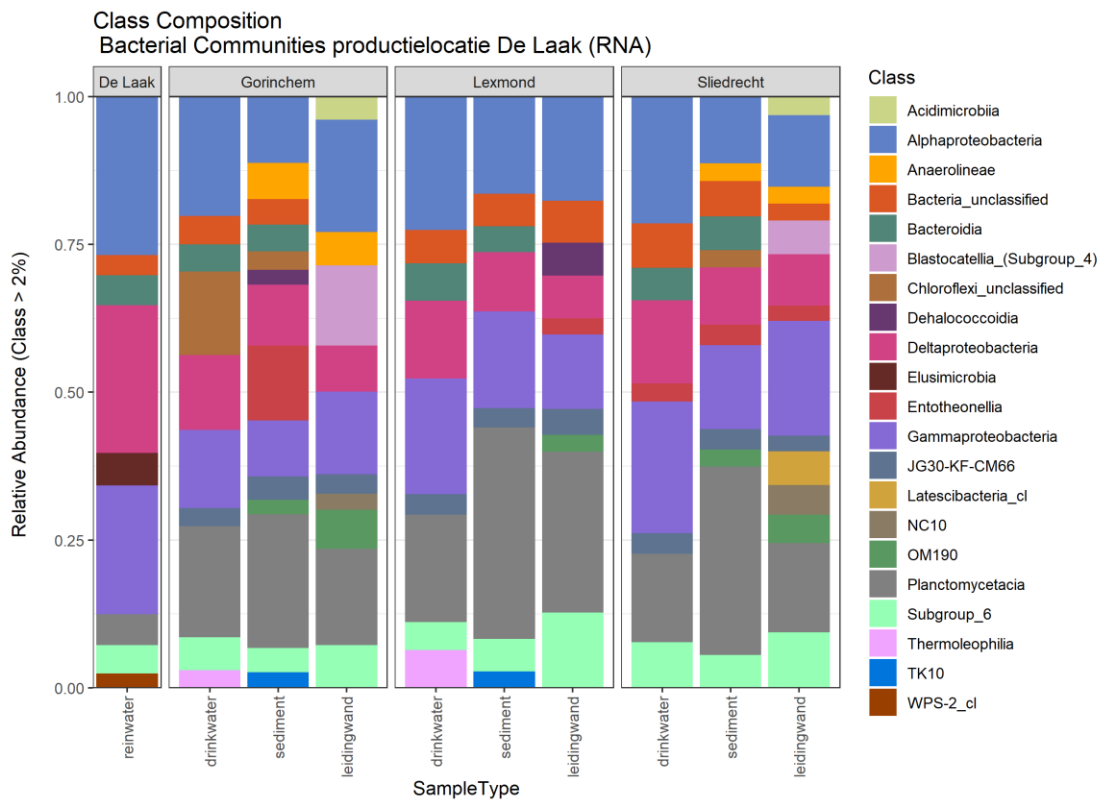


Bijlage VI RNA figuren

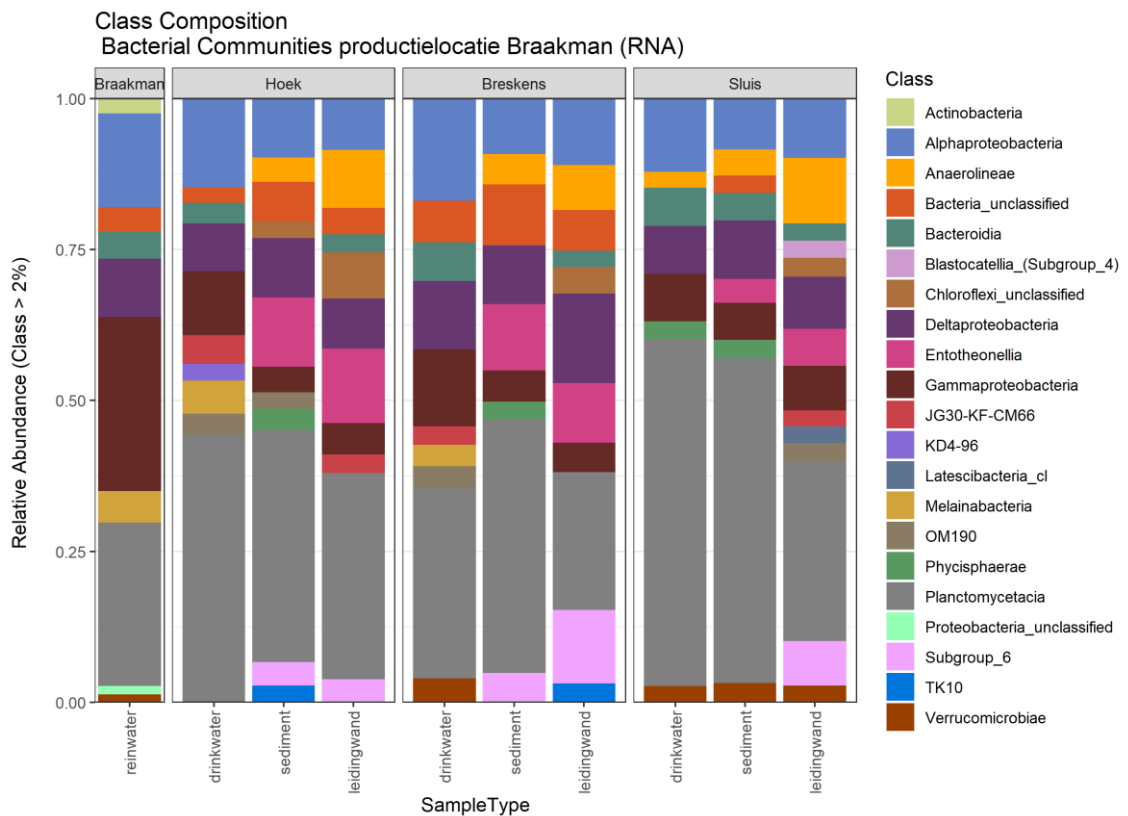
Onderstaand figuur laat de sequentieverdeling van de 16S rRNA sequenties over de taxonomische Klassen zien, waarbij alleen de Klassen zijn weergegeven waarbij de sequenties die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie van elk monster van productielocatie Seppe, gebaseerd op RNA. De aanwezigheid van de verschillende Klassen tussen de DNA en RNA monsters zijn vergelijkbaar, er zijn wat kleine verschillen in voorkomen bij monsters. De volgende klassen zijn bij de analyse van 16S rRNA aanwezig in de 98%, maar niet bij de analyse van het 16S rRNA gen (DNA): Acidimicrobiia, Babeliae, Bacteroidia en Chloroflexi_unclassified. De andere klassen zijn ook gevonden bij de analyse van het 16S rRNA gen (DNA), hoewel soms in andere relatieve hoeveelheden.



Onderstaand figuur laat de sequentieverdeling van de 16S rRNA sequenties over de taxonomische Klassen zien, waarbij alleen de Klassen zijn weergegeven waarbij de sequenties die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie van elk monster van productielocatie De Laak, gebaseerd op RNA. De aanwezigheid van de verschillende Klassen tussen de DNA en RNA monsters zijn vergelijkbaar, er zijn wat kleine verschillen in voorkomen bij monsters. De volgende klassen zijn bij de analyse van 16S rRNA aanwezig in de 98%, maar niet bij de analyse van het 16S rRNA gen (DNA): Acidimicrobiia, Chloroflexi_unclassified, TK10 en WPS-2_cl. De andere klassen zijn ook gevonden bij de analyse van het 16S rRNA gen (DNA), hoewel soms in andere relatieve hoeveelheden.

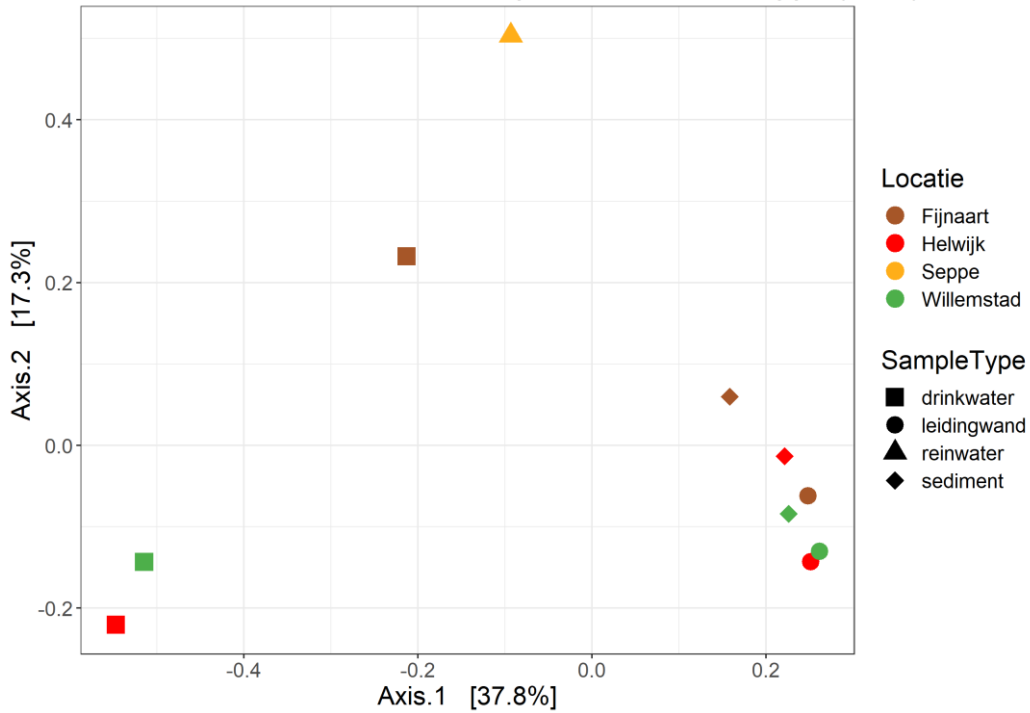


Onderstaand figuur laat de sequentieverdeling van de 16S rRNA sequenties over de taxonomische Klassen zien, waarbij alleen de Klassen zijn weergegeven waarbij de sequenties die meer dan 2% bijdragen aan de relatieve abundantie van elk monster van productielocatie Braakman, gebaseerd op RNA. De aanwezigheid van de verschillende Klassen tussen de DNA en RNA monsters zijn vergelijkbaar, er zijn wat kleine verschillen in voorkomen bij monsters. De volgende klassen zijn bij de analyse van 16S rRNA aanwezig in de 98%, maar niet bij de analyse van het 16S rRNA gen (DNA): Chloroflexi_unclassified, Entotheonellia en TK10. De andere klassen zijn ook gevonden bij de analyse van het 16S rRNA gen (DNA), hoewel soms in andere relatieve hoeveelheden.

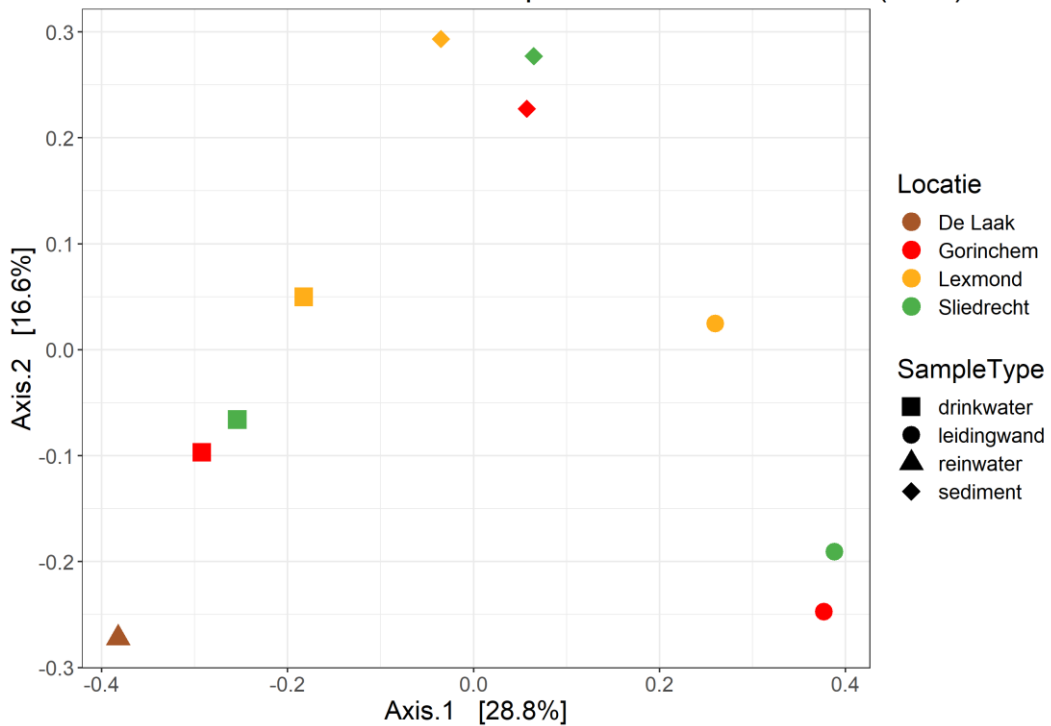


PCoA van alle OTU's van alle water-, sediment- en biofilm-monsters (verschillende symbolen) van de verschillende locaties (verschillende kleuren) van ieder voorzieningsgebied.

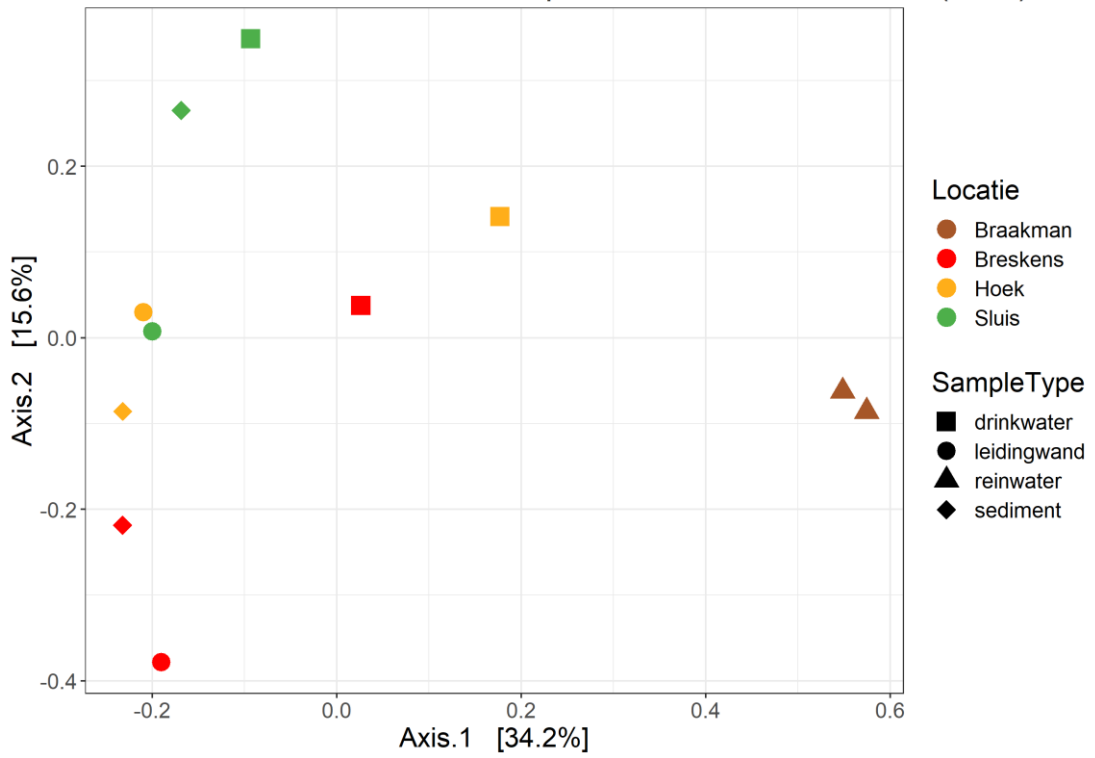
PCoA of bacterial Communities productielocatie Seppe (RNA)



PCoA of bacterial Communities productielocatie De Laak (RNA)



PCoA of bacterial Communities productielocatie Braakman (RNA)



PCoA of bacterial Communities RNA

