

## Next-generation DNA-monitoringstechnieken voor het nieuwe zuiveren

*Aleida de Vos van Steenwijk, Frithjof Godschalk, Marc van Bommel (Orvion BV), Mark van Loosdrecht (TU Delft)*

**Dit demonstratieproject laat zien welke waardevolle gegevens zitten opgesloten in het microbiële DNA van waterzuiveringen en welk type vraagstukken deze gegevens helpen aan te pakken. Met derde generatie DNA-technieken is de hele microbiële populatie in het influent en het effluent van een AWZI zichtbaar gemaakt. Specifiek is gekeken naar de bacteriën en de antibioticaresistentiegenen die door de zuivering worden verwijderd of die juist met het effluent in het oppervlaktewater komen. Duidelijk wordt dat een significant deel hiervan via het effluent de zuivering verlaat. Deze DNA-technieken bieden kansen om nieuwe waterzuiveringsuitdagingen structureler en effectiever aan te pakken.**

Er is een constante maatschappelijke druk om rioolwater steeds verder te zuiveren. Bijvoorbeeld voor het verwijderen van geneesmiddelen en pesticiden, om een halt toe te roepen aan de verspreiding van antibioticaresistentie en om nog verdere en efficiëntere verwijdering van stikstof en fosfaat te realiseren. In afvalwaterzuiveringen zijn het bacteriën die het water zuiveren. Ook zijn het bacteriën die resistentiegenen tegen antibiotica herbergen. Toch wordt er relatief weinig aandacht geschonken aan deze minuscule werkpaarden van de zuivering.

*Next-generation* DNA-technieken geven de mogelijkheid om routinematig naar de microbiologie van een afvalwaterzuiveringsinstallatie (AWZI) te kijken en bieden nieuwe handvatten voor sturing en optimalisatie. Samen met de hoogheemraadschappen van Delfland en Schieland en de Krimpenerwaard en de waterschappen de Dommel en Vechtstromen hebben Evides, Orvion en de TU Delft een demonstratieproject met deze nieuwe technieken uitgevoerd. Dit artikel licht toe welke informatie wordt ontsloten uit het DNA en welke kansen dit voor waterzuiverend Nederland biedt.

### **Metten wat eerder niet meetbaar was**

Het is niet gek dat de bacteriën in waterzuiveringen steeds onderbelicht zijn gebleven. Het zijn immers onzichtbare, complexe levensvormen. Bovendien zijn er slechts enkele met standaardtechnieken meetbaar, als kolonievormende eenheden (kve), of onder de microscoop van elkaar te onderscheiden. De opkomst van derde generatie DNA-technieken is daarom een *gamechanger*. Het is nu technisch en economisch mogelijk om de gehele populatie micro-organismen op basis van DNA zichtbaar en meetbaar te maken (zie kader 1).

In het kader van het demonstratieproject is op 22 juni 2016 een monster van het influent (ruw rioolwater) en het effluent (gezuiverd rioolwater) van de AWZI Harnaschpolder te Delft genomen. Uit beide monsters is het DNA gezuiverd en geanalyseerd met een derde generatie DNA-techniek. De verkregen DNA-gegevens zijn in eerste instantie gebruikt om een algemeen beeld te krijgen van de AWZI: de bacteriesamenstelling, fecale, pathogene en stikstof- en fosforverwijderende bacteriesoorten. Vervolgens zijn de gegevens specifiek gescreend op de aanwezigheid van antibioticaresistentiegenen. De DNA-gegevens bevatten nog veel meer informatie die met behulp van bio-IT-technieken kan worden uitgediept. Het is dan ook mooi meegenomen dat met deze technieken

digitale resultaten worden verkregen die steeds opnieuw kunnen worden onderzocht en geactualiseerd.

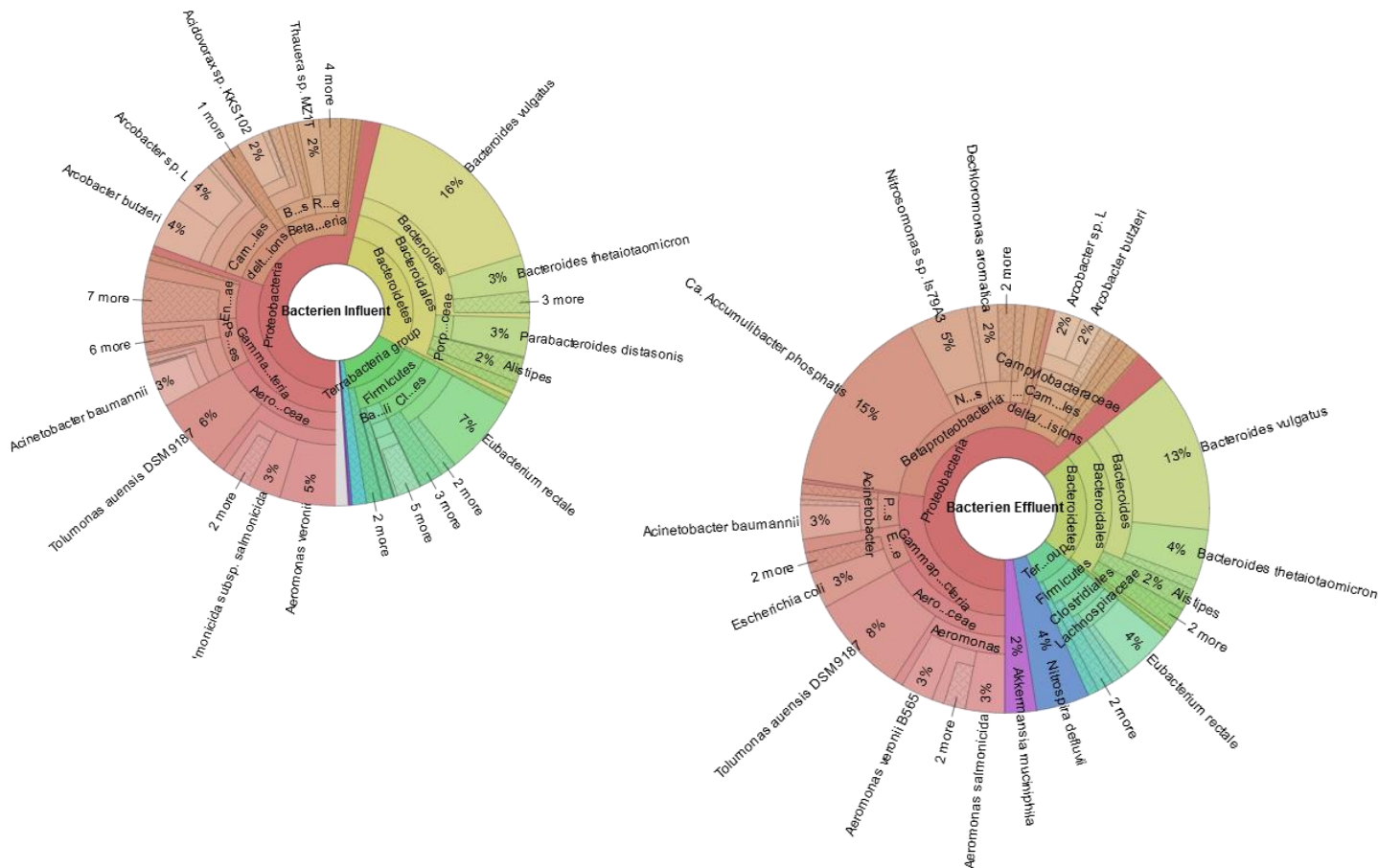
### DNA decoderen

Alle organismen op aarde bevatten genetisch materiaal (DNA of RNA), van de eencellige virussen en bacteriën tot complexe meercellige organismen als planten en dieren. Het DNA is uniek voor de soort waarin het zit en wordt (onder andere) gebruikt om soorten van elkaar te kunnen onderscheiden. Van duizenden organismen zijn de DNA-codes ondertussen bekend en publiek beschikbaar in online referentiedatabases.

Met derde generatie DNA-technieken is het mogelijk om van een monster of een systeem te bepalen welke soorten hierin zitten, bijvoorbeeld om een verontreiniging van levensmiddelen te identificeren, te bepalen welke soorten in een watersysteem voorkomen of om een biologisch proces te monitoren. Hiermee wordt *al* het onbekende DNA uit een monster gedecodeerd. De resulterende DNA-codes worden vergeleken met het DNA in de referentiedatabases om te bepalen uit welke organisme deze afkomstig is, en dus welke organismen in het monster aanwezig zijn.

De technieken ontwikkelen zich razendsnel en de kosten nemen steeds verder af. De verwachting is dat binnenkort de analyses niet meer laboratorium-gebonden zijn en voor iedereen toegankelijk worden. Zo is het aannemelijk dat je binnen 3 tot 5 jaar zelf met een apparaat op je smartphone de hygiëne in je keuken kunt meten of de kwaliteit van drink- of zwemwater kunt monitoren. Door deze ontwikkelingen krijgen we een gedetailleerde kijk op zaken als gezondheid, veiligheid en hygiëne. Dit zal ook het publiek sterker betrekken bij de microbiële veiligheid. Binnen dit project heeft Orvion gebruik gemaakt van een nieuwe technologie om het DNA te decoderen, de MinION™. Dit is een draagbare DNA-sequencer die overal ter wereld (en zelfs al in de ruimte) is gebruikt. Meer informatie over deze technologie is te vinden op [www.nanoporetech.com](http://www.nanoporetech.com)





Afbeelding 1. Visualisatie van de bacteriesamenstelling in het influent (links) en het effluent (rechts). Dit zijn screenshots van digitale, interactieve diagrammen waarmee de gegevens van de monsters worden gevisualiseerd. Ze kunnen worden doorzocht en er kan worden ingezoomd op de verschillende groepen en soorten [1]

Een AWZI is ontworpen om de bacteriën die organisch stof en nutriënten uit het afvalwater verwijderen in de zuivering te houden en deze via het slib af te voeren. Het is aannemelijk dat veel bacteriën die in het influent aanwezig zijn via deze route worden verwijderd. Een AWZI is echter niet specifiek ontworpen om bacteriën uit het afvalwater te verwijderen en daarom is te verwachten dat een deel van de bacteriën in het influent ook via het effluent de zuivering verlaat.

Dit is terug te zien in de resultaten. 60 procent van de bacteriesoorten uit het influent is niet meer teruggevonden in het effluent. De soorten waarvan de concentratie significant is toegenomen zijn vooral typische zuiveringsbacteriën, zoals de nitrificeerders *Nitrosomonas* en *Nitrospira* en *Ca. Accumulibacter phosphatis* (Bio-P) die in het influent niet of nauwelijks aanwezig zijn maar juist in de zuivering zijn gegroeid. Deze algemene resultaten maken inzichtelijk welke soorten wel en niet door de AWZI worden verwijderd en dus welke soorten in het oppervlaktewater terechtkomen. Tabel 1 geeft een samenvatting van de algemene screening die is uitgevoerd.

Tabel 1. Samenvatting van de algemene screening van de DNA-gegevens. De resultaten zijn uitgedrukt als aantal (#) DNA-fragmenten. Dit wil zeggen: het aantal keer dat een fragment DNA is gevonden dat overeenkomt met een bepaalde bacteriesoort. Soorten waarvan slechts 1 of 2 fragmenten DNA zijn gevonden zijn niet meegenomen (worden beschouwd als 'ruis'). De resultaten zijn semi-kwantitatief en geven daarom inzicht in de relatieve verhoudingen, niet in de absolute concentraties

Onderzochte parameters	microbiële	Influent (# DNA-fragm.)	Effluent (# DNA-fragm.)	%-age in effluent t.o.v. influent
Bacteriële DNA-fragmenten		4.794	959	-80 %
Verskillende bacteriesoorten of -groepen		169	67	-60 %
<b>Fecale bacteriën</b>				
<i>Escherichia coli</i>		49	27	-45 %
Enterobacteriaceae groep		254	52	-80 %
<i>Bacteroides</i> spp.		1042	163	-84 %
<b>Stikstof- of fosfaatverwijderende bacteriën</b>				
<i>Nitrosomonas</i> spp.		4	48	+1.200 %
<i>Nitrospira</i> spp.		n.a.	39	
<i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i>		9	140	+1.556 %
<b>Potentieel pathogene bacteriën</b>				
<i>Arcobacter butzleri</i> (Campylobacter-achtige)		206	15	-80 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		38	9	-76 %
<i>Acinetobacter baumannii</i>		166	25	-85 %

Door regelmatig het DNA van een waterzuivering te analyseren (slib, influent en effluent) worden de microbiële processen die zich hierin afspelen inzichtelijk. De gegevens kunnen gebruikt worden om openstaande vragen, waar nu onvoldoende grip op wordt verkregen, te beantwoorden. In welke mate worden pathogene organismen effectief verwijderd? Waardoor is biologische fosfaatverwijdering soms instabiel en neemt de activiteit vaak af in het najaar? Welk effect heeft een toxische lozing op het actiefslib en is hieruit af te leiden om welk type stof het gaat? Waarom verwijderd de ene zuivering veel effectiever bepaalde geneesmiddelen dan een andere? Door antwoord te krijgen op deze vragen is het weer mogelijk de nieuwe uitdagingen waar AWZI's mee te maken hebben effectiever aan te pakken.

### Antibioticaresistentie

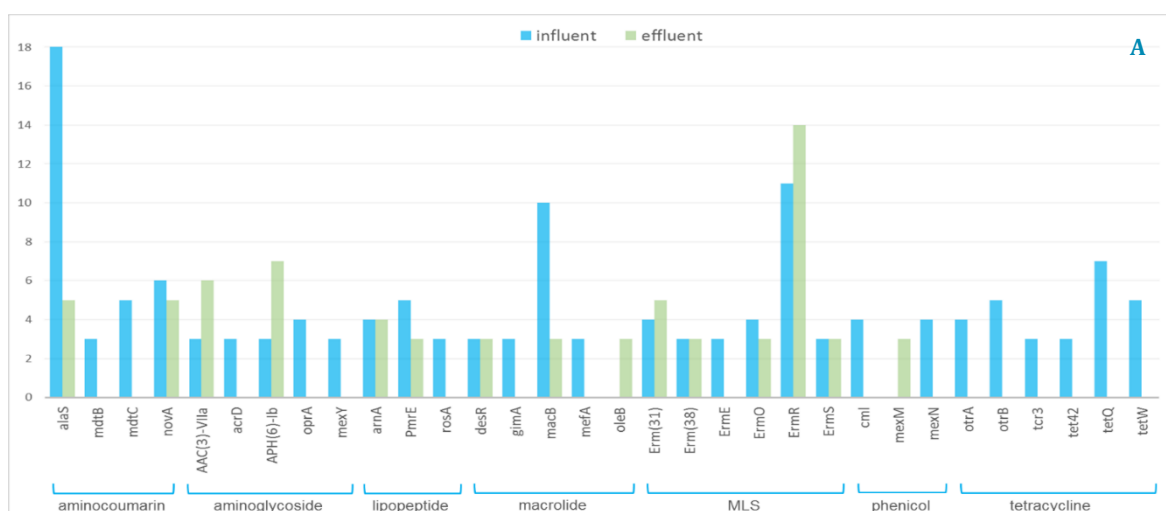
Antibioticaresistentie wordt gezien als een van de grootste bedreigingen voor de volksgezondheid. Nu al overlijden in Europa jaarlijks meer dan 25.000 mensen aan de gevolgen hiervan. Vaak zijn deze mensen al ernstig ziek. Maar ook jonge gezonde mensen belanden steeds vaker in het ziekenhuis als gevolg van infecties, zoals blaasontsteking, door bacteriën die resistent zijn tegen meerdere antibiotica. De rol van RWZI's binnen de antibioticaresistentieproblematiek wordt vaker ter discussie gesteld. Is een RWZI een effectieve barrière die kan worden geoptimaliseerd om resistente bacteriën tegen te houden? Of vormen ze eerder een bedreiging doordat ze mogelijk bijdragen aan de ontwikkeling en verspreiding van resistente bacteriën?

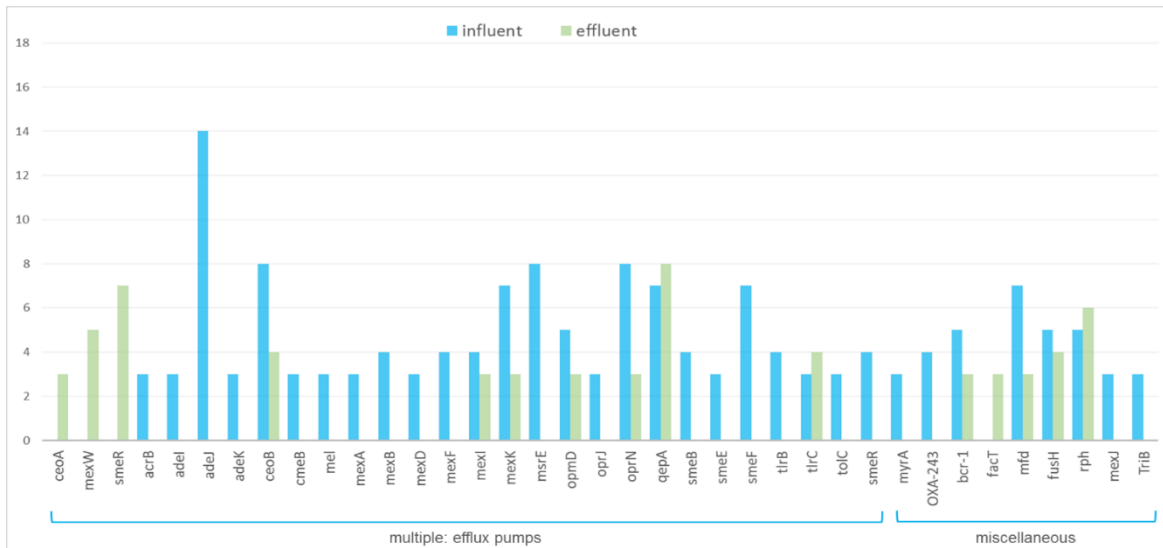
De huidige kennis op het gebied van resistente bacteriën, in de kliniek en in het milieu, is vooral opgedaan met (potentieel) pathogene bacteriën, zoals *E. coli*, die makkelijk zijn te kweken en te testen op resistentie. Maar bij alle andere bacteriën, die niet perse op te kweken zijn, kan ook antibioticaresistentie voorkomen. Het reservoir aan antibioticaresistentie is dus veel groter dan nu wordt gemeten en kan bovendien van (goede) bacterie op (pathogene) bacterie worden overgedragen door uitwisseling van DNA (zie kader 2). Het is daarom belangrijk om niet alleen de antibioticaresistentie van ziekmakende bacteriën te onderzoeken, maar ook van alle andere soorten. Met DNA-technieken is dit mogelijk en wordt een brede screening gemaakt van alle resistentiegenen, zodat de ontwikkeling en verspreiding hiervan nauwkeurig kan worden gemonitord.

Binnen dit demonstratieproject zijn de DNA-gegevens van het influent en het effluent van Harnaspolder gescreend op de aanwezigheid van DNA-genen die een bacterie resistent kunnen maken voor antibiotica. De resultaten van deze screening staan weergegeven in tabel 2 en afbeelding 2.

Tabel 2. Resultaten van de screening op antibioticaresistentiegenen (ARG). Resistentie die is verworven door mutatie is hierin niet meegenomen

Onderzochte microbiële parameters	Influent (# DNA-fragm.)	Effluent (# DNA-fragm.)	%-age in effluent t.o.v. influent
DNA-fragmenten van resistentiegenen	298	132	-56 %
Verschillende resistentiegenen	63	30	-52 %
Verwijderd in effluent of meer dan 10x afgenomen	39		
Nieuw in effluent of meer dan 10x toegenomen	6		
Niet significant toe- of afgenomen	24		





B

**Afbeelding 2.** De antibioticaresistentiegenen die zijn gevonden in het influent (blauw) en het effluent (groen). De genen zijn ingedeeld op basis van de antibioticagroepen waartegen ze resistentie bieden. Veel 'microbiële pompen' bieden resistentie tegen meerdere groepen antibiotica. Deze zijn als 'multiple: efflux pumps' ingedeeld. De aantallen zijn uitgedrukt als aantal DNA-fragmenten die overeenkomen met een specifiek gen

Uit deze eerste screening blijkt dat iets meer dan de helft (56%) van de antibioticaresistentie-genen (ARG) niet is teruggevonden in het effluent. 30 verschillende ARG (44% van de DNA-fragmenten) zijn wel in het effluent teruggevonden. Deze studie laat zien dat ARG aanwezig zijn in het effluent van de RWZI en dus maar deels worden verwijderd. Complicerende factor is dat antibioticaresistentie ook een onderdeel is van de natuurlijke competitie tussen micro-organismen en daarom ook een rol kan spelen voor de soorten in het actief slib van de zuivering (zie kader 2).

Opvallend is dat de genen die resistentie bieden tegen tetracyclines niet in het effluent zijn teruggevonden. Daarentegen zijn de *erm*-genen, die resistentie bieden tegen macrolides, lincosamides en streptogramine B (MLS), nauwelijks verwijderd. *Erm*-genen zijn kort na de introductie van het antibioticum erythromycine in pathogenen ontdekt en worden ondertussen over de hele wereld teruggevonden [2]. Dit geeft aan hoe efficiënt bacteriën ARG kunnen ontwikkelen en verspreiden.

Dat een RWZI een lokale toename veroorzaakt in de aantallen antibioticaresistente bacteriën in het milieu is zeker. Dat dit aantal verlaagd is ten opzichte van het niet zuiveren van rioolwater is ook zeker. Hoe groot en verstrekkend het effect is en in welke mate dit bijdraagt aan de resistentieproblematiek bij mensen is nog onduidelijk. Het is bijvoorbeeld op dit moment nog niet mogelijk om waar te nemen of resistentiegenen van pathogenen zijn overgegaan naar natuurlijke bacteriën. Het is nodig om de nu beschikbare DNA-instrumenten in te zetten voor de monitoring van RWZI's (en riooloverstorten). Niet alleen om de risico's inzichtelijk te krijgen, maar ook om te beoordelen of ze een effectieve(re) barrière kunnen vormen tegen de verspreiding van resistente bacteriën [3].

**Antibioticaresistentie**

Er zijn verschillende manieren waarop een bacterie een antibioticum inactief maakt en daarmee resistent wordt. Bijvoorbeeld door het antibioticum kapot te knippen, of door een 'pomp' in het celmembraan te maken waarmee ze het de cel uitpompen. Resistentie is erfelijk vastgelegd op het DNA van een bacterie in antibioticaresistentiegenen (ARG). ARG zijn miljoenen jaren geleden door evolutie ontstaan om bacteriën te beschermen tegen natuurlijke antibiotica, die andere micro-organismen uitscheidde of als bescherming tegen antibiotica die ze zelf produceren.

Een bacterie kan resistent worden doordat een spontane mutatie in het DNA optreedt. Deze mutatie wordt vervolgens doorgegeven naar de volgende generaties (verticale overdracht). Een bacterie kan ook een ARG van een andere bacterie ontvangen en daardoor resistent worden (horizontale overdracht). Een voorbeeld hiervan is de overdracht van CTX-M bèta-lactamasegenen van de in de natuur voorkomende bacterie *Kluyvera* sp. die steeds vaker voorkomt in diverse pathogenen.

Veel ARG zijn ondertussen geïdentificeerd en staan opgeslagen in online DNA-referentiedatabases, zoals de Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) [4]. Door de DNA-codes van onbekende monsters hiermee te vergelijken wordt inzichtelijk welke ARG in een monster aanwezig zijn.

**Wat heeft waterzuiverend Nederland hieraan?**

Deze demonstratie is bedoeld om te laten zien welke waardevolle informatie zit opgesloten in het microbiële DNA van waterzuiveringen en welke type vraagstukken deze gegevens helpen aan te pakken. De nieuwe generatie DNA-technieken vormt hierin een onmisbaar instrument dat steeds vaker wordt ingezet en in de nabije toekomst alom beschikbaar zal zijn (zie kader 1). Het is daarom belangrijk om de juiste kennis en referentiekaders voor RWZI's op te bouwen, zodat de gegevens die worden verkregen optimaal worden benut en de zin van de onzin kan worden onderscheiden.

**Dankwoord**

De auteurs willen de volgende mensen bedanken voor hun bijdragen aan dit project: Alex Sengers (Hoogheemraadschap Schieland en Krimpenerwaard), Klaas Appeldoorn (Hoogheemraadschap Defland), Jarno de Jonge, Doy Schellekens (waterschap de Dommel), Matthijs Oosterhuis (waterschap Vechtstromen), Jelle Roorda (Evides, thans Waterschap Limburg), Jan Willem Mulder, Sigrid Scherrenberg (Evides Waterbedrijf) en Paul Weij (Delfluent Services).

**Referenties**

1. Ondov, B. D. Bergman, N. H. en Phillippy, A. M. (2011) Interactive metagenomic visualization in a Web browser, *BMC Bioinformatics*, vol. 12, p. 385.
2. Vester, B. en Long, K.S. (2013). Antibiotic Resistance in Bacteria Caused by Modified Nucleosides in 23S Ribosomal RNA. *Landes Bioscience*.
3. Bouki, Cl, Venieri, D. en Diamadopoulou, E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 91, pp. 1–9.
4. McArthur A. G. e.a. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, nr. 7, pp. 3348–3357.