

BTO 2018.011 | Januari 2018

BTO rapport

Indicator voor biofilm in
het drinkwater-
distributiesysteem

BTO

Indicator voor biofilm in het drinkwaterdistributiesysteem

BTO 2018.011 | Januari 2018

Opdrachtnummer

400554-088

Projectmanager

Michiel Hootsmans

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische activiteit

Kwaliteitsborger

Paul van der Wielen

Auteurs

Kimberly Learbuch en Bart Wullings (2.3.5 en 3.3)

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is na één jaar openbaar.

Jaar van publicatie
2018

Meer informatie

Kimberly Learbuch MSc.

T 030-6069599

E kimberly.learbuch@kwrwater.nl

Keywords

biologische activiteit

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511

F +31 (0)30 60 61 165

E info@kwrwater.nl

I www.kwrwater.nl



Watercycle
Research
Institute

BTO 2018.011 | Januari 2018 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

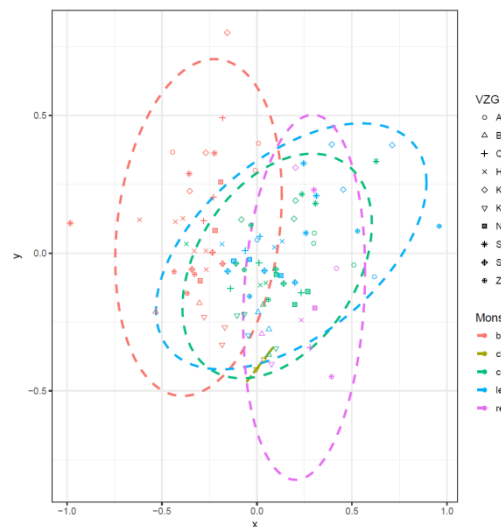
Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

BTO Managementsamenvatting

Bacteriegroepen geïdentificeerd als mogelijk beter betrouwbare indicatoren biofilm dan huidige wettelijke parameters

Auteurs Kimberly Learbuch MSc, ir. Bart Wullings

In deze studie zijn drie bacteriegroepen geïdentificeerd als mogelijke indicatoren voor biofilm op de buiswand in het drinkwaterdistributiesysteem. Aangezien de huidige wettelijke parameters KG22 en *Aeromonas* slechts een klein deel uitmaken van het totaal aantal bacteriën in drinkwater, worden zij als minder goede indicatoren gezien voor biofilmvorming en -hoeveelheid op de buiswand. Bemonstering van dertien voorzieningsgebieden heeft geleid tot een selectie van drie mogelijke bacteriegroepen met voor elk de ontwikkeling en toepassing van een specifieke qPCR. Voorzieningsgebieden waar het drinkwater een hoge groeipotentie heeft, vertonen hogere aantallen van deze indicatororganismen dan voorzieningsgebieden waar het drinkwater een lage groeipotentie heeft. Hoewel de geïdentificeerde bacteriegroepen een globale indicatie lijken te geven voor de hoeveelheid biofilm, is aanvullend onderzoek nodig. De condities waaronder de bacteriën betrouwbare biofilmindicatoren zijn, moeten daarbij nader worden gespecificeerd.



Leidinguitname (links) en NMDS-plot (rechts) van alle monsters op basis van bacteriesamenstelling, gegroepeerd per voorzieningsgebied (VZG) en monster (rein, consument, leiding/cbm en biofilm)

Belang: meer betrouwbare indicatoren nodig voor biofilm in distributiesystemen

Als wettelijke parameters voor nagroei in het distributiesysteem worden momenteel KG22 en *Aeromonas* gehanteerd. Deze indicatoren maken echter slechts een klein deel uit van het totaal aantal bacteriën in drinkwater. Bovendien bleek uit eerder BTO-onderzoek dat ze voornamelijk een indicatie zijn voor nagroei in het sediment, niet

voor nagroei op de buiswand. Dat maakt hen minder betrouwbare indicatoren voor biofilm in het distributiesysteem. Het doel van deze studie is daarom om te achterhalen of bacteriegroepen in drinkwater kunnen worden aangetroffen die als indicatie dienen voor biofilm op de buiswand in het distributiesysteem.

Aanpak: bemonstering voorzieningsgebieden met verschillen in afstand/verblijftijd of materiaal

In 2015 zijn acht voorzieningsgebieden bemonsterd op drie locaties met verschillende afstanden/verblijftijden vanaf het pompstation. Daarnaast zijn in vijf voorzieningsgebieden monsters genomen op drie locaties met verschillende typen leidingmateriaal. Er zijn monsters genomen van reinwater, drinkwater aan de tap van de consument, drinkwater uit de standpijp op een distributieleiding en biofilm op de distributieleidingen. De monsters zijn geanalyseerd op ATP, KG22 en *Aeromonas*. De bacteriesamenstelling werd bepaald met Next Generation Sequencing (NGS).

Resultaten: drie bacteriegroepen geïdentificeerd als mogelijke markers voor biofilm

Voorzieningsgebieden met water met een hoge groeipotentie hebben hogere ATP-concentraties, aantallen KG22 en *Aeromonas* dan voorzieningsgebieden met water met een lage groeipotentie. Reinwater en drinkwater bemonsterd aan de tap van de consument vertonen een vergelijkbare samenstelling van de bacteriepopulaties. Vanuit de resultaten zijn vervolgens drie bacteriegroepen geïdentificeerd die mogelijk kunnen dienen als indicator voor biofilmhoeveelheid. Voor elke bacteriegroep is een specifieke qPCR ontwikkeld en toegepast op de water- en biofilmmonsters. Hieruit bleek dat de drie bacteriegroepen meer in de voorzieningsgebieden voorkomen dan in reinwater. Een eenduidige invloed van verblijftijd/afstand of leidingmateriaal op de aantallen van deze nieuwe indicatoren is niet

gevonden. Dit betekent dat de indicatororganismen niet in staat lijken zich in drinkwater te vermenigvuldigen.

Een vergelijking van de aantallen van de drie bacteriegroepen laat zien dat die hoger waren in voorzieningsgebieden waar drinkwater met hoge groeipotentie wordt gedistribueerd dan in de voorzieningsgebieden waar drinkwater met lage groeipotentie wordt gedistribueerd. Doordat ook de biofilmconcentratie licht (maar niet statistisch significant) verhoogd is in de voorzieningsgebieden met drinkwater met hoge groeipotentie, zouden de indicatororganismen mogelijk geschikt kunnen zijn als een globale indicator voor biofilmhoeveelheid.

Implementatie: verdere ontwikkeling nodig van drie indicatororganismen

Ondanks de veelbelovende resultaten zijn de drie hier gebruikte indicatororganismen vooralsnog niet toepasbaar als universele, betrouwbare markers voor biofilm en eventuele biofilmproblemen, zoals groei van opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwaterdistributiesysteem. Meer onderzoek is nodig om te achterhalen onder welke condities ze als indicatororganisme kunnen dienen. Hiervoor dienen meer aanvullende monsters en parameters uit de praktijk te worden geanalyseerd en dienen experimenten onder laboratoriumcondities uit te worden gevoerd.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Indicator voor biofilm in het drinkwaterdistributiesysteem* (BTO-2018.011).

Meer informatie

Kimberly Learbuch
T 030 60 69 599

E kimberly.learbuch@kwrwater.nl

KWR

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

Afkortingen

AC	Asbest cement
AOC (A3)	AOC-gehalte (μg koolhydraat-C eq/L) bepaald met <i>Flavobacterium johnsoniae</i> stam A3
AOC (P17/NOX)	AOC-gehalte (μg acetaat-C eq/L) bepaald met <i>Pseudomonas fluorescens</i> stam P17 en <i>Spirillum</i> sp. stam NOX
BAS	Biomassa-accumulatiesnelheid ($\text{pg ATP/ cm}^2\text{.dag}$)
BP_0	De ATP concentratie op dag 0 van de BPP test (ng ATP/l)
BP_7	De maximum biomassaproductie (ATP-concentratie), in een incubatieperiode van 7 dagen in de BPP-test (ng ATP/l)
BPC_{14}	Cumulatieve biomassaproductie (d.ng ATP/L) in de BPP-test in een periode van 14 dagen
BVS	Biofilmvormingssnelheid ($\text{pg ATP/ cm}^2\text{.dag}$) in de BFM (Biofilmmonitor)
FeAS	Ijzeraccumulatiesnelheid ($\text{mg Fe/m}^2\text{.d}$)
GGY	Gietijzer
PFe	Particulate iron: deeltjesgebonden ijzer ($\mu\text{g Fe/L}$)
PHMCHC	Particulate High Molecular Carbohydrate Carbon (deeltjesgebonden en/of hoog moleculaire koolhydraten) ($\mu\text{g C/l}$)
PHMOC	Particulate High Molecular Organic Carbon (deeltjesgebonden en/of hoog moleculaire organisch koolstof) ($\mu\text{g C/l}$)

Inhoud

Afkortingen	2
1 Inleiding	4
1.1 Alternatieve parameter voor nagroei en blootstelling	4
2 Materiaal en methoden	6
2.1 Uitname leidingen	6
2.2 Monsternamen	7
2.3 Analyses	7
3 Resultaten & Discussie	10
3.1 ATP, KG22 en Aeromonas	10
3.2 NGS	15
3.3 qPCR methoden voor geselecteerde indicatoren voor nagroei	22
3.4 <i>Anaerolineaceae</i> , <i>Acidobacteria</i> GP3 en <i>Hyphomicrobium</i> in drinkwater en biofilm.	25
4 Conclusies en aanbevelingen	31
4.1 Conclusies	31
4.2 Aanbevelingen	31
5 Referenties	33

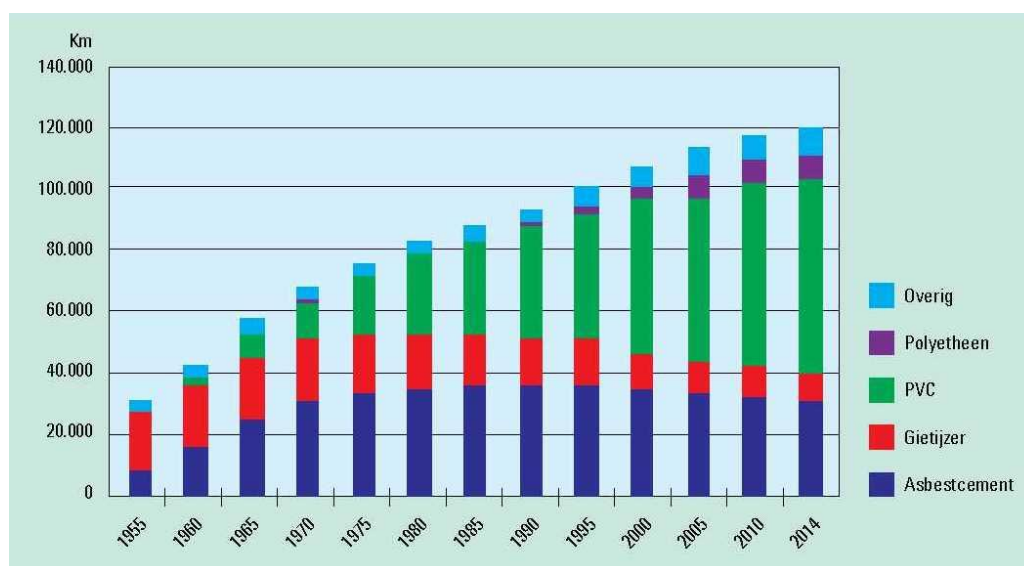
1 Inleiding

De microbiologische drinkwaterkwaliteit wordt onder andere beïnvloed door de mate van nagroei in het drinkwaterdistributiesysteem. Nagroei kan leiden tot mogelijke risico's en problemen voor consumenten en daarom zijn er in het drinkwaterbesluit parameters opgenomen die de microbiologische waterkwaliteit beschrijven en tevens een indicatie vormen voor de mate van nagroei in het distributiesysteem. Deze parameters zijn het aantal heterotrofe bacteriën die kunnen groeien op een relatief rijk agarmedium bij 22°C (KG22) en het koloniegetal van *Aeromonas* (bij 30°C).

1.1 Alternatieve parameter voor nagroei en blootstelling

In het eerste deel van het project waar deze studie onderdeel van is, werd waargenomen dat de *Aeromonas*- en KG22- aantallen in het drinkwater sterk kunnen variëren tussen huizen of tussen het moment waarop het monster wordt genomen (BTO 2017.028). Ander onderzoek binnen het BTO heeft daarnaast aangetoond dat KG22 en *Aeromonas* slechts een zeer klein deel uitmaken van het totaal aantal bacteriën in drinkwater (BTO 2014.015). Tevens heeft onderzoek naar Nederlands drinkwater laten zien dat de meeste actieve biomassa aanwezig is in de biofilm op de buiswand en in het sediment van het drinkwaterdistributiesysteem (Liu et al., 2014, KWR 2013.019). Zowel *Aeromonas* en KG22 lijken meer dominant aanwezig in het sediment dan in de biofilm (Liu et al., 2014, KWR 2013.019), waardoor deze wettelijke parameters minder betrouwbare indicatoren zijn voor biofilmconcentratie in het distributiesysteem. Doordat een groot deel van de actieve microbiële biomassa in het distributiesysteem aanwezig is in de biofilm, is het monitoren van biofilmhoeveelheden en biofilmtoename in het distributiesysteem belangrijk om de mate van nagroei in een drinkwaterdistributiesysteem te kwantificeren.

Het Nederlandse drinkwater wordt via het distributiesysteem, met een totale leidinglengte van ongeveer 119.000 km, getransporteerd naar de klant (Uit Drinkwaterstatistieken 2015, Vewin). Tijdens dit transport in het distributiesysteem komt het drinkwater in contact met leidingmaterialen die in het distributiesysteem worden toegepast, waaronder asbestcement, gietijzer, PVC en PE. In de afgelopen 60 jaar is het type leidingmateriaal veranderd onder invloed van de productie van synthetische polymeren (Figuur 1). Hierdoor is het relatieve aandeel van asbestcement en gietijzer in het distributiesysteem de afgelopen decennia flink afgenomen, terwijl het aandeel PVC-U sterk is toegenomen. De materialen verschillen ten aanzien van afgifte van groeibevorderende componenten en corrosie, waardoor ze waarschijnlijk een invloed hebben op de biofilmconcentratie op de leidingwand



Figuur 1. Materiaalgebruik in het distributiesysteem van 1955 t/m 2014 (uit Drinkwaterstatistieken 2015, Vewin).

Het doel van de in dit rapport beschreven studie is daarom om onderzoek uit te voeren naar het identificeren en toepassen van biologische parameters die geschikt zijn als indicator(en) voor nagroei van de biofilm op de buiswand van het drinkwaterdistributiesysteem.

2 Materiaal en methoden

2.1 Uitname leidingen

In de zomer en vroege najaar van 2015 zijn er in 13 verschillende voorzieningsgebieden water- en biofilmmonsters genomen. De voorzieningsgebieden worden gevoed door water van verschillende herkomst (grondwater, oppervlaktewater) en met verschillende drinkwaterkwaliteit. Een overzicht van de verschillende voorzieningsgebieden is te vinden in tabel 1. Er zijn acht voorzieningsgebieden waarbij drie keer hetzelfde materiaal (PVC) is bemonsterd en de afstand is gevarieerd. Daarnaast zijn er vijf voorzieningsgebieden waarbij drie verschillende materialen (PVC, PE, gietijzer of asbest cement) zijn bemonsterd, op dezelfde afstand. De diameter van de uitgenomen materialen is 110 mm, tenzij anders vermeld.

Als eerste werd het reinwater bemonsterd van het pompstation dat het desbetreffende voorzieningsgebied voedt. Daarnaast werd een watermonster genomen bij een huis nabij de uitnamelocatie. Vervolgens werd er door middel van een standpijp op de brandkraan een watermonster uit de leiding genomen. Daarna werd het leidingsegment uitgenomen, volgens een bemonsteringsprotocol, zie bijlage 1 en Figuur 2. Afwijkingen van het bemonsteringsprotocol worden vermeld bij betreffende voorzieningsgebied.



Figuur 2. Foto's ten tijde van leidinguitname (met dank aan Dunea).

TABEL 1. OVERZICHT VOORZIENINGSGBIEDEN

Waterbedrijf	Locatie	Bron	Dezelfde materialen	Verskillende materialen	Monsterdatum
Vitens	Spannenburg	Grondwater	X		12-8-2015
Vitens	Culemborg	Grondwater	X		17-8-2015
Evides	Kralingen	Oppervlaktewater	X		24/25-08-2015 & 1-9-2015
Evides	Braakman	Oppervlaktewater	X		7-9-2015
WMD	Zuidwolde	Grondwater	X		16-9-2015
WBG	Nietap	Grondwater		X	21-9-2015
Oasen	De Laak	Grondwater	X		21/28-9-2015
Brabant Water	Luyksgestel	Grondwater	X		6-10-2015
WML	Hanik	Grondwater		X	6-10-2015
Dunea	Katwijk	Oppervlaktewater		X	9/13-10-2015
Dunea	Scheveningen	Oppervlaktewater	X		7/9-10-2015
Vitens	Amersfoortseweg	Grondwater		X	20-10-2015
Brabant Water	Nuland	Grondwater		X	22-10-2015

2.2 Monsternamen

2.2.1 Watermonsters

De één liter watermonsters zijn door de monsternemer volgens standaard protocol genomen; nadat de temperatuur 30 seconden stabiel is. De reinwatermonster van het pompstation dat het desbetreffende voorzieningsgebied voedt werd als eerste genomen. Daarna volgde het drinkwatermonster bij de consument. Een watermonster uit de leiding is genomen door een standpijp aan te sluiten, deze werd vervolgens eerst doorspoeld voor bemonstering.

2.2.2 Leidinguitname

Een uitgebreid leidinguitname protocol is te vinden in de bijlage I. Kort samengevat; de leiding wordt 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 vervoerd.

2.2.2.1 Biofilm bemonstering

De uitgenomen leidingen werden op ± 2 cm van de rand, op vier plekken bemonsterd: de onderkant, beide zijanten 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 word het behandeld met vier keer 2 minuten LES (Low Energy Sonification bij 40 KHz) en vervolgens gepoold, met een totaal van 160 ml.

2.3 Analyses

2.3.1 Adenosinetrifosfaat (ATP)

ATP is aanwezig in alle levende organismen en wordt in de cel gevormd bij de oxidatie van energiebronnen en vervolgens gebruikt bij de synthese van nieuw celmateriaal. 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. Op basis van gemiddelde waarden voor het ATP-gehalte per bacteriecel kan met het ATP-gehalte een schatting worden gemaakt voor de concentratie aan actieve (levende) bacteriën. De ATP-bepaling wordt gebruikt voor de bepaling van de biomassaconcentratie in leidingwater en in biofilms en in testen voor de bepaling van de biologische (in)stabiliteit van water en de groeibevorderende eigenschappen van materialen in contact met leidingwater. De resultaten van de biofilm worden weergegeven in pg ATP cm⁻², terwijl de concentratie in water wordt weergegeven in ng l⁻¹. Om de ATP-concentratie van biofilm en water met elkaar te kunnen vergelijken zijn beide omgerekend naar ng ATP per meter buislengte met een diameter van 110 mm.

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 gesuspenderde 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 biofilm en water zijn wederom omgerekend naar kve per meter buislengte met een diameter van 110 mm.

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

2.3.3 KG22

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. Het geometrisch jaargemiddelde van het KG22 in drinkwater bemonsterd na doorstroming (tot de watertemperatuur 30 seconden constant is) aan de keukenkraan is <100 KVE ml⁻¹. De resultaten van biofilm en water zijn omgerekend naar kve per meter buislengte met een diameter van 110 mm.

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

2.3.4 Next generation sequencing (NGS)

Elk water- en biofilmmonster werd gefiltreerd door een 0,22µm filter, waarna de filters met DNA van een interne controle werden opgeslagen bij -20°C. Later werd DNA uit deze filters geïsoleerd met de PowerBiofilm™ DNA Isolation kit (MoBio Laboratories Inc.).

De DNA isolatie is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-069. Van drie locaties (ps Nietap, ps de Laak en ps Luyksgestel) is bij (een deel van) de monsters (22 van de totaal 129) een fout tijdens de DNA-isolatie gemaakt, waardoor het DNA van deze monsters verloren is geraakt.

Gebarcodeerde fragmenten van het 16S rRNA gen (~300bp), gericht op het V4 hypervariabele regio, werden geamplificeerd met PCR uit de DNA extracties gebruik makend van de primers 515F en 806R. Negatieve controles (blanco tijdens filtratie en blanco 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. Voor selectie van de bacteriegroepen die mogelijk als indicator voor nagroei kunnen dienen zijn de DNA-sequenties verder gesorteerd in Excel.

2.3.5 Ontwerp en validatie van Q-PCR methoden voor detectie van DNA-merkers als indicatoren voor nagroei

Als potentiële indicatoren voor de hoeveelheid biofilm in het drinkwaterdistributiesysteem zijn drie geïdentificeerde bacteriegeslachten geselecteerd op basis van de next-generation sequencing analyse en vergelijking van de bacteriepopulaties in de verschillende milieus/niches. Voor het ontwerpen van specifieke PCR-primers om deze bacteriegeslachten of DNA-merkers in het (water)milieu te kwantificeren zijn operational taxonomic units (OTUs) geselecteerd die in de NGS-analyse tot de drie geïdentificeerde bacteriegeslachten behoren. Deze OTUs bestaan uit DNA-sequenties met >97% sequentieovereenkomst. Per OTU is een “gemiddelde of consensus” DNA-sequentie bepaald met behulp van het programma Mothur waarbij het criterium is gehanteerd dat een bepaalde nucleotide in >50% van de sequenties in de groep voorkomt. Als er op een positie in het DNA-fragment een bepaalde nucleotide (A, C, G of T) >50% aanwezig is, zal deze nucleotide op deze positie in de consensus sequentie worden overgenomen. Is er geen nucleotide voor meer dan 50% aanwezig dan zal dit resultaten in een “n”. Dit betekent dat voor deze positie alle nucleotiden mogelijk zijn. De volgende stap is dat per DNA-merker de consensussequentie van de tien OTUs die de meeste DNA-sequenties bevatten zijn verzameld en vergeleken. Op basis van deze tien DNA-sequenties is opnieuw een consensus DNA-sequentie bepaald waarbij opnieuw het 50% criterium is gehanteerd. Deze laatste consensussequentie is vervolgens gebruikt voor het ontwerpen van PCR-primers voor kwantitatieve detectie. Hiervoor is de primer design tool gebruikt die online beschikbaar is (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi>). Tegen elke DNA-merker of consensus DNA-sequentie zijn verschillende PCR-primers ontworpen. De primers zijn vervolgens gevalideerd en DNA-kalibratie suspensies zijn ontworpen en gegenereerd op basis van de consensus DNA-sequentie. Voor optimalisatie van de annealingtemperatuur van de primers zijn de primers in een gradiënt-PCR geanalyseerd bij een annealingtemperatuurgradiënt van: 50-51-53-55,9-59,5-62,5-64,1-65°C.

2.3.6 Analyse van nagroei indicatoren in verzamelde monsters van drinkwater “af pompstation” en water en biofilm uit het distributienet

Op alle beschikbare water en biofilmmonsters (zie paragraaf 2.1) zijn de drie ontwikkelde qPCR's toegepast volgens onderstaand protocol. Voor kwantificatie is gebruik gemaakt van een ijklijn.

2 minuten	95°C	}	43 cycli
10 seconden	95°C		
30 seconden	63°C		
30 seconden	72°C		

3 Resultaten & Discussie

Om mogelijke nieuwe indicatoren voor biofilmhoeveelheid in het distributiesysteem te detecteren, zijn in totaal dertien voorzieningsgebieden bemonsterd. Naast de analyse van de bacteriepopulaties in deze monsters om potentiële indicatoren te identificeren, zijn ook algemene microbiologische parameters (ATP, KG22 en *Aeromonas*) bepaald. In paragraaf 3.1 worden deze algemene microbiologische parameters kort besproken, waarna in paragraaf 3.2 de samenstelling van de bacteriepopulaties wordt beschreven alsook de identificatie van mogelijke indicatoren voor biofilm. In paragraaf 3.3 wordt de ontwikkelde qPCR methoden beschreven en in paragraaf 3.4 de resultaten van iedere qPCR methode op de monsters die voor dit project zijn geanalyseerd. In paragraaf 3.5 tenslotte worden de relaties tussen de verschillende microbiologische parameters beschreven.

3.1 ATP, KG22 en *Aeromonas*

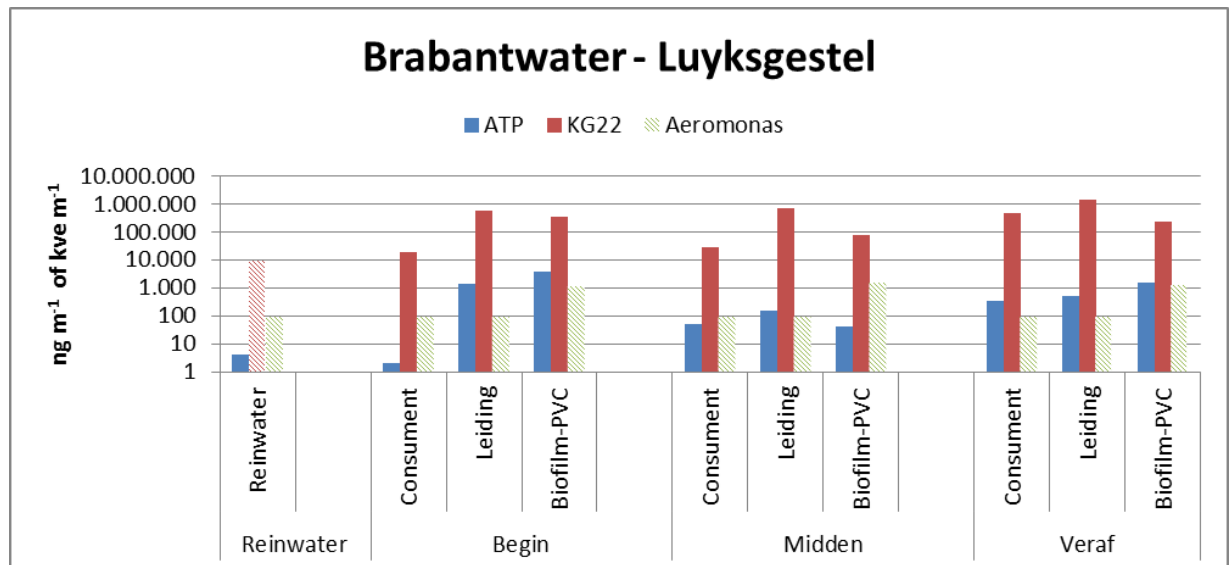
3.1.1 Variatie in afstand

Er zijn in totaal acht voorzieningsgebieden bemonsterd waar hetzelfde materiaal is uitgenomen (PVC) en de afstand tot het pompstation is gevarieerd (begin, midden en veraf). Daar waar bekend zijn de verblijftijden en de relatieve afstanden weergegeven. De ATP, *Aeromonas* en KG22 concentraties zijn bepaald voor alle water- en biofilmmonsters. Alle concentraties zijn omgerekend naar ng ATP of kve per meter buis (uitgaande van diameter van 110 mm) om zo beter te kunnen vergelijken tussen de verschillende matrices (water en biofilm). 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. In deze paragraaf worden twee voorzieningsgebieden uitgebreid besproken. De andere pompstations ondersteunen het beeld dat wordt gevonden bij deze twee pompstations en deze grafieken zijn te vinden in de bijlage II.

3.1.1.1 Pompstation Luyksgestel

De nieuwe en oude biologische stabiliteit parameters (AOC-P17/Nox, BVS, BP7, BP7-BP0, BPC14, AOC-A3, BAS, FeAS, PHMOC, PHMCHC en PFe) waren zeer laag in het water dat wordt geproduceerd bij pompstation Luyksgestel (van der Wielen, 2018; pers. comm. Paul van der Wielen). De ATP, KG22 en *Aeromonas* resultaten van pompstation Luyksgestel zijn weergegeven in Figuur 3. De schuin gestreepte gekleurde staven geven de detectielimiet aan. De ATP concentratie in het reinwater, omgerekend naar een meter leiding, is 4 ng/m. Op de locatie dichtbij het pompstation is de ATP concentratie van het water bij de consument omgerekend 2 ng/m, in het water bemonsterd via de standpijp op het distributiesysteem 1.500 ng/m en in de biofilm 4.000 ng/m. Op de middenlocatie is de ATP concentratie van het water bij de consument omgerekend 50 ng/m, van het water bemonsterd via de standpijp op de distributieleiding 150 ng/m en in de biofilm 40 ng/m. Bij de locatie veraf van het pompstation is de ATP concentratie van het water bij de consument omgerekend 350 ng/m, van het water bemonsterd via de standpijp op de distributieleiding 500 ng/m en van de biofilm 1.500 ng/m. De ATP-concentratie van het water bemonsterd bij de consument lijkt dus toe te nemen met de afstand/verblijftijd tot het pompstation, maar de ATP-concentratie van de biofilm lijkt geen duidelijke trend met afstand/verblijftijd zien. De aantallen van KG22 variëren van 20.000 kve/m tot 340.000 kve/m, de hoogste aantallen worden in het water bemonsterd via de standpijp op de distributieleiding aangetroffen. Er

wordt geen *Aeromonas* waargenomen met kweek in het water en biofilm in het voorzieningsgebied van het pompstation van Luyksgestel.

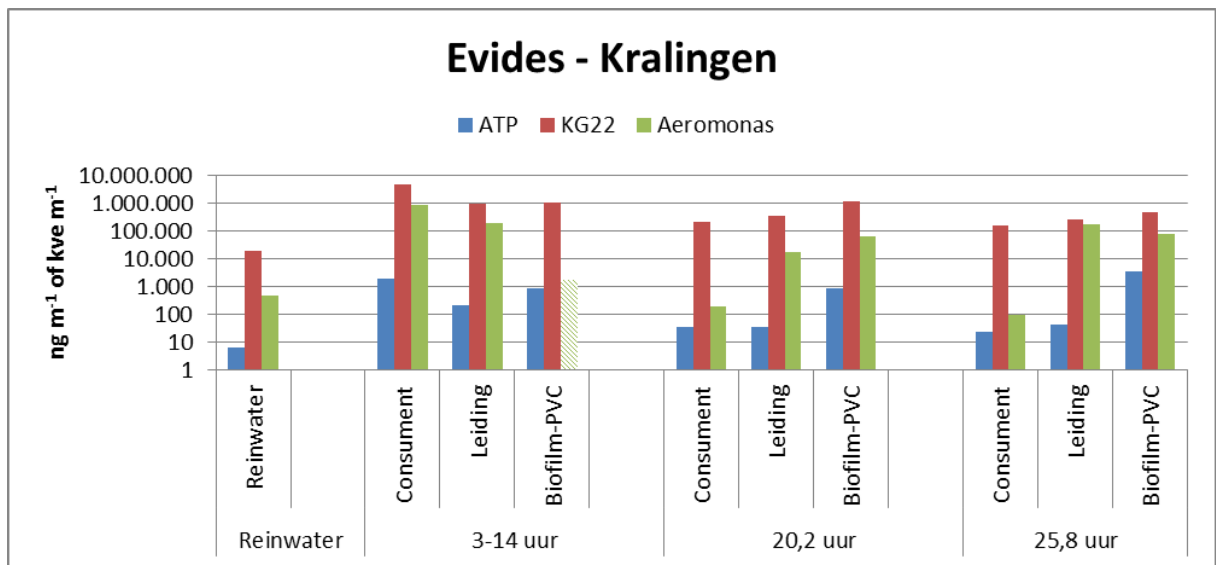


Figuur 3. ATP concentratie en aantallen KG22 en *Aeromonas* in het (rein) water en de biofilm (omgerekend naar meter leiding met diameter 110 mm), en op drie locaties (begin, midden en eind) in het voorzieningsgebied van pompstation Luyksgestel. De schuin gestreepte gekleurde staven geven de detectielimiet aan.

3.1.1.2 Pompstation Kralingen

De nieuwe en oude biologische stabiliteit parameters (AOC-P17/Nox, BVS, BP7, BP7-BP0, BPC14, AOC-A3, BAS, FeAS, PHMOC, PHMCHC en PFe) waren relatief hoog in het water dat wordt geproduceerd door pompstation Kralingen (van der Wielen, 2018; pers. comm. Paul van der Wielen). De ATP, KG22 en *Aeromonas* resultaten van pompstation Kralingen zijn weergegeven in Figuur 4. De ATP concentratie in het reinwater is omgerekend naar een meter leiding 6 ng. In het voorzieningsgebied lopen de ATP concentraties van het drinkwater bemonsterd bij de consument, drinkwater bemonsterd via standpijp op distributieleiding en de biofilm op een distributieleiding omgerekend uiteen van 20 ng/m tot 3.300 ng/m. Er werd geen duidelijke trend zichtbaar voor de ATP concentratie m.b.t. de afstand. De KG22 aantallen variëren van $1,6 \times 10^5$ kve/m tot $1,2 \times 10^6$ kve/m in het water en biofilm bemonsterd uit het voorzieningsgebied, terwijl in het reinwater de KG22 aantallen omgerekend $1,9 \times 10^4$ kve/m zijn. In het voorzieningsgebied van Kralingen wordt ook *Aeromonas* waargenomen, behalve in de biofilm op de locatie dichtbij het pompstation. De aantallen in water en biofilm variëren van 90 kve/m tot $8,6 \times 10^5$ kve/m. In het reinwater zijn de *Aeromonas* aantallen omgerekend 480 kve/m.

In vergelijking met pompstation Luyksgestel zijn de ATP-concentraties, KG22-aantallen en *Aeromonas*-aantallen over het algemeen hoger voor pompstation Kralingen. Dit verschil kan verklaard worden door het eerder genoemde verschil in biologische stabiliteit van het reinwater tussen deze twee pompstations.



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 (verblijftijd 3-14 uur, 20,2 uur en 25,8 uur) in het voorzieningsgebied van pompstation Kralingen. De schuin gestreepte gekleurde staven geven de detectielimiet aan.

3.1.2 Variatie in materiaal

Er zijn in totaal vijf voorzieningsgebieden bemonsterd waar verschillende materialen zijn uitgenomen (PVC, PE, gietijzer of asbestcement) en waar de afstand tot het pompstation per voorzieningsgebied ongeveer gelijk is gehouden (midden), behalve voor pompstation Hanik, waar ook de afstand is gevarieerd en per afstand twee materialen werden uitgenomen. Daar waar bekend zijn de verblijftijden en de afstanden weergegeven.

De ATP concentratie en aantallen *Aeromonas* en KG22 zijn bepaald voor alle water- en biofilmmonsters.

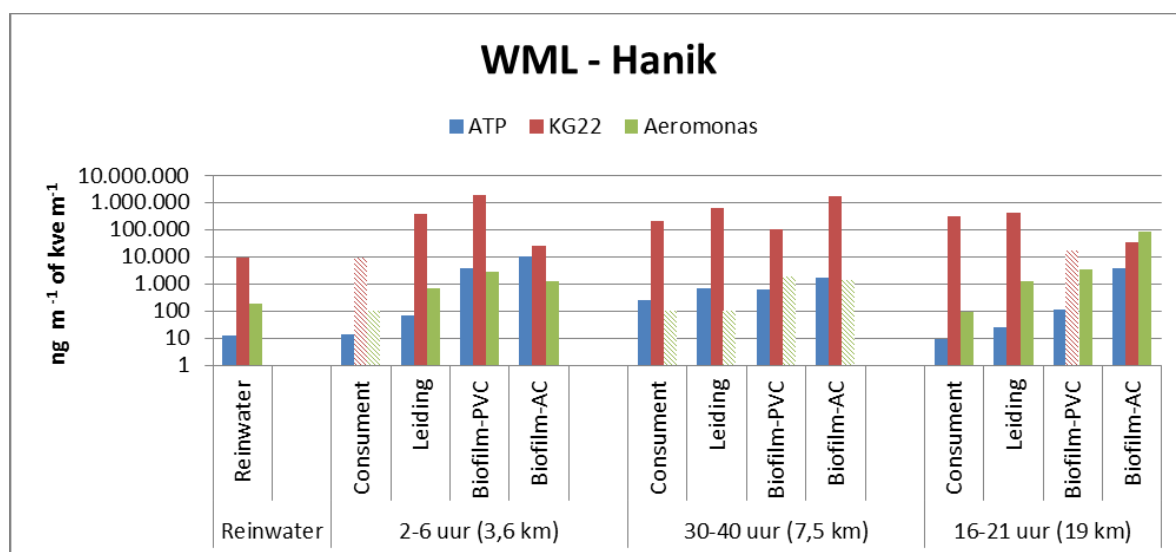
In deze paragraaf worden twee pompstations uitgebreid besproken. De andere drie pompstations ondersteunen het beeld dat wordt gevonden bij deze twee pompstations en deze grafieken zijn te vinden in de bijlage II.

3.1.2.1 Pompstation Hanik

De nieuwe en oude biologische stabiliteit parameters (AOC-P17/Nox, BVS, BP7, BP7-BP0, BPC14, AOC-A3, BAS, FeAS, PHMOC, PHMCHC en PFe) waren relatief laag in het water dat wordt geproduceerd bij pompstation Hanik (van der Wielen, 2018; pers. comm. Paul van der Wielen). In het voorzieningsgebied van Hanik zijn op iedere bemonsteringslocatie twee leidingen uitgenomen PVC-U en Asbestcement, daarnaast is ook de afstand gevarieerd. De ATP, KG22 en *Aeromonas* resultaten van pompstation Hanik zijn weergegeven in Figuur 5. In het reinwater wordt een ATP concentratie gevonden van omgerekend 12 ng/m. In het voorzieningsgebied variëren de ATP concentraties van de water- en biofilmmonsters omgerekend van 9 ng/m tot 10.000 ng/m. Op de locatie dichtbij het pompstation wordt in de biofilm van PVC-U een ATP concentratie gevonden van 4.000 ng/m, maar deze concentratie neemt af naarmate de afstand/verblijftijd toeneemt tot 120 ng/m. Voor de ATP concentratie in de biofilm van AC wordt ook een afname waargenomen met afstand/verblijftijd (van 10.000 ng/m tot 4.000 ng/m), maar de ATP-concentraties van de biofilm op asbestcement zijn dus hoger dan van de biofilm op PVC-U.

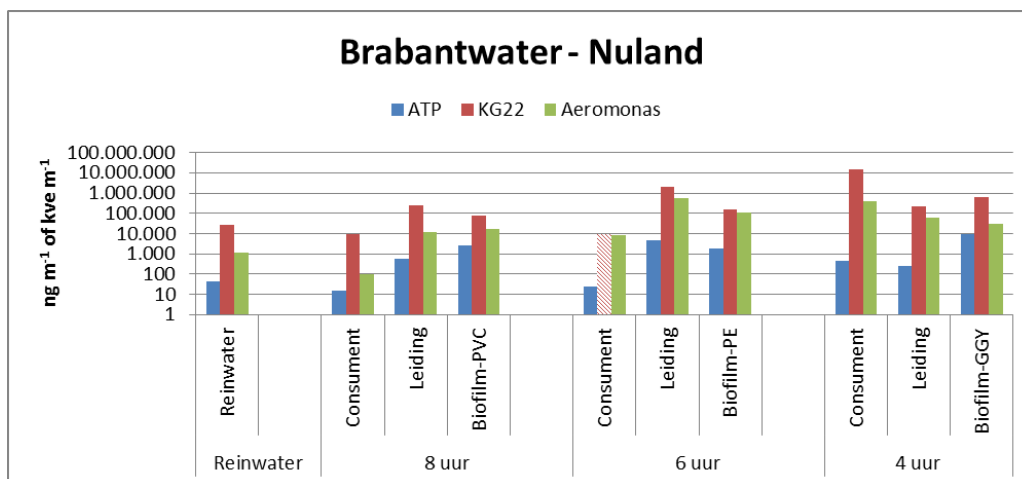
Er wordt geen KG22 waargenomen in het consument water van de locatie dichtbij het pompstation en in de biofilm van PVC-U op de locatie veraf van het pompstation. De KG22 aantallen in het water (consument en standpijp op distributieleiding) van de overige

monsters zijn allemaal rond de $5,0 \times 10^5$ kve/m. De KG22 aantallen in de biofilm variëren tussen de $1,5 \times 10^4$ en $4,2 \times 10^6$ kve/m en deze aantallen zijn niet consequent hoger bij PVC-U of AC. Op de locatie dichtbij het pompstation wordt geen *Aeromonas* waargenomen in het water bemonsterd bij de consument, op de middenlocatie wordt nergens *Aeromonas* waargenomen. Op de locatie ver van het pompstation worden in de biofilm van AC de hoogste *Aeromonas* aantallen gevonden. Bij Hanik worden dus hogere *Aeromonas*-aantallen op het materiaal AC gevonden in vergelijking met PVC-U, maar bij de andere locaties (Amersfoortseweg, Katwijk en Nietap) is dit aspect niet waargenomen. Wat bij een vergelijking van de verschillende pompstations opvalt, is dat als het reinwater minder biologisch stabiel, het effect van materiaaltype op de microbiologische parameters minder groot is.



Figuur 5. ATP concentratie en aantallen KG22 en *Aeromonas* van het (rein)water en de biofilm op PVC-U en asbestcement (AC)(omgerekend naar meter leiding met diameter 110 mm), en op drie locaties (verblijftijd 2-6 uur, 30-40 uur en 16-21 uur) in het voorzieningsgebied van pompstation Hanik. De schuin gestreepte gekleurde staven geven de detectielimiet aan.

De nieuwe en oude biologische stabiliteit parameters (AOC-P17/Nox, BVS, BP7, BP7-BP0, BPC14, AOC-A3, BAS, FeAS, PHMOC, PHMCHC en PFe) waren relatief hoog in het water dat wordt geproduceerd door pompstation Nuland (van der Wielen, 2018; pers. comm. Paul van der Wielen). De ATP, KG22 en *Aeromonas* resultaten van pompstation Nuland zijn weergegeven in Figuur 6. De ATP concentratie in het reinwater is omgerekend naar een meter leiding 42 ng. In het voorzieningsgebied lopen de ATP concentraties van het drinkwater bemonsterd bij de consument, drinkwater bemonsterd via standpijp op distributieleiding en de biofilm op een distributieleiding omgerekend uiteen van 15 ng/m tot 9.300 ng/m. Er werd geen duidelijke trend zichtbaar voor de ATP concentratie m.b.t. het materiaal. De KG22 aantallen variëren van $9,5 \times 10^3$ kve/m tot $1, \times 10^7$ kve/m in het water en biofilm bemonsterd uit het voorzieningsgebied, terwijl in het reinwater de KG22 aantallen omgerekend $2,8 \times 10^4$ kve/m zijn. In het voorzieningsgebied van Nuland wordt ook *Aeromonas* waargenomen. De aantallen in water en biofilm variëren van 95 kve/m tot $5,4 \times 10^5$ kve/m. In het reinwater zijn de *Aeromonas* aantallen omgerekend 1140 kve/m. In vergelijking met pompstation Hanik zijn de ATP-concentraties, KG22-aantallen en *Aeromonas*-aantallen over het algemeen hoger voor pompstation Nuland. Dit verschil kan verklaard worden door het eerder genoemde verschil in biologische stabiliteit van het reinwater tussen deze twee pompstations.



Figuur 6. ATP concentratie en aantallen KG22 en *Aeromonas* van het (rein)water en de biofilm op PVC-U, PE en gietijzer (GGY) (omgerekend naar meter leiding met diameter 110 mm), en op drie locaties (verblijftijd 8 uur, 6 uur en 4 uur) in het voorzieningsgebied van pompstation Nuland. De schuin gestreepte gekleurde staven geven de detectielimiet aan.

3.1.3 Discussie

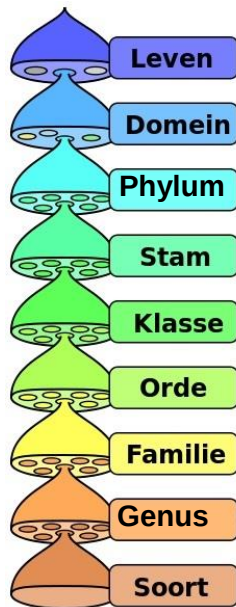
Opvallend was dat de ATP-concentraties en aantallen KG22 en *Aeromonas* in de watermonsters genomen uit standpijp op een distributieleiding afwijkende waardes zien. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat bij de monsternamen via de monsterkraan van de standpijp ook een deel van het sediment uit het distributiesysteem wordt bemonsterd. Hierdoor beschrijven deze waarden minder betrouwbaar de eigenlijke concentraties en aantallen in het gedistribueerde drinkwater. In de overige paragrafen worden daarom de gegevens van leidingwatermonsters wel weergegeven maar niet verder bediscussieerd.

De actieve biomassa in deze studie werd voornamelijk aangetroffen in de biofilm, echter soms waren de ATP concentraties in het consumentwater vergelijkbaar of iets hoger dan de concentratie in de biofilm. Liu heeft in 2014 berekend wat het aandeel actieve biomassa was voor 3 matrices: bulk water en opgeloste deeltjes; sediment en biofilm. Hij vond dat het aandeel bulk water en opgeloste deeltjes minder dan 2% was, terwijl biofilm en sediment meer dan 98% was (Liu, 2014). In de in dit rapport beschreven studie zijn alleen biofilm en drinkwater bemonsterd en de resultaten uit de verschillende voorzieningsgebieden lieten zien dat 0,1 tot 69 % (gemiddeld 9%) van de actieve biomassa (ATP) in de biofilm aanwezig was en 31 tot 99,9% (gemiddeld 91%) in het drinkwater. Deze percentages komen overeen met die gerapporteerd door Liu, 2014.

In meer dan de helft van de biofilmmonsters werd *Aeromonas* aangetroffen. Hierbij was geen trend te ontdekken met gebruikt materiaaltype (PVC, PE, AC of GGY) of afstand/verblijftijd in het distributiesysteem. Eerder werd gepubliceerd dat *Aeromonas* niet werd aangetroffen in biofilmmonsters (n=10) (Liu, 2017). In de studie van Liu et al. (2017) werd slechts één voorzieningsgebied bemonsterd en het is mogelijk dat in dat voorzieningsgebied *Aeromonas* niet in de biofilm voorkwam. De resultaten van onze studie laten echter zien dat *Aeromonas* wel degelijk kan voorkomen in de biofilm. Eerdere studies hebben ook laten zien dat de hoogste aantallen van *Aeromonas* werden aangetroffen in sediment (Liu et al., 2014; 2017. van der Wielen & Lut, 2016). Doordat in onze studie het sediment niet is bemonsterd, blijft voor de in onze studie onderzochte voorzieningsgebieden onduidelijk waar de hoogste *Aeromonas*-aantallen aanwezig waren.

3.2 NGS

De NGS analyses in dit onderzoek hebben geresulteerd in gemiddeld 153.992 DNA-sequenties per monster van hoge kwaliteit met een spreiding van 106.885 sequenties, en met een minimum aantal DNA sequenties van 4.831 en een maximum aantal van 516.946 sequenties.



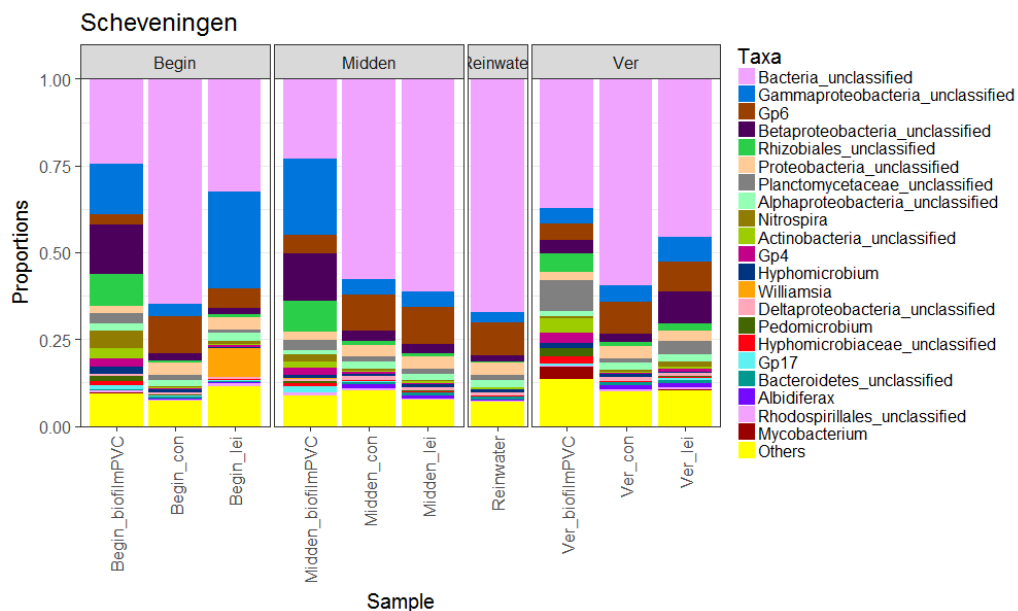
Figuur 7. De hiërarchie van de acht belangrijkste taxonomische rangen. Tussenliggende rangen zijn niet afgebeeld.

De NGS analyses geven een uitgebreid beeld van de samenstelling van de bacteriepopulatie die in een monster aanwezig is. Van elk monster wordt elke geanalyseerde sequentie door middel van fylogenering of biologische barcodering geïdentificeerd tot een bepaalde taxonomische rang (Figuur 7). Bij fylogenering wordt elke sequentie vergeleken met een referentiesequentiedatabase die internationaal beschikbaar is en vervolgens ingedeeld/op taxonomische naam van een rang gebracht op basis van de gelijkenis met deze referentiesequentie. Het taxonomisch niveau waarop de sequentie op naam kan worden gebracht hangt af van de aanwezigheid van overeenkomende sequenties in de referentiedatabase. Indien op bijvoorbeeld genusniveau een overeenkomende referentiesequentie ontbreekt, zal de sequentie op dit niveau als “onbekend/unclassified” worden getypeerd, maar wanneer wel een referentiesequentie op familieniveau aanwezig is, dan wordt deze familienaam weergegeven. De betrouwbaarheid en volledigheid van fylogenering hangt af van de beschikbare referentiedatabase. Voor het geanalyseerde 16S rRNA genfragment is een redelijk uitgebreide referentiedatabase beschikbaar. Identificatie tot geslacht niveau is vaak niet mogelijk door het (nog) ontbreken van overeenkomende soorten in de database, terwijl identificatie tot soortsniveau niet mogelijk is doordat de lengte van het 16S rRNA gensequentie te kort is om de sequenties tot soortsniveau te classificeren.

3.2.1 NGS per voorzieningsgebied

Als voorbeeld van een pompstation laat Figuur 8 de top 21 zien van meest dominante bacteriën tot genus niveau (indien mogelijk) die aanwezig zijn in reinwater, consument- en leidingwater en biofilmmonsters van pompstation Zuidwolde. Iedere kleur in een kolom staat voor een andere bacteriegenus (of hogere taxonomische rangen, indien de sequenties niet tot genusniveau konden worden geclassificeerd). De bacteriegenera die niet tot de top 21

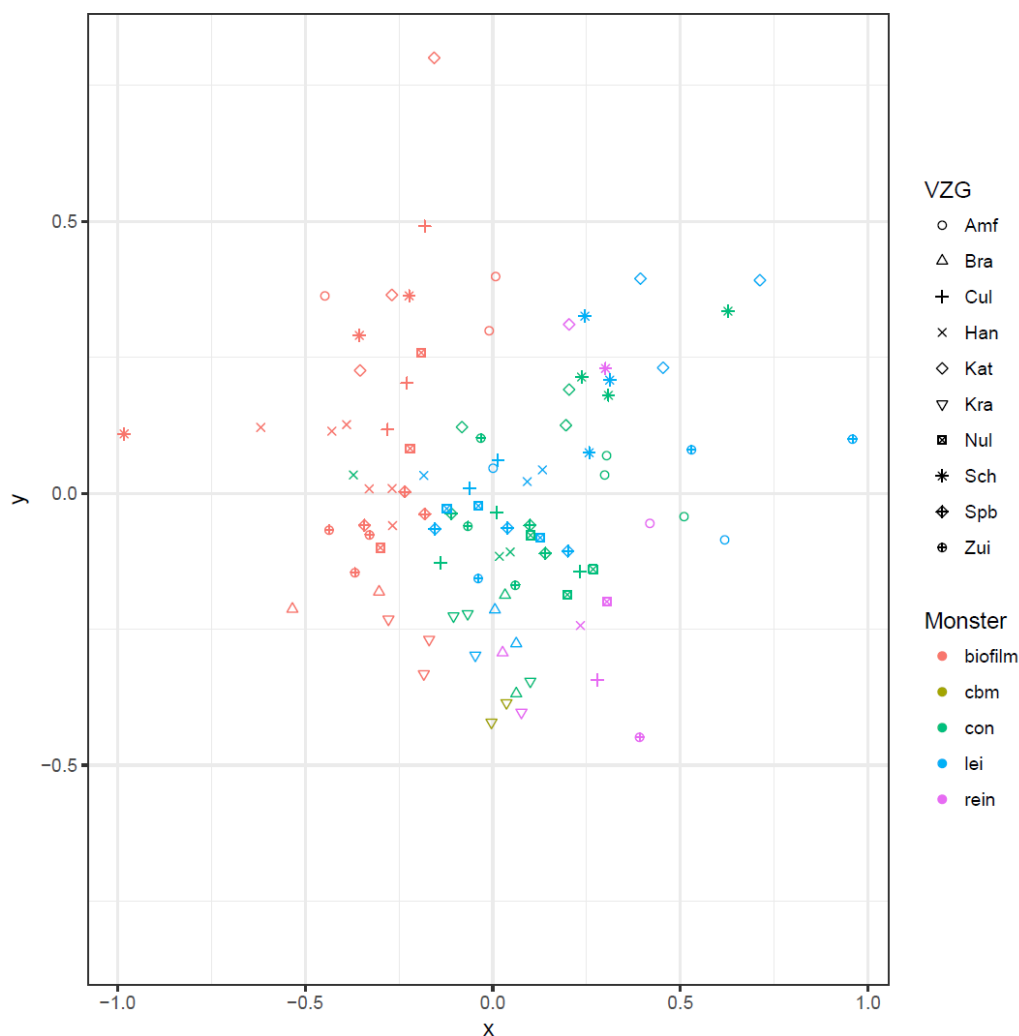
horen, zijn in de groep 'others' samengevoegd. Te zien is dat het reinwater een vergelijkbare kleursamenstelling heeft met de kleursamenstelling van water bemonsterd na doorstroming bij de consument en in iets mindere mate met de kleursamenstelling van het leidingwater bemonsterd uit de standpijp op een distributieleiding. Dit betekent dat de 21 dominante groepen grotendeels overeenkomen tussen reinwater en consument- en leidingwater op de verschillende bemonsterde locaties. De samenstelling van de dominante bacteriepopulatie op genusniveau lijkt dus niet veel te veranderen tijdens distributie in het voorzieningsgebied van pompstation Zuidwolde. De kleursamenstelling van de biofilm is deels anders dan die van het water, wat er op duidt dat de samenstelling van de bacteriepopulatie in de biofilm anders is dan die van het water. De samenstelling van de bacteriepopulatie op genusniveau in de biofilm op locatie dichtbij en midden lijkt wel vergelijkbaar, terwijl die van veraf duidelijk verschillend is. Dit resultaat duidt er dus ook op dat de samenstelling van de bacteriepopulatie op genusniveau verschillend kan zijn op verschillende locaties in het distributiesysteem.



Figuur 8. Top 21 van de bacteriën (op genusniveau) aanwezig in reinwater, water bemonsterd na doorstroming bij de consument (con), water bemonsterd uit de standpijp op een distributieleiding (lei) en biofilm op PVC- U op locatie dichtbij (begin), midden en veraf (ver) van het pompstation in het voorzieningsgebied Scheveningen.

Deze analyses van de overige pompstations zijn weergegeven in Bijlage III.

Principle component analysis (PCA) of non metric dimensional scaling (NMDS) is een manier om de volledige bacteriepopulatie op het niveau van operationele taxonomische unit (OTU, dit is een maat voor bacteriesoorten) tussen verschillende monsters te vergelijken en te visualiseren. Een NMDS plot waarin de OTU-samenstelling van ieder monster met elkaar wordt vergeleken is weergegeven in Figuur 9. De assen zijn bij een NMDS analyse dimensieloos. De kleuren geven de monsters van de verschillende matrices aan (biofilm, consumentwater, leidingwater en reinwater), terwijl de diverse symbolen de monsters uit de verschillende voorzieningsgebieden aangeven. Te zien is dat de verschillende locaties behoorlijk verspreid over de grafiek liggen, maar dat de biofilmmonsters (rood) over het algemeen apart groeperen van de watermonsters (blauw, groen en paars). Dit duidt er dus op dat de samenstelling van de bacteriepopulatie (op OTU-niveau) van de biofilm onderling meer op elkaar lijkt dan op de geanalyseerde watermonsters.

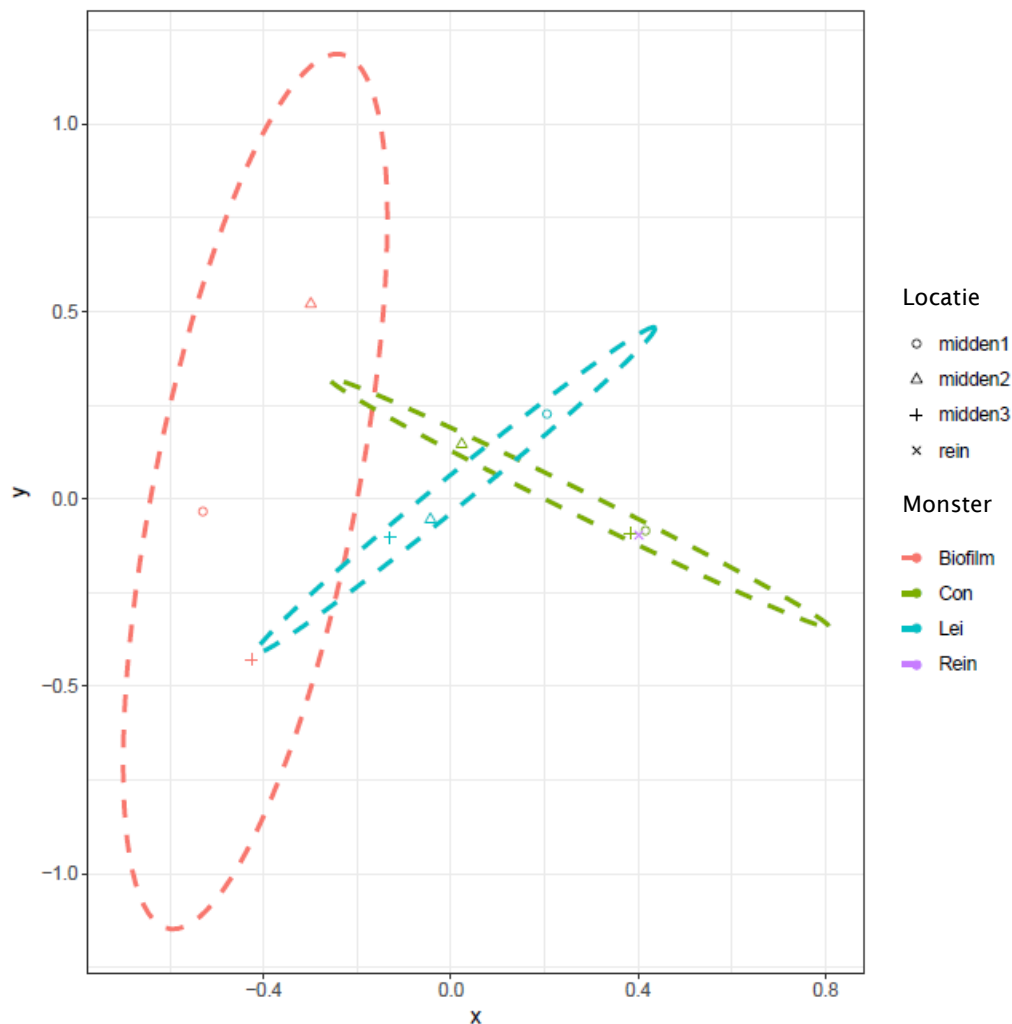


Figuur 9. NMDS plot van OTU samenstelling in de verschillende matrices (reinwater, biofilm, consumentwater en leidingwater/cbm) bij alle bemonsterde voorzieningsgebieden.

Als voorbeeld zijn voor twee pompstations (Nuland en Culemborg) aparte NMDS grafieken gemaakt (Figuren 10 en 11), die hieronder worden besproken.

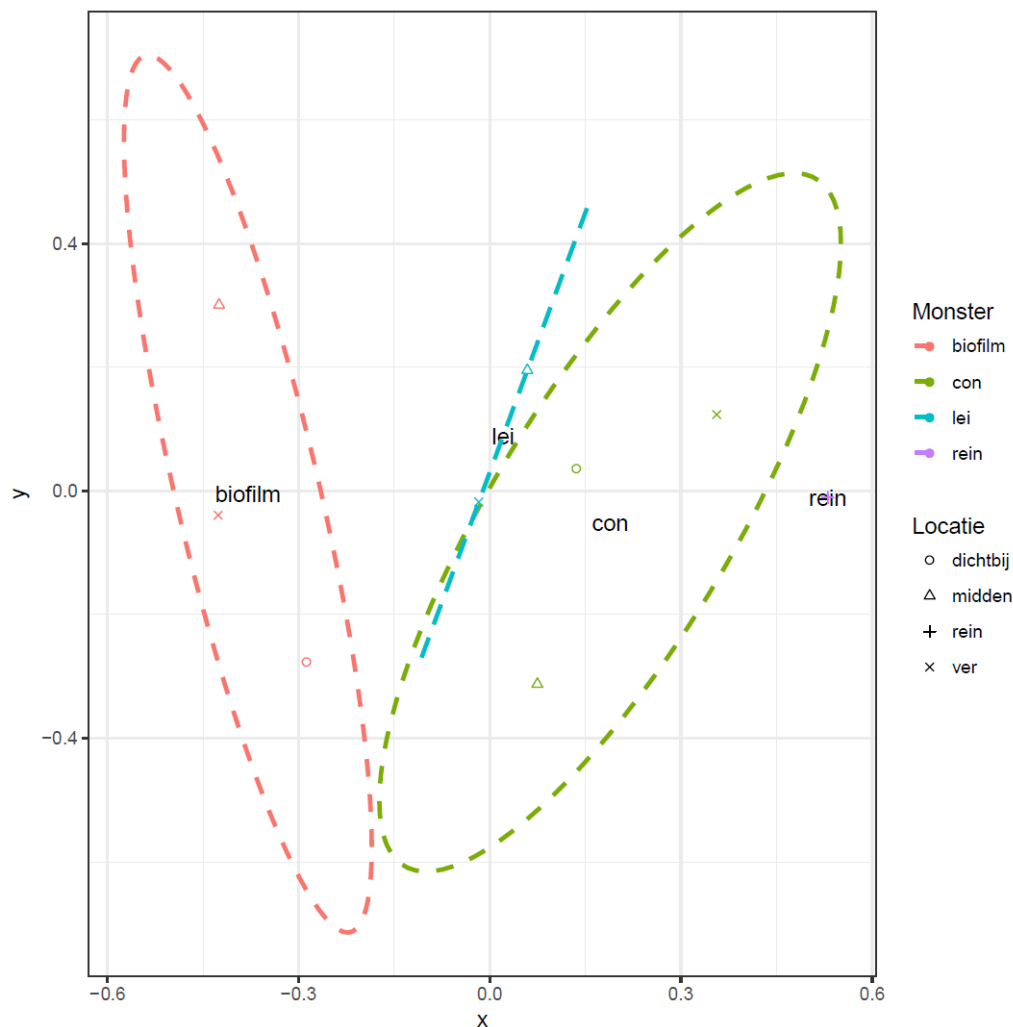
Bij Nuland zijn alle monsters genomen op locaties die in het ‘midden’ van het voorzieningsgebied liggen, maar is het materiaal tussen de locaties verschillend. Te zien is dat de matrices apart groeperen, met name de biofilm monsters, de samenstelling van de bacteriepopulatie in de biofilm is dus anders dan die van het drinkwater. De biofilmpopulaties zijn onderling ook verschillend, dat waarschijnlijk wordt veroorzaakt doordat de biofilms zijn bemonsterd van verschillende leidingmateriaaltypen. De samenstelling van de bacteriepopulatie van het consumentwater en leidingwater lijken minder op elkaar dan werd verwacht naar aanleiding van Figuur 9. Mogelijk wordt dit veroorzaakt doordat het leidingwater is bemonsterd met behulp van een standpijp. Voordat het monster uit het monsterkraantje van de standpijp is genomen, is de standpijp eerst aangesloten, waarbij onder hoge snelheid een klein watervolume wordt gespuid. Het is daarbij niet ondenkbaar dat ook sediment wordt opgewerveld dat ook in het bemonsterde leidingwater terecht is gekomen. Eerdere studies hebben laten zien dat de bacteriesamenstelling van het sediment anders is dan die van het drinkwater (Liu et al., 2014). Reinwater wordt volgens verwachting gelijk gegroepeerd bij consument water, dus de

samenstelling van de bacteriepopulatie lijkt weinig te veranderen tijdens distributie van het water naar de consument.



Figuur 10. NMDS plot van OTU samenstelling in de verschillende matrices (reinwater, biofilm, consumentwater en leidingwater) bemonsterd op drie verschillende locaties in het voorzieningsgebied van Nuland.

Bij Culemborg zijn de afstanden gevarieerd en is het materiaal hetzelfde. Te zien is dat ook hier alle matrices apart groeperen, met name de biofilmmonsters. Ook hier geldt weer dat consument en leidingwater minder op elkaar lijken dan werd verwacht. De samenstelling van de bacteriepopulatie in het reinwater is bij pompstation Culemborg wel duidelijk anders dan die in het water bemonsterd bij de consument, maar de samenstelling van de bacteriepopulatie in het consumentenwater lijkt wel meer op bacteriesamenstelling van het reinwater dan de bacteriesamenstelling van het leidingwater of biofilm. Tot slot wordt bij pompstation Culemborg ook gezien dat de bacteriesamenstelling van zowel de biofilmmonsters alsook het water bemonsterd bij de consument verschillen tussen de verschillende locaties.



Figuur 11. NMDS plot van OTU samenstelling in de verschillende matrices (reinwater, biofilm, consumentwater en leidingwater) bemonsterd op drie verschillende locaties van voorzieningsgebied Culemborg.

In de in dit rapport beschreven studie observeren we dat de bacteriesamenstelling, bepaald met NGS analyse, van het reinwater vergelijkbaar is met de bacteriesamenstelling van het water bemonsterd na doorstroming van de kraan bij de consument. Dit laat zien dat de bacteriesamenstelling in het drinkwater niet ingrijpend veranderd tijdens distributie naar de consument. Dit aspect is ook in eerdere studies waargenomen (Roeselaars et al., 2015). In twee voorzieningsgebieden (Culemborg en Zuidwolde) wordt echter een verandering van de bacteriesamenstelling waargenomen wanneer het reinwater en het consumentwater wordt vergeleken. Dit betekent dus dat er ook locaties zijn waarin de samenstelling van de bacteriepopulatie wel kan veranderen tijdens distributie naar de klant. Een dergelijke verandering is in principe minder wenselijk, omdat een indicatie is dat het water minder biologisch stabiel blijft tijdens distributie.

3.2.2 Identificeren bacteriegroepen die mogelijk als marker kunnen dienen

Om bacteriegroepen te identificeren die als mogelijke indicator voor biofilm kunnen dienen en ook aanwezig zijn in drinkwater, is als eerste in de resultaten van de 16S rRNA gensequentieanalyse onderzocht welke bacteriegroepen dominant waren in de biofilm en ook in het gedistribueerde water voorkomen. Doordat een dergelijke marker uit de biofilm in het voorzieningsgebied zou moeten komen, zou het reinwater deze marker niet moeten

bezitten. Daarom is ook achterhaald of dergelijke bacteriegroepen afwezig of in lage aantallen aanwezig zijn in het reinwater. Uit deze exercitie werden negen verschillende bacteriegroepen geïdentificeerd (Tabel 2), die echter tot verschillende taxonomieniveaus (bv genus, familie, orde of klasse) konden worden vastgesteld. Zo is een specifieke bacteriegroep waargenomen (*Deltaproteobacteria_unclassified* in Tabel 2), maar de bacteriesoorten die tot deze groep behoren zijn allen nog onbekend en dusdanig verschillend van bekende bacteriesoorten, waardoor alleen duidelijk is geworden dat ze tot de Klasse *Deltaproteobacteria* behoren. De Orde, Familie en Genus waartoe deze bacteriën behoren zijn nog dus niet eerder beschreven en dus onbekend. Vijf andere bacteriegroepen die zijn geïdentificeerd kunnen worden ingedeeld als aparte Klasse binnen het Phylum *Acidobacteria*. Andere geïdentificeerde bacteriegroepen konden worden ingedeeld tot de Orde *Solirubrobacterales*, de Familie *Anaerolineaceae* of Genus *Hyphomicrobium*. In paragraaf 3.2.2 wordt voor elke geïdentificeerde bacteriegroep besproken in hoeverre de bacteriegroep geschikt lijkt om specifieke primers tegen te ontwikkelen voor een qPCR-analyse, een volgende vereiste om als mogelijke marker voor biofilm te kunnen dienen.

TABEL 2. OVERZICHT DOMINANTE BACTERIEGROEPEN IN DE BIOFILM, AANWEZIG IN GEDISTRIBUEERD DRINKWATER, MAAR AFWEZIG OF IN LAGE AANTALLEN IN REINWATER

Phylum	Klasse	Orde	Familie	Genus
Acidobacteria	Acidobacteria Gp3	Onbekend	Onbekend	Onbekend
Acidobacteria	Acidobacteria Gp4	Onbekend	Onbekend	Onbekend
Acidobacteria	Acidobacteria Gp9	Onbekend	Onbekend	Onbekend
Acidobacteria	Acidobacteria Gp10	Onbekend	Onbekend	Onbekend
Acidobacteria	Acidobacteria Gp17	Onbekend	Onbekend	Onbekend
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Onbekend
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Onbekend	Onbekend	Onbekend
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobium
Actinobacteria	Actinobacteria	Solirubrobacterales	Onbekend	Onbekend

3.2.3 Geschiktheid geïdentificeerde bacteriegroepen voor qPCR ontwikkeling

3.2.3.1 Bacteriegroep binnen Klasse *Deltaproteobacteria*

Eén geïdentificeerde bacteriegroep kon slechts worden ingedeeld tot Klasse *Deltaproteobacteria*. Doordat het Orde-, Familie en Genusniveau van deze bacteriegroep onbekend is, zouden alleen betrouwbare primers tegen de Klasse *Deltaproteobacteria* gemaakt kunnen worden. De groep bacteriën die tot de *Deltaproteobacteria* behoren en in het drinkwaterecosysteem voorkomen zijn echter beduidend groter dan alleen de geïdentificeerde bacteriegroep. Dergelijke andere bacteriegroepen binnen de Klasse *Deltaproteobacteria* zijn bijvoorbeeld ook aangetroffen in het reinwater van de onderzochte pompstations en deze zouden ook worden gedetecteerd met primers specifiek voor de Klasse *Deltaproteobacteria*. Hierdoor is de geïdentificeerde bacteriegroep binnen de *Deltaproteobacteria* ongeschikt om betrouwbare en specifieke primers tegen te ontwikkelen.

3.2.3.2 Bacteriegroepen binnen de *Acidobacteria* groepen (gp's)

Een rangschikking is gemaakt naar geschiktheid als indicator voor biofilm van de verschillende *Acidobacteria* groepen (gp's). Deze rangschikking is tot stand gekomen door rekening te houden met een lage aanwezigheid in het reinwater en dominantie in de biofilm en gedistribueerde watermonsters. De rangschikking laat zien dat zowel Gp3 als Gp17 veelbelovend zijn als indicator, ook omdat geen andere bacteriegroepen die in het ecosysteem aanwezig zijn tot deze groepen behoren. Vervolgens is ook gekeken naar het

aantal sequenties beschikbaar in een openbare database (NCBI) (Tabel 3). Sequenties uit de openbare database zijn namelijk nodig voor de ontwikkeling van betrouwbare en specifieke primers en wanneer slechts zeer weinig sequenties beschikbaar zijn in deze database, is het zeer lastig om betrouwbare primers te ontwikkelen. Voldoende beschikbare sequenties zijn aanwezig in de database voor Gp3, maar niet voor Gp17. Uiteindelijk is daarom de verwachting dat *Acidobacteria* Gp3 het meest geschikt is, van de groepen van *Acidobacteria*, als mogelijke marker voor biofilm in het distributiesysteem.

TABEL 3. OVERZICHT RANGSCHIKKING ACIDOBACTERIA GP'S EN BESCHIKBARE SEQUENTIES IN NCBI DATABASE

Rangschikking	Genus	Beschikbare sequenties (NCBI)
1	Acidobacteria Gp3	342
1	Acidobacteria Gp17	5
3	Acidobacteria Gp4	67
4	Acidobacteria Gp9	3
5	Acidobacteria Gp10	33

3.2.3.3 Bacteriegroep binnen *Hyphomicrobium*

De bacteriegroep behorend tot het Genus *Hyphomicrobium* lijkt een goede kandidaat als indicator voor biofilm, omdat bij ontwikkeling van specifieke primers tegen het genus geen andere bacteriegroepen zullen worden gedetecteerd. Daarnaast zijn er voldoende sequenties van *Hyphomicrobium* in de internationale database aanwezig om betrouwbare primers te kunnen ontwikkelen.

3.2.3.4 Bacteriegroep binnen *Anaerolineaceae*

Naast de mogelijk als marker geïdentificeerde bacteriegroep, die binnen de Familie *Anaerolineaceae* valt, zijn er vijf andere bacteriegroepen (genera) gevonden in de monsters die ook behoren tot de Familie *Anaerolineaceae*. De aanwezigheid van deze vijf andere bacteriegroepen in de drinkwater- en biofilmmonsters (inclusief reinwater) is echter laag. Dit betekent dat de aanwezigheid van deze andere vijf bacteriegroepen, die ook behoren tot de *Anaerolineaceae*, de kwantitatieve detectie van de geïdentificeerde bacteriegroep binnen de *Anaerolineaceae* niet of nauwelijks verstoren. In de internationale openbare database zijn ook voldoende sequenties beschikbaar om betrouwbare en specifieke primers te ontwikkelen.

3.2.3.5 Bacteriegroep binnen *Solirubrobacterales*

Naast de als mogelijke marker geïdentificeerde bacteriegroep binnen de Orde *Solirubrobacterales*, zijn er teveel verschillende en andere bacteriegroepen (genera, families) van de Orde *Solirubrobacterales* aanwezig in de (reinwater) monsters om onderscheidend genoeg te zijn als marker, wanneer specifieke primers voor de Orde *Solirubrobacterales* zouden worden ontwikkeld.

3.2.3.6 Mogelijke markers voor biofilmgroei

Uit bovenstaande beschrijving volgt dat er uiteindelijk drie bacteriegroepen overblijven die als mogelijke indicator kunnen dienen voor de mate van biofilmvorming en/of -hoeveelheid op de buiswand van het distributiesysteem. Deze drie bacteriegroepen zijn in Tabel 4 weergegeven.

TABEL 4. OVERZICHT GEÏDENTIFICEERDE BACTERIEGROEPEN ALS MOGELIJKE INDICATOR BIOFILM

Phylum	Klasse	Orde	Familie	Genus
Acidobacteria	Acidobacteria Gp3	Acidobacteria_Gp3	Acidobacteria_Gp3	Acidobacteria Gp3
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Anaerolineaceae_unclassified
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobium

3.3 qPCR methoden voor geselecteerde indicatoren voor nagroei

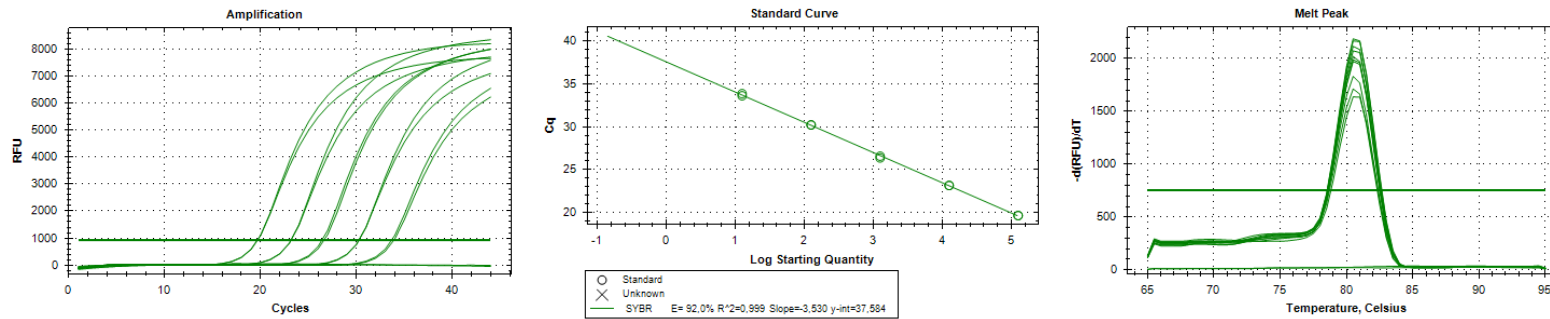
Voor de drie bacteriegroepen die mogelijk kunnen dienen als indicator voor biofilm in het distributiesysteem (Tabel 4) zijn qPCR methoden ontwikkeld op basis van de consensus sequentie van het 16S rRNA gen. Deze consensus DNA-sequentie is gebaseerd op de 10 OTUs met de meeste sequenties die taxonomisch zijn geïdentificeerd tot één van de drie geïdentificeerde bacteriegroepen. Deze consensus-sequentie is vervolgens ingevoerd in de online tool voor het ontwerpen van specifiek PCR-primers (zie 2.2.6). Als resultaat geeft de tool een lijst met primers waarmee de doelsequentie (consensussequentie) selectief kan worden vermenigvuldigd. Voor ieder van de drie geïdentificeerde bacteriegroepen zijn primers geselecteerd (zie ook bijlage V en VI). De DNA-sequenties van de primers zijn weergegeven in tabel 5.

TABEL 5. OVERZICHT ONTWERPEN QPCR-PRIMERS VOOR DETECTIE VAN DE DRIE BACTERIEGROEPEN DIE ALS INDICATOR VOOR BIOFILM ZOUDEN KUNNEN DIENEN

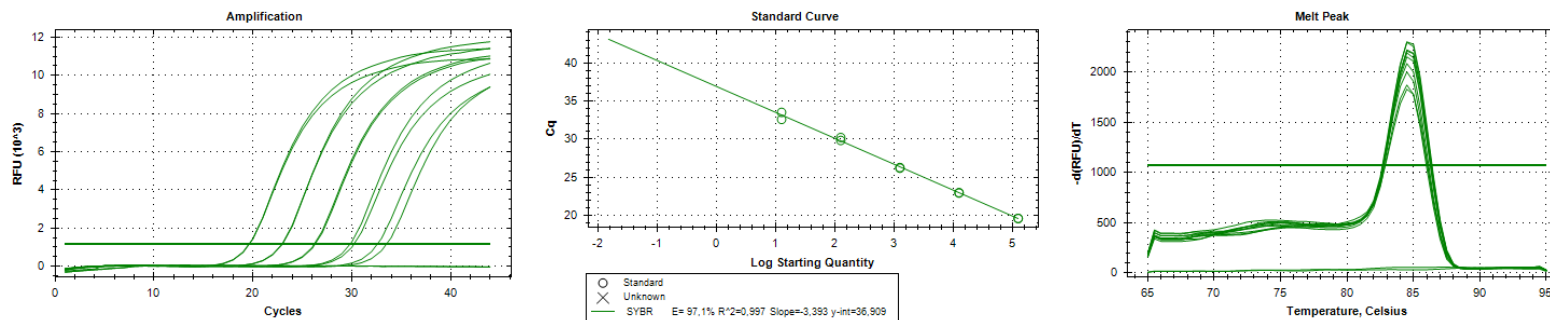
Bacteriegroep	Primer (5'→3')	Reverse (5'→3')	PCR fragmentlengte (bp)
Acidobacteria Gp3	ATACGTAGGCAGCAAGCGTT	CTACACCACCGGTGTTTCCTC	196
Anaerolineaceae	GGAATTCCGGGTGTAGTGGT	CGTTCGCTCCCCCTAGCTTTC	110
Hyphomicrobium	CTCAACCTCGGAAGTGCCTT	GCCACCGGTGTTCTTCCTAA	109

Voor validatie en kalibratie van de qPCR's zijn op basis van de consensussequentie voor elke van de drie ontwikkelde PCR's zogeheten gBlocks ontworpen (zie bijlage VII). Deze gBlocks zijn gesynthetiseerde DNA-fragmenten waarin naast de consensussequentie ook het DNA-fragment van de interne controle (IC) is samengevoegd. Het aantal genkopieën van elke gBlock is bepaald met behulp van de qPCR voor de interne controle die dus ook in de gBlock aanwezig is. Dit is gedaan door in een experiment verdunningen van de gBlock te kwantificeren op basis van de IC met behulp van het standaard KWR plasmide. Dit plasmide wordt gebruikt voor kalibratie van verschillende qPCR methoden en de concentratie van dit plasmide is zeer nauwkeurig vastgesteld met droplet PCR.

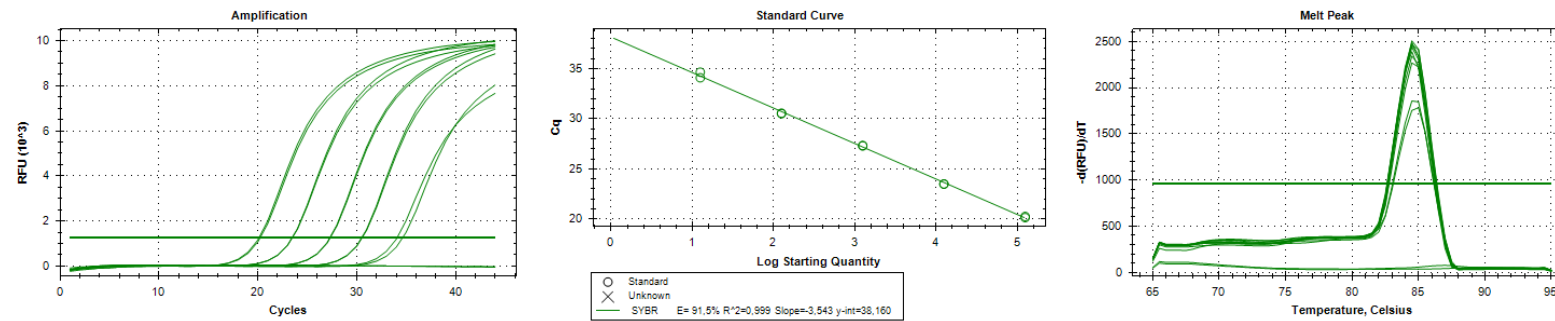
Tevens is de optimale annealingtemperatuur van iedere qPCR vastgesteld door een temperatuurgradiënt PCR uit te voeren en te achterhalen bij welke temperatuur de DNA-vermenigvuldiging optimaal verloopt en er geen bijproducten (primer dimeer of aspecifiek product) in de PCR-blanco worden gevormd. voor alle drie de primerparen bleek de optimale temperatuur voor de PCR 63°C te zijn.



Figuur 12: Amplificatiecurven, kalibratielijn met PCR-efficiëntie en smeltcurve van de kalibratielijnmonsters en de specifieke PCR voor detectie van *Acidobacteria Gp3* bacteriën.



Figuur 13: Amplificatiecurven, kalibratielijn met PCR-efficiëntie en smeltcurve van de kalibratielijnmonsters en de specifieke PCR voor detectie van *Anaerolineaceae_unclassified* bacteriën.



Figuur 14: Amplificatiecurven, kalibratielijn met PCR-efficiëntie en smeltcurve van de kalibratielijnmonsters en de specifieke PCR voor detectie van *Hyphomicrobium* bacteriën.

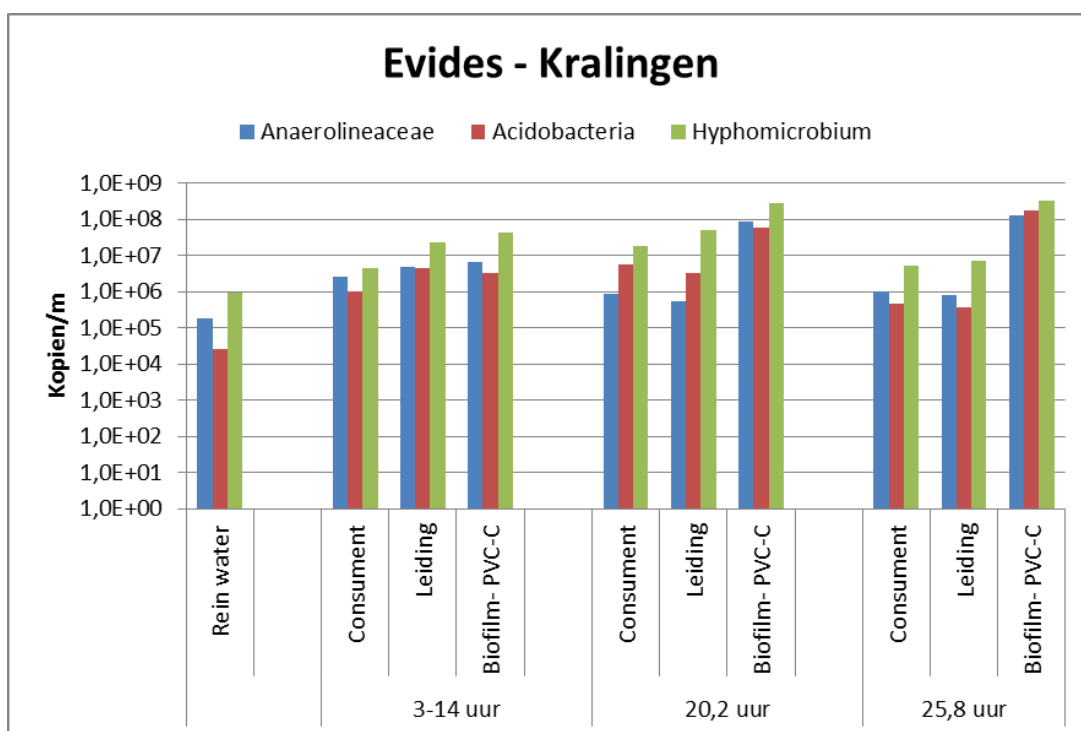
De primers zijn vervolgens geanalyseerd op efficiëntie van de DNA-vermenigvuldiging in de PCR door analyse van de kalibratielijn. Als de DNA-vermenigvuldiging goed verloopt, zal de PCR-efficiëntie min. 85% en max. 105% zijn, maar bij een efficiënt verlopende PCR zal deze tussen de 90-100% zijn. Naast de efficiëntie is ook de smelttemperatuur van de producten bepaald. De smelttemperatuur geeft informatie over het product dat is gevormd. Een specifiek (beoogd) PCR-product heeft over het algemeen een zelfde smelttemperatuur. Mogelijke bijproducten hebben een afwijkende smelttemperatuur en zijn zodanig herkenbaar (figuur 12, 13 en 14). De PCR-efficiëntie van de drie qPCRs varieerde tussen de 91,5 en 97,0 % en de smeltcurven lieten één piek zien, dus er is één specifiek PCR-product gevormd. Op basis van bovenstaande resultaten zijn de drie PCR-methoden geschikt voor analyse van de monsters verzameld in de verschillende meetcampagnes om te bepalen of ze een indicatieve waarde hebben voor de mate van biofilm in het distributienet.

3.4 *Anaerolineaceae*, *Acidobacteria* GP3 en *Hyphomicrobium* in drinkwater en biofilm.

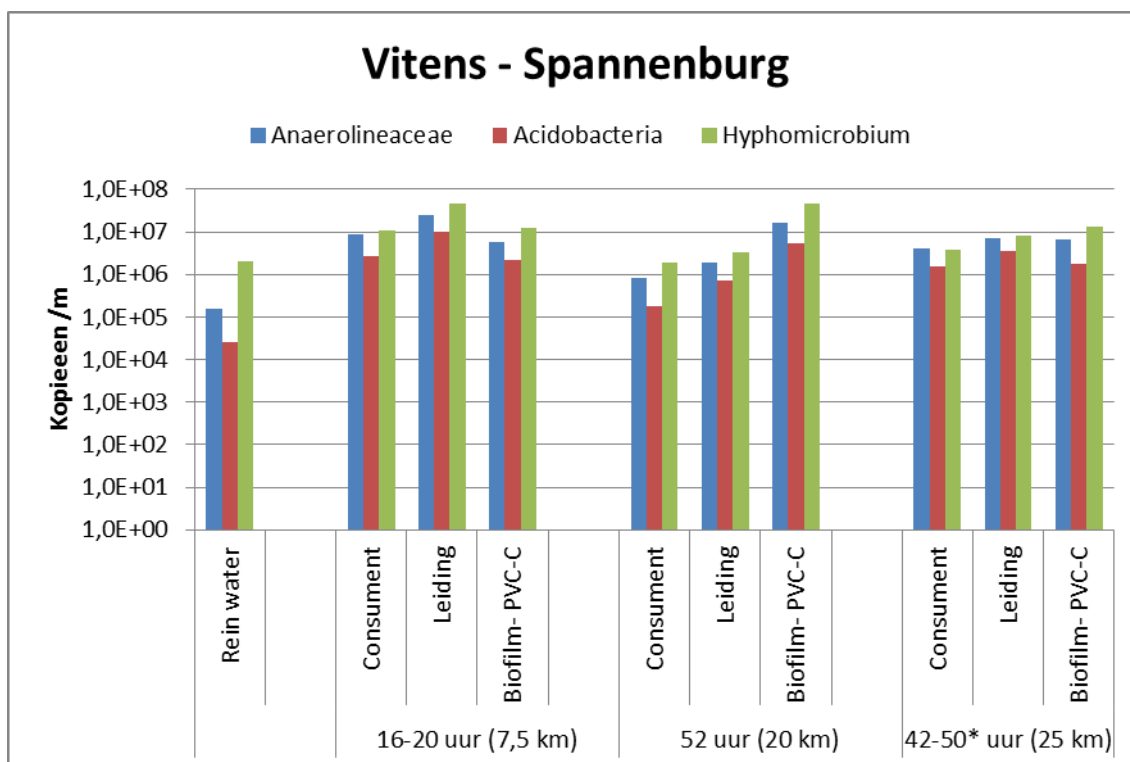
3.4.1 Aantallen van *Anaerolineaceae*, *Acidobacteria* GP3 en *Hyphomicrobium* bepaald met qPCR

Er zijn totaal 103 monsters van de oorspronkelijk genomen biofilm en watermonsters (3.1) geanalyseerd met de drie ontwikkelde qPCR methoden. Met behulp van de ijklijnen zijn het aantal genkopieën in de monsters omgerekend naar kopieën per liter. Deze genkopieën per liter zijn weer omgerekend naar kopieën per meter buis, zoals is gedaan voor de generieke microbiologische parameters (ATP, KG22 en *Aeromonas*, zie paragraaf 3.1). Op die manier kunnen de verschillende matrices (water en biofilm) onderling worden vergeleken. Figuur 15-18 laat de analyseresultaten zien van de drie verschillende qPCR's voor de verzamelde monsters uit de meetcampagnes van vier representatieve voorzieningsgebieden (Kralingen, Spannenburg, Nuland en Hanik), de overige voorzieningsgebieden zijn te vinden in bijlage VIII.

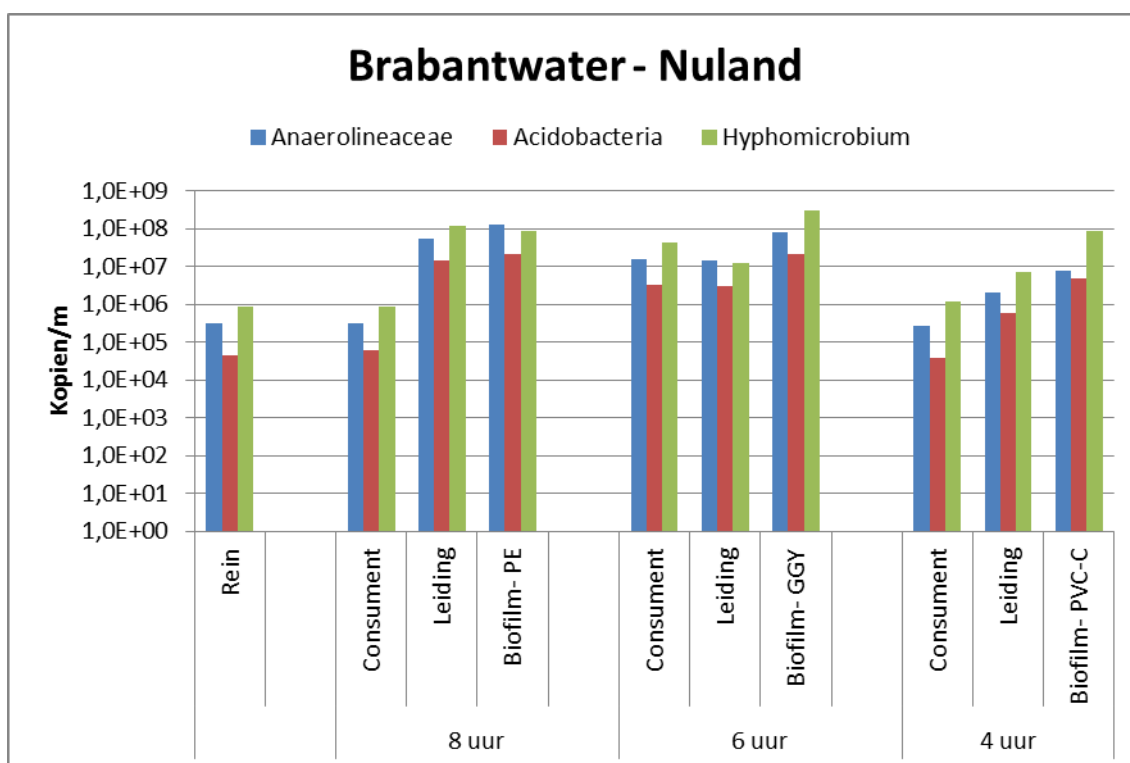
Het aantal 16S rRNA genkopieën voor *Anaerolineaceae*, *Acidobacteria* GP3 en *Hyphomicrobium* in het reinwater zijn vergelijkbaar voor alle voorzieningsgebieden. De resultaten bij voorzieningsgebieden Kralingen en Spannenburg zijn volgens verwachting, namelijk dat de aantallen *Anaerolineaceae*, *Acidobacteria* GP3 en *Hyphomicrobium* in het consumentwater en biofilm hoger ($\pm 1-2$ log) zijn dan in het reinwater. Bij pompstations Nuland en Hanik worden echter uitzonderingen waargenomen. Zo zijn locaties in het distributiesysteem bemonsterd waar de aantallen *Anaerolineaceae*, *Acidobacteria* GP3 en *Hyphomicrobium* vergelijkbaar of lager zijn dan de aantallen in het reinwater gevonden. Voor alle voorzieningsgebieden geldt dat over het algemeen de aantallen niet verder toenemen in het distributiesysteem met toenemende afstand/verblijftijd. Daarnaast wordt ook geen duidelijk effect waargenomen van verschillende materiaaltypen op de aantallen in de biofilm (Figuren 17 en 18).



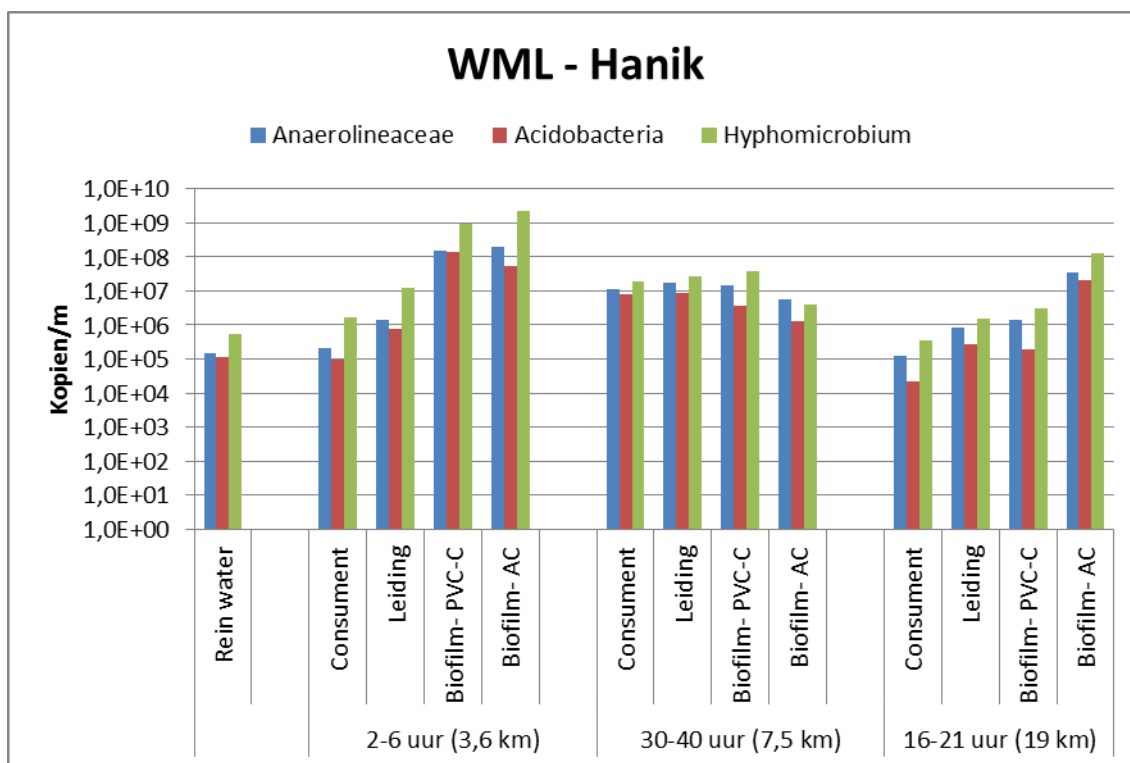
Figuur 15. Het aantal 16S rRNA genkopieën per meter buis (uitgaande van diameter van 110 mm) van Anaerolineaceae, Acidobacteria GP3 en Hyphomicrobium in het water en de biofilm bemonsterd in het voorzieningsgebied van Kralingen.



Figuur 16. Het aantal 16S rRNA genkopieën per meter buis (uitgaande van diameter van 110 mm) van Anaerolineaceae, Acidobacteria GP3 en Hyphomicrobium in het water en de biofilm bemonsterd in het voorzieningsgebied van Spannenburg.



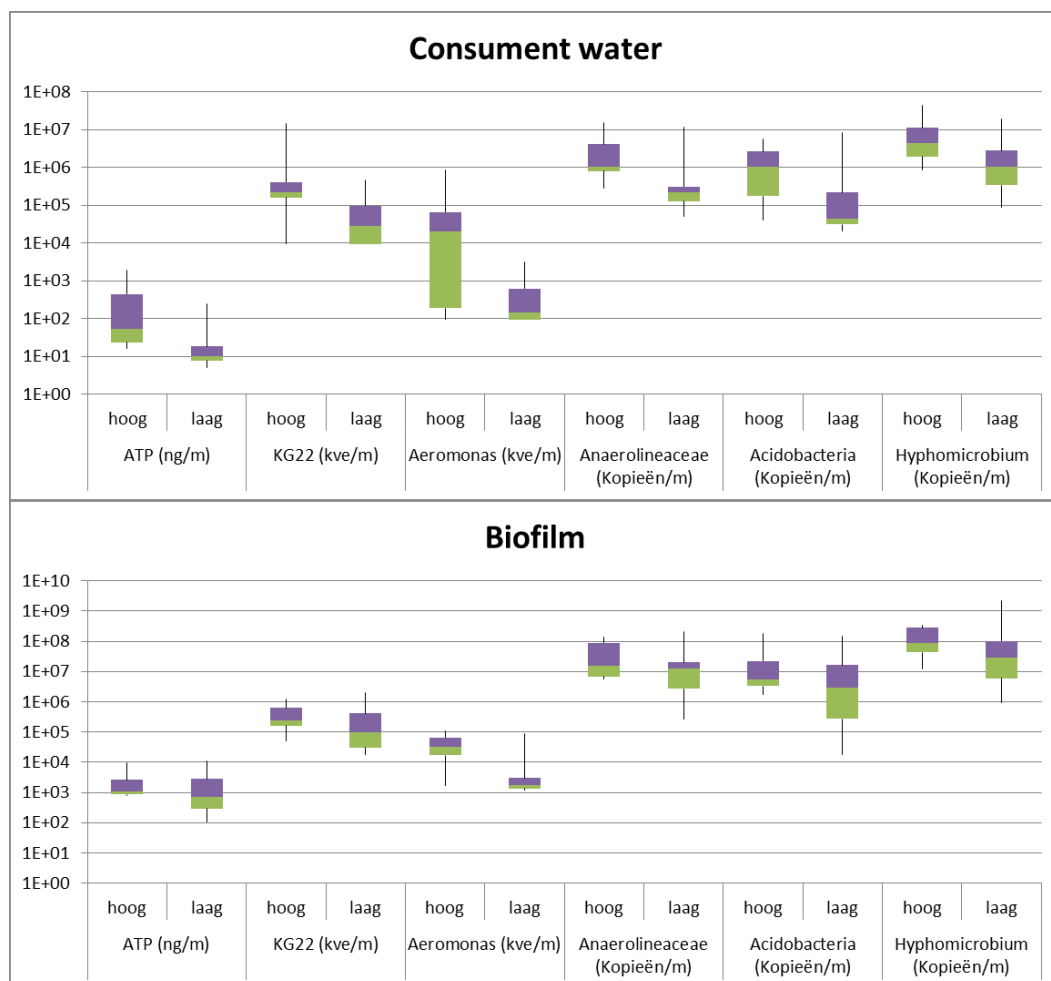
Figuur 17. Het aantal 16S rRNA genkopieën per meter buis (uitgaande van diameter van 110 mm) van Anaerolineaceae, Acidobacteria GP3 en Hyphomicrobium in het water en de biofilm bemonsterd in het voorzieningsgebied van Nuland.



Figuur 18. Het aantal 16S rRNA genkopieën per meter buis (uitgaande van diameter van 110 mm) van Anaerolineaceae, Acidobacteria GP3 en Hyphomicrobium in het water en de biofilm bemonsterd in het voorzieningsgebied van Hanik.

3.4.2 Vergelijking microbiologische parameters

Er is ook onderzocht of de algemene microbiologische parameters (ATP, KG22, *Aeromonas*) en drie mogelijke indicatoren (*Anaerolineaceae*, *Acidobacteria* GP3 en *Hyphomicrobium*) hoger zijn in voorzieningsgebieden waar de biologische stabiliteitsparameters van het reinwater relatief hoog zijn (Kralingen, Spannenburg en Nuland) dan in voorzieningsgebieden waar de biologische stabiliteitsparameters van het reinwater relatief laag zijn (Katwijk, Hanik, Scheveningen en Amersfoortseweg). De resultaten van de voorzieningsgebieden met een hoge nagroei (n=3) en voorzieningsgebieden met een lage groei (n=4) van alle parameters in het consumentwater en biofilm zijn samengevat in een boxplot (Figuur 19). Voor iedere parameter geldt dat de mediaan van concentratie of aantallen in het water bemonsterd na doorstroming aan de kraan of in de biofilm in het distributiesysteem hoger zijn bij de pompstations waar het reinwater minder biologisch stabiel is dan bij pompstations waar het water biologisch stabiel is. Voor een aantal parameters (*Anaerolineaceae* hoog met consumentwater en biofilm, *Anaerolineaceae* laag met ATP laag (consumentwater) en biofilm, *Acidobacteria* hoog met ATP laag (consumentwater) en ATP laag (biofilm), *Acidobacteria* laag met ATP laag (biofilm), *Hyphomicrobium* hoog met consumentwater en biofilm en *Hyphomicrobium* laag met consumentwater en biofilm) waren de verschillen ook statistisch significant met p-waarde kleiner dan 0,05 (Kruskal-Wallis).



Figuur 19 Boxplots van ATP, KG22, *Aeromonas*, *Anaerolineaceae*, *Acidobacteria* GP3 en *Hyphomicrobium* in water bemonsterd naar doorstroming aan de kraan (consument water) en biofilm bemonsterd uit het

distributiesysteem bij voorzieningsgebieden met relatief lage biologische stabiliteit ($n=3$) en hoge biologische stabiliteit ($n=4$).

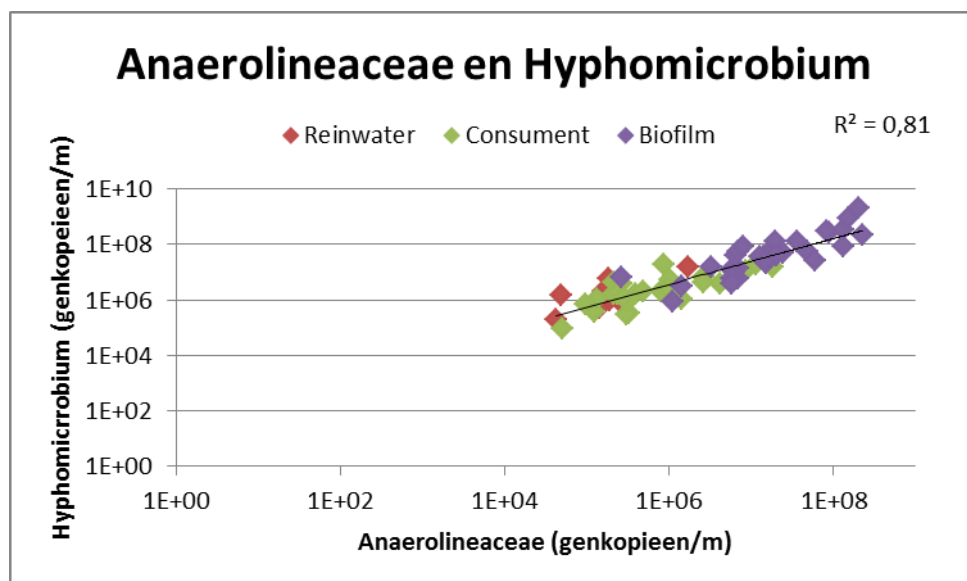
3.4.3 Correlaties tussen de verschillende microbiologische parameters

De correlaties tussen de verschillende microbiologische parameters zijn bepaald en weergegeven in tabel 6. Deze correlaties zijn bepaald met alle verzamelde waarden, dus voor consumentenwater, reinwater en biofilm samen. De drie nieuw ontwikkelde indicatoren zijn significant gecorreleerd met ATP, waarbij de R^2 varieert tussen de 0,58 en 0,70 (Tabel 6). Dus dat geeft aan dat de nieuw ontwikkelde indicatoren gerelateerd zijn aan de hoeveelheid actieve biomassa, waar ATP een maat voor is. Daarnaast zijn de drie nieuw ontwikkelde indicatoren onderling significant gecorreleerd en dit verband is relatief sterk ($R^2 > 0,70$). Ter illustratie is in Figuur 20 de correlatie tussen de indicatoren Anaerolineaceae en Hyphomicrobium uitgezet (de overige correlaties staan in bijlage IX). Uit deze figuur volgt tevens dat deze correlatie niet wordt beïnvloed door de onderzochte matrix (water versus biofilm). Tot slot is het verband tussen de wettelijke parameters voor nagroei (KG22 en *Aeromonas*) met de drie nieuwe indicatoren zwak ($R^2 < 0,4$), wat volgens verwachting is omdat KG22 en *Aeromonas* minder goede indicatoren voor biofilm op de buiswand lijken te zijn.

TABEL 6. DE R^2 VAN DE CORRELATIES VAN DE VERSCHILLENDE PARAMETERS IN DE REINWATER, CONSUMENTWATER EN BIOFILM MONSTERS.

	ATP	KG22	<i>Aeromonas</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Acidobacteria</i>	<i>Hyphomicrobium</i>
ATP	x					
KG22	0,29	x				
<i>Aeromonas</i>	0,48	0,35	x			
<i>Anaerolineaceae</i>	<u>0,70</u>	0,22	0,38	x		
<i>Acidobacteria</i> GP3	0,58	0,20	0,30	<u>0,82</u>	x	
<i>Hyphomicrobium</i>	0,60	0,12	0,23	<u>0,81</u>	<u>0,72</u>	x

Alles R^2 -waarden boven 0,70 zijn onderstreept.



Figuur 20. Correlatie tussen de twee indicatoren Anaerolineaceae en Hyphomicrobium, de verschillende monstertypen (reinwater, consumentenwater en biofilm hebben een andere kleur gekregen).

3.4.4 Discussie

De aantallen van de drie indicatororganismen zijn hoger in het voorzieningsgebied dan in het reinwater, wat betekent dat de aantallen dus toenemen in het voorzieningsgebied. Maar de aantallen nemen niet toe in het drinkwater met afstand/verblijftijd. Dit toont aan dat deze indicatororganismen niet in staat zijn zich te vermenigvuldigen in het water tijdens verdere transport van het water in het distributiesysteem. De resultaten laten wel zien dat ze wel aanwezig zijn in de biofilm door het hele voorzieningsgebied. Dus dat betekent dat hoewel het water langs de biofilm stroomt er niet meer van deze indicatororganismen in het water terecht komt, dus uitwisseling tussen biofilm en water lijkt dusdanig laag dat de aantallen van deze indicatoren in het water niet toenemen. De aantallen van deze drie indicatororganismen in het drinkwater zijn hoger in een voorzieningsgebied waar de aantallen van deze organismen ook hoger zijn in de biofilm. De ATP-concentratie in de biofilms van deze voorzieningsgebieden met hogere aantallen van drie indicatororganismen lijkt ook enigszins verhoogd te zijn (maar niet significant), dus dit kan er op duiden dat ze een indicatie vormen voor de biofilmhoeveelheid. Ten slotte zijn er echter ook uitzonderingen aangetroffen; Nuland, Hanik en Scheveningen. Het lijkt er dus op dat deze parameters mogelijke een globale indicator zijn voor biofilmvorming en -hoeveelheid in het distributiesysteem, maar aanvullend onderzoek (bij meer locaties) is nodig om hier betrouwbaardere uitspraken over te kunnen doen. Daarnaast is het zinvol om te achterhalen in hoeverre deze nieuwe indicatororganismen een relatie hebben met (i) opportunistische ziekteverwekkers, zoals *L. pneumophila* en *P. aeruginosa*, (ii) micro-organismen die de geur/smaak van het drinkwater negatief beïnvloeden en (iii) ongewervelde dieren.

4 Conclusies en aanbevelingen

4.1 Conclusies

Op basis van de resultaten kan het volgende worden geconcludeerd:

- De bacteriegroepen *Anaerolineaceae*, *Acidobacteria* GP3 en *Hyphomicrobium* zijn geïdentificeerd als mogelijke indicatororganismen voor biofilmvorming en -hoeveelheid in het distributiesysteem.
- Er zijn goedwerkende qPCR-analyses voor *Anaerolineaceae*, *Acidobacteria* GP3 en *Hyphomicrobium* beschikbaar gemaakt.
- De bacteriegroepen *Anaerolineaceae*, *Acidobacteria* GP3 en *Hyphomicrobium* zijn in bijna alle reinwatermonsters, drinkwatermonsters bemonsterd aan de kraan van consumenten en biofilmmonsters uit het distributiesysteem waargenomen, dus deze drie bacteriegroepen lijken algemeen voor te komen in het drinkwaterdistributiesysteem.
- De aantallen van deze drie indicatororganismen zijn hoger in het gedistribueerde drinkwater dan in het reinwater, maar de aantallen nemen niet toe met toenemende afstand/verblijftijd, dus deze organismen lijken niet in staat zich te vermeerderen in het drinkwater en hopen zich ook niet op in het drinkwater tijdens distributie door uitwisseling van biofilm naar het drinkwater.
- In voorzieningsgebieden waar het drinkwater minder biologisch stabiel is zijn deze drie indicatororganismen in het gedistribueerde drinkwater en in de biofilm op de buiswand van het distributiesysteem meestal hoger dan in voorzieningsgebieden waar het drinkwater biologisch stabiel is. Dus deze drie indicatororganismen zijn daarmee mogelijk een globale indicator voor biofilmvorming of -hoeveelheid, maar meer analyses zijn nodig voordat deze conclusie betrouwbaar kan worden getrokken.
- Door de waargenomen uitzondering (bijvoorbeeld bij pompstation Nuland) lijken deze drie indicatoren vooralsnog niet als universele indicator voor biofilmvorming en -hoeveelheid in het Nederlandse drinkwater distributiesysteem gebruikt te kunnen worden.

4.2 Aanbevelingen

Op basis van de resultaten doen we de volgende aanbevelingen:

- Meer voorzieningsgebieden analyseren, om zo een grotere database te creëren, dit levert een beter inzicht op of bijv. voorzieningsgebied Nuland een uitzondering is of niet.
- Binnen één distributiesysteem een grote hoeveelheid watermonsters analyseren voor de aantallen van de drie indicatororganismen, zodat meer duidelijkheid wordt verkregen over de variatie in aantallen van de drie indicator bacteriën. Naast deze indicatororganismen ook opportunistische ziekteverwekkers analyseren en (micro-)organismen die de esthetische kwaliteit van het water beïnvloeden, zodat duidelijk wordt of *Anaerolineaceae*, *Acidobacteria* GP3 en *Hyphomicrobium* een indicatie vormen voor problemen met dat soort organismen.
- Het onderzoek uitbreiden naar sediment, zodat kan worden vastgesteld waar deze drie indicatororganismen hun belangrijkste niche in het drinkwaterdistributiesysteem hebben.

- Meer onderzoek uitvoeren, onder gecontroleerde condities in lab, naar effect van verblijftijd op deze drie indicatororganismen in drinkwater en biofilm. Dit kan bijvoorbeeld worden uitgevoerd door verschillende reinwatertypen onder statische condities (testen voor groei van deze indicatororganismen in water) en dynamische condities (testen voor groei in biofilm en uitwisseling met water).
- Geen bemonsteringen voor microbiologische parameters uitvoeren aan de standpijp, om de microbiologische drinkwaterkwaliteit te bepalen. Hiervoor kunnen aanboringen of monsterkast worden gebruikt. Dit omdat tijdens bemonstering met een standpijp, niet kan worden uitgesloten dat er ook sediment in het watermonster terecht komt. Omdat sediment een andere bacteriesamenstelling heeft dan drinkwater heeft de invloed op de resultaten.

5 Referenties

- Liu, R., Zhu, J., Yu, Z., Joshi, D., Zhang, H., Lin, W., & Yang, M. (2014). Molecular analysis of long-term biofilm formation on PVC and cast iron surfaces in drinking water distribution system. *Journal of Environmental Sciences*, 26(4), 865-874.
- van der Wielen, P. W. J. J. (2013). Micro-organismen in sedimentfracties en op de buiswand in het voorzieningsgebied van Kamerik (Vol. KWR 2013.019). Nieuwegein: KWR.
- van der Wielen, P. W. J. J. (2014). Effect van waterkwaliteit, seizoen, drinkwaterinstallatie en verblijftijd/ afstand op opportunistische pathogenen in drinkwater (Vol. BTO 2014.015, pp. 85). Nieuwegein: KWR.
- van der Wielen, P.W.J.J (2017) Invloed van waterkwaliteit, adres en tijdstip op KG22 en *Aeromonas* als wettelijke parameters nagroei. (Vol. BTO 2017.028).
- van der Wielen, P.W.J.J. (2018) Aandachtswaarden nieuwe methoden biologische stabiliteit. (Vol. BTO 2018).

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.

Afwijkingen van bemonsteringsprotocol

Vitens-Culemborg

Op de begin locatie van voorzieningsgebied Culemborg is geen leiding water monster genomen. Het water bij de consument thuis, is genomen na de leiding uitname. Ook op de midden locatie is het water monster bij de consument thuis genomen na leidinguitname. De leiding uitgenomen op de middenlocatie is zeer waarschijnlijk gecontamineerd met het water uit het gat en ook regende het tijdens de uitname.

WMD-Zuidwolde

Alle leidingen hebben een doorsnede van 50mm.

Oasen-De Laak

Bij het voorzieningsgebied De Laak zijn de leidingen van de midden en veraf locatie een week eerder genomen dan de watermonsters. De leiding op de begin locatie is in contact gekomen met het grondwater.

Brabantwater – Luykgestel

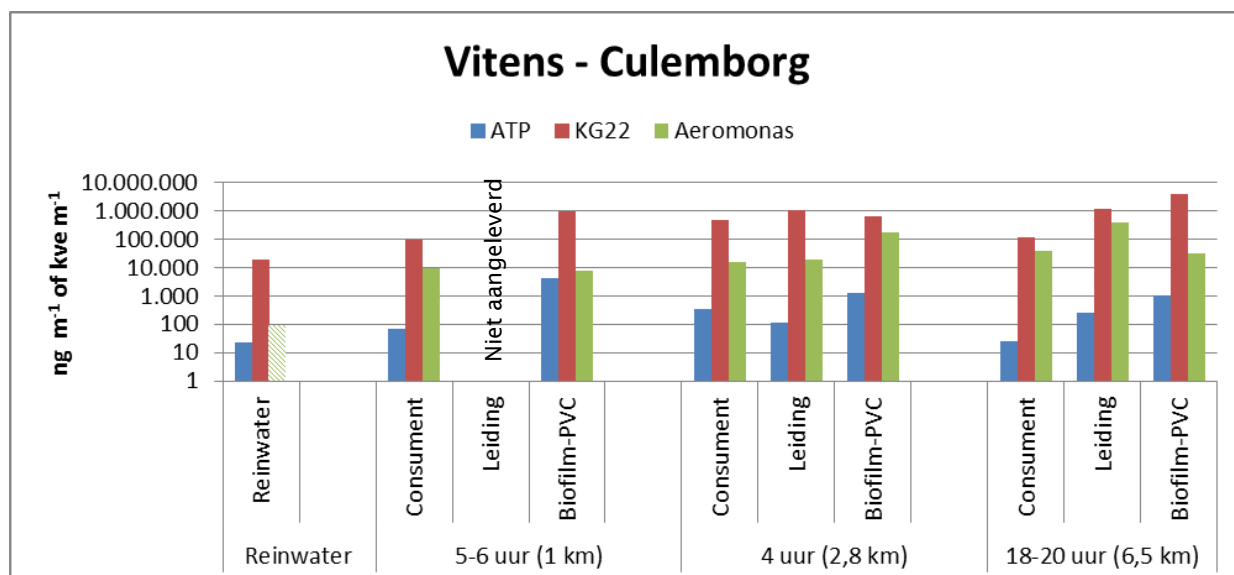
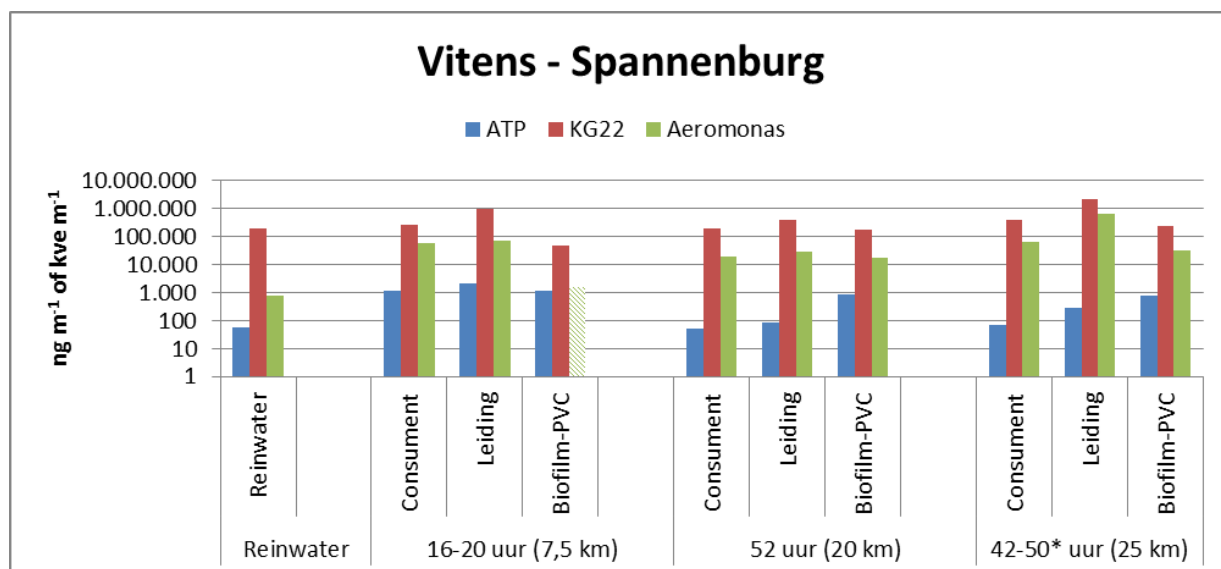
De begin locatie heeft een leiding met een doorsnede van 63mm.

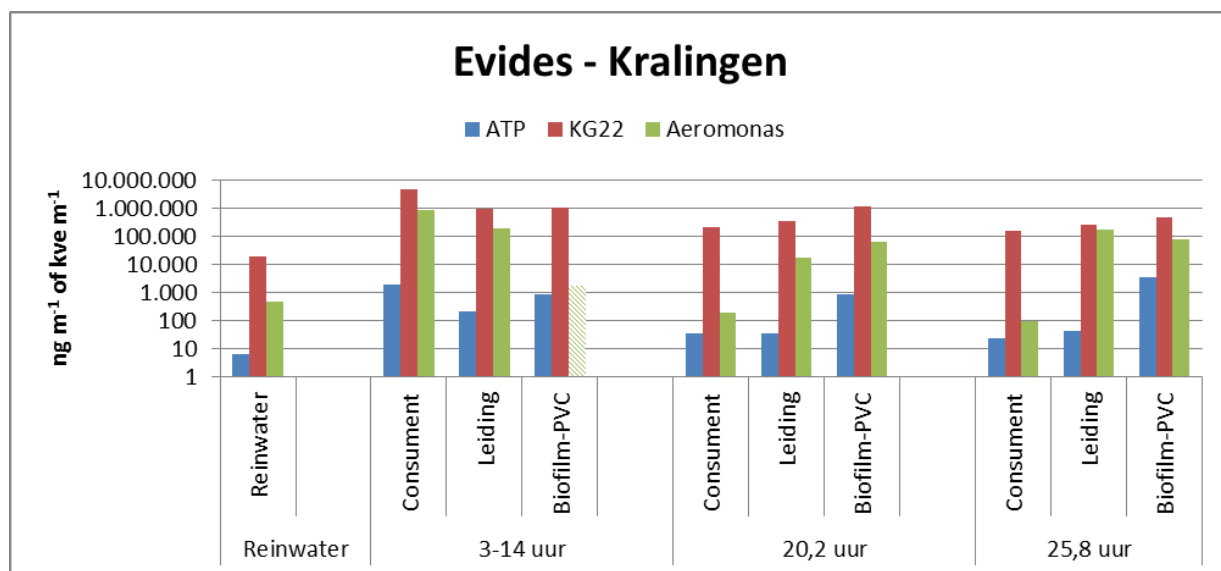
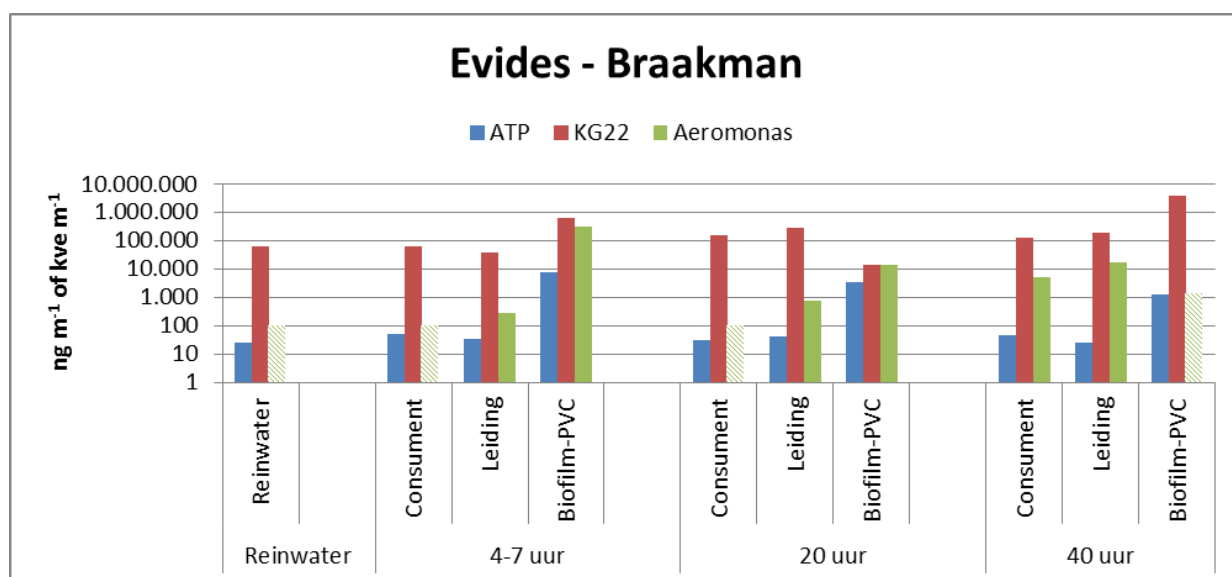
Vitens-Amersfoortseweg

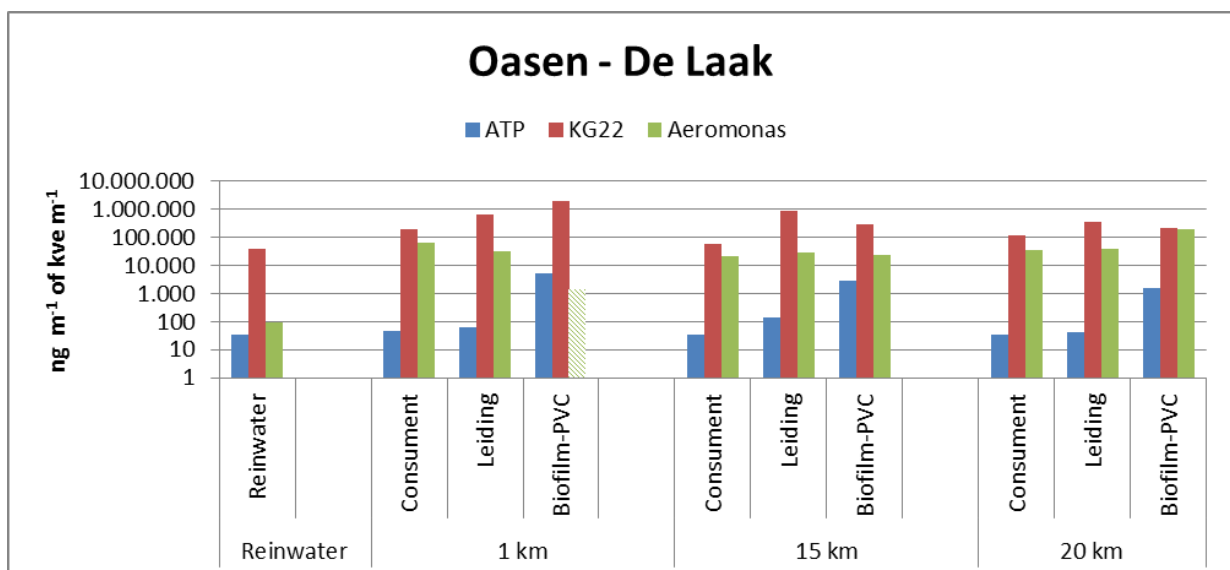
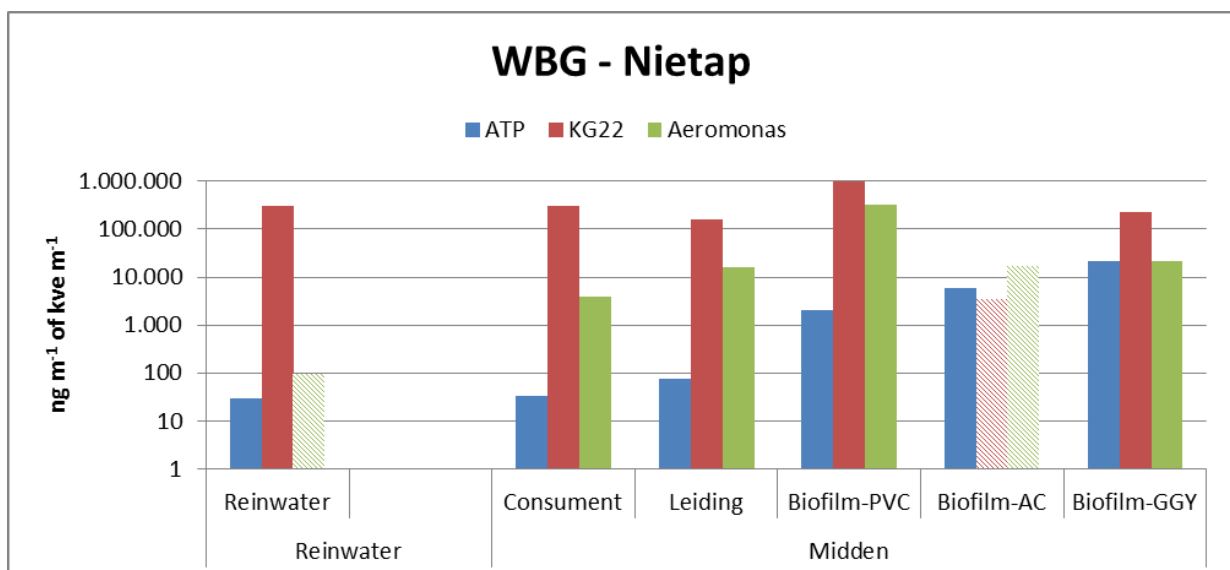
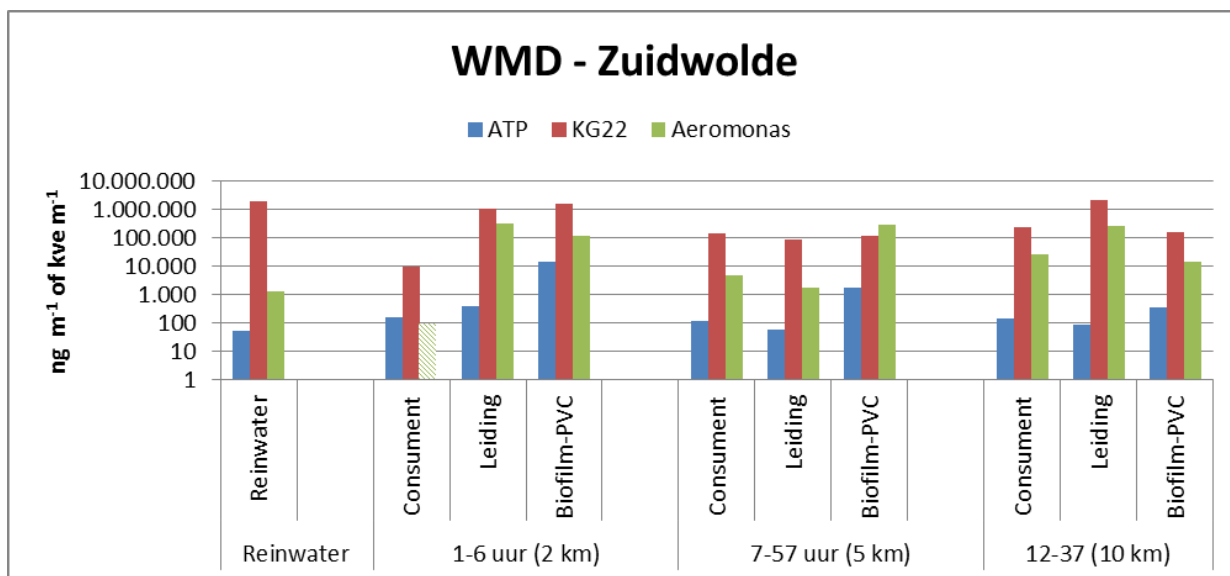
In voorzieningsgebied Amersfoortseweg zijn de materialen PVC, asbest cement en gietijzer uitgenomen. De leidingen zijn allemaal in dezelfde straat genomen. De leiding asbestcement is in het grondwater gevallen. Daarnaast er is geen water van de leiding van asbest cement genomen omdat die samen gaat met die voor gietijzer.

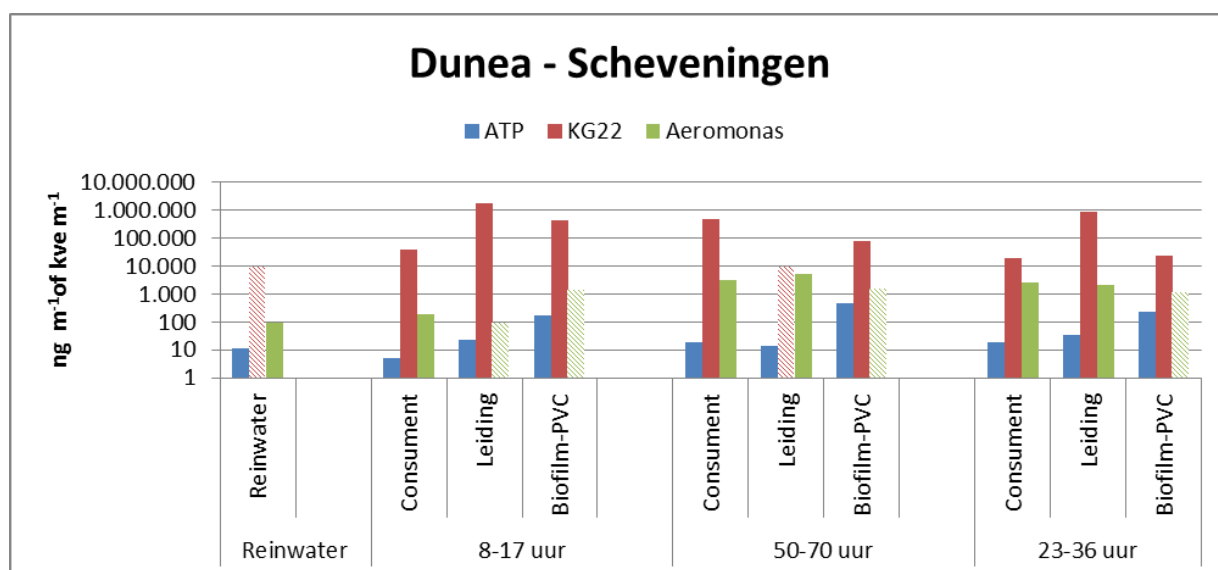
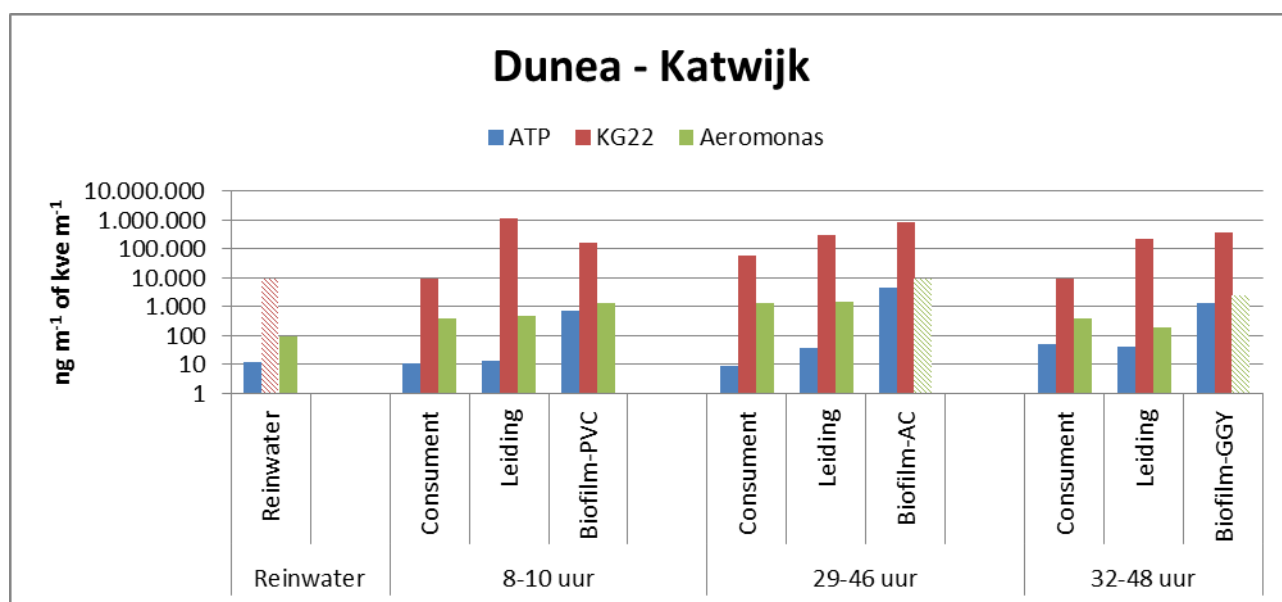
Bijlage II Resultaten ATP, KG22 en Aeromonas overige voorzieningsgebieden.

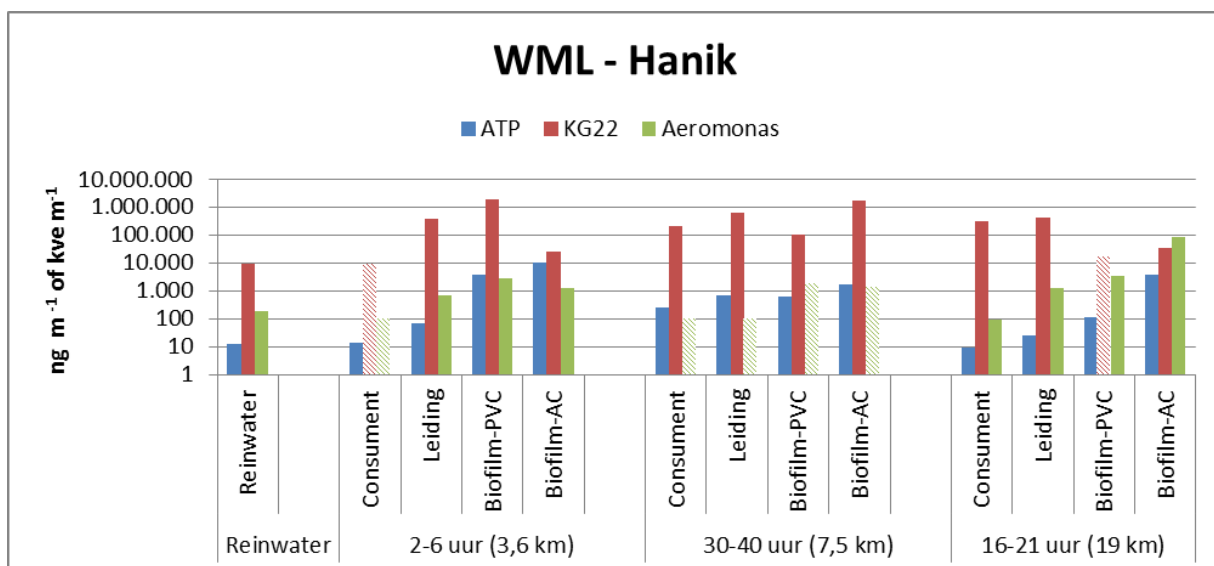
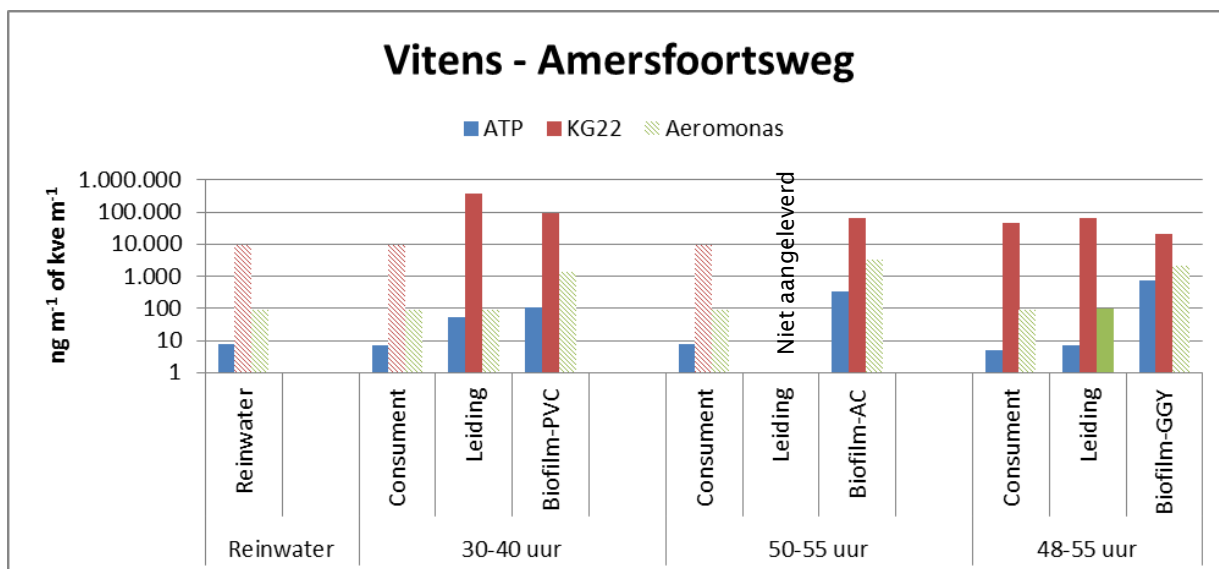
De schuin gestreepte staven geven een detectielimiet aan.

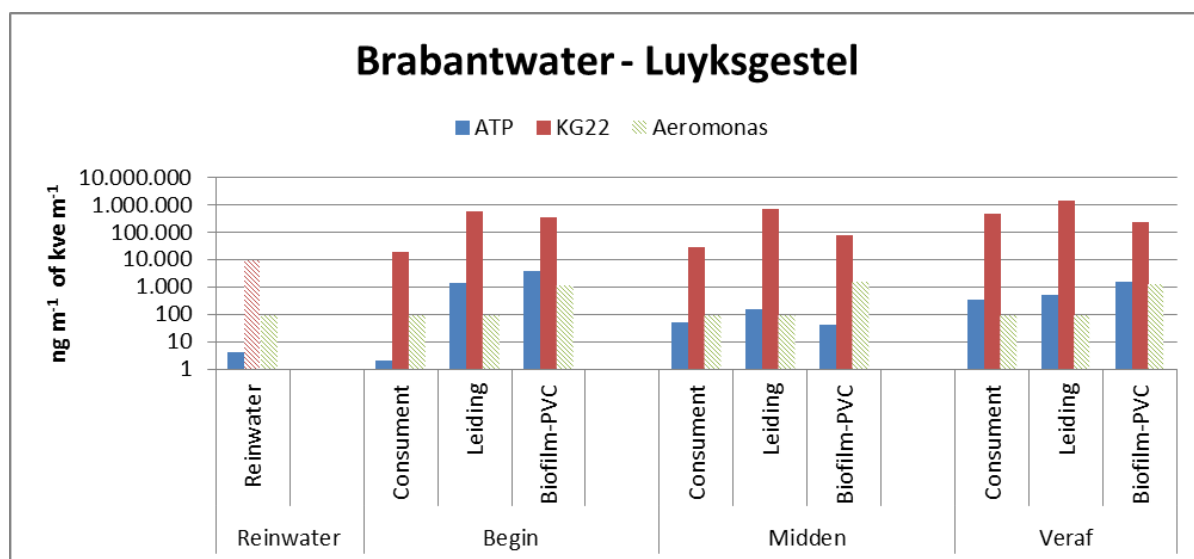
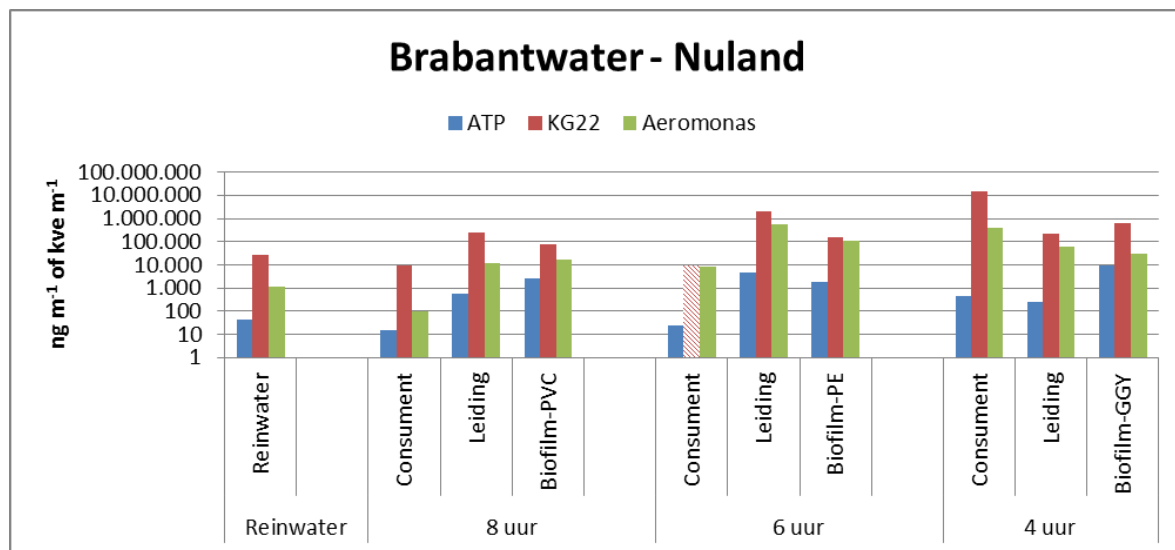


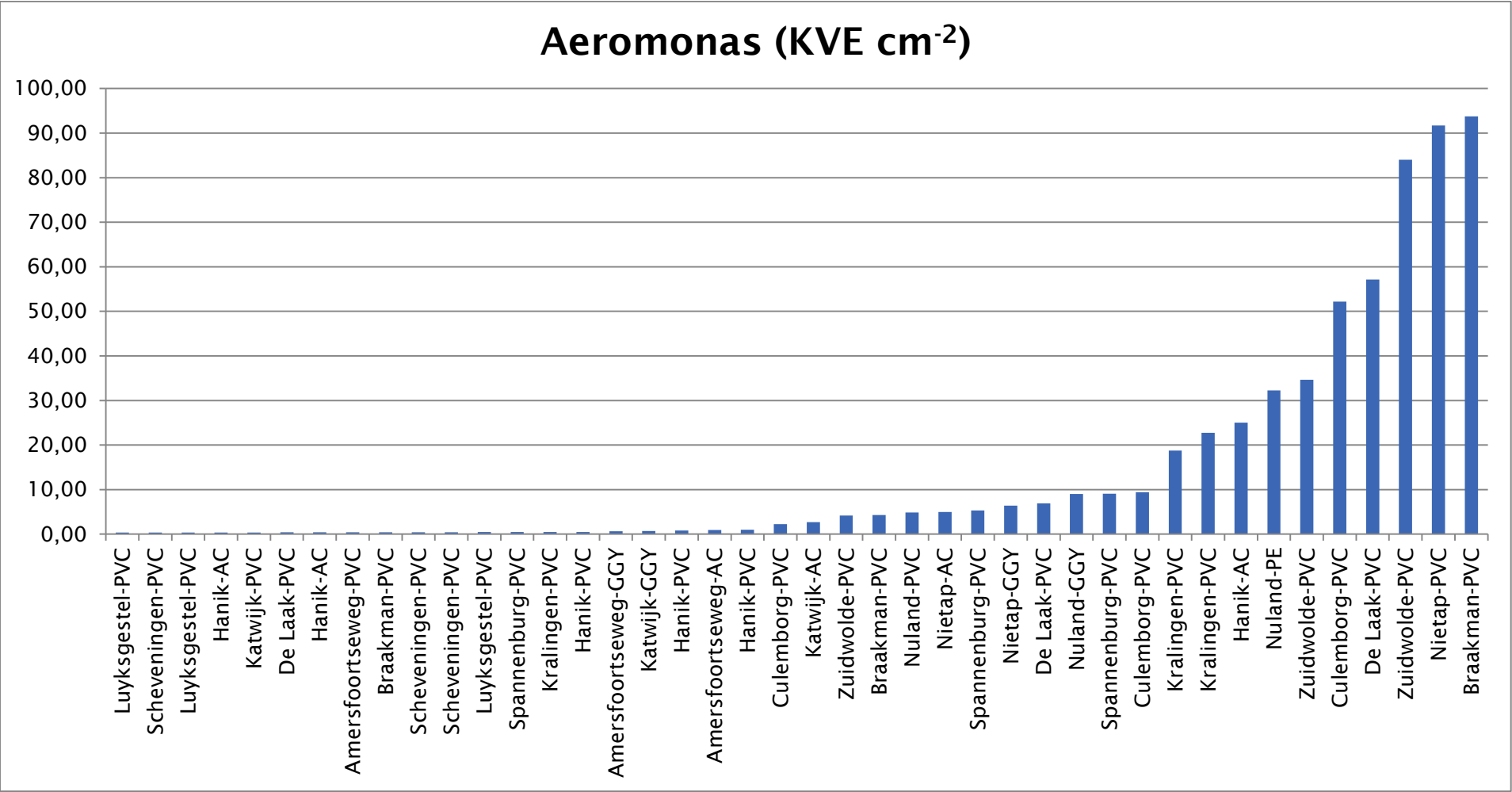


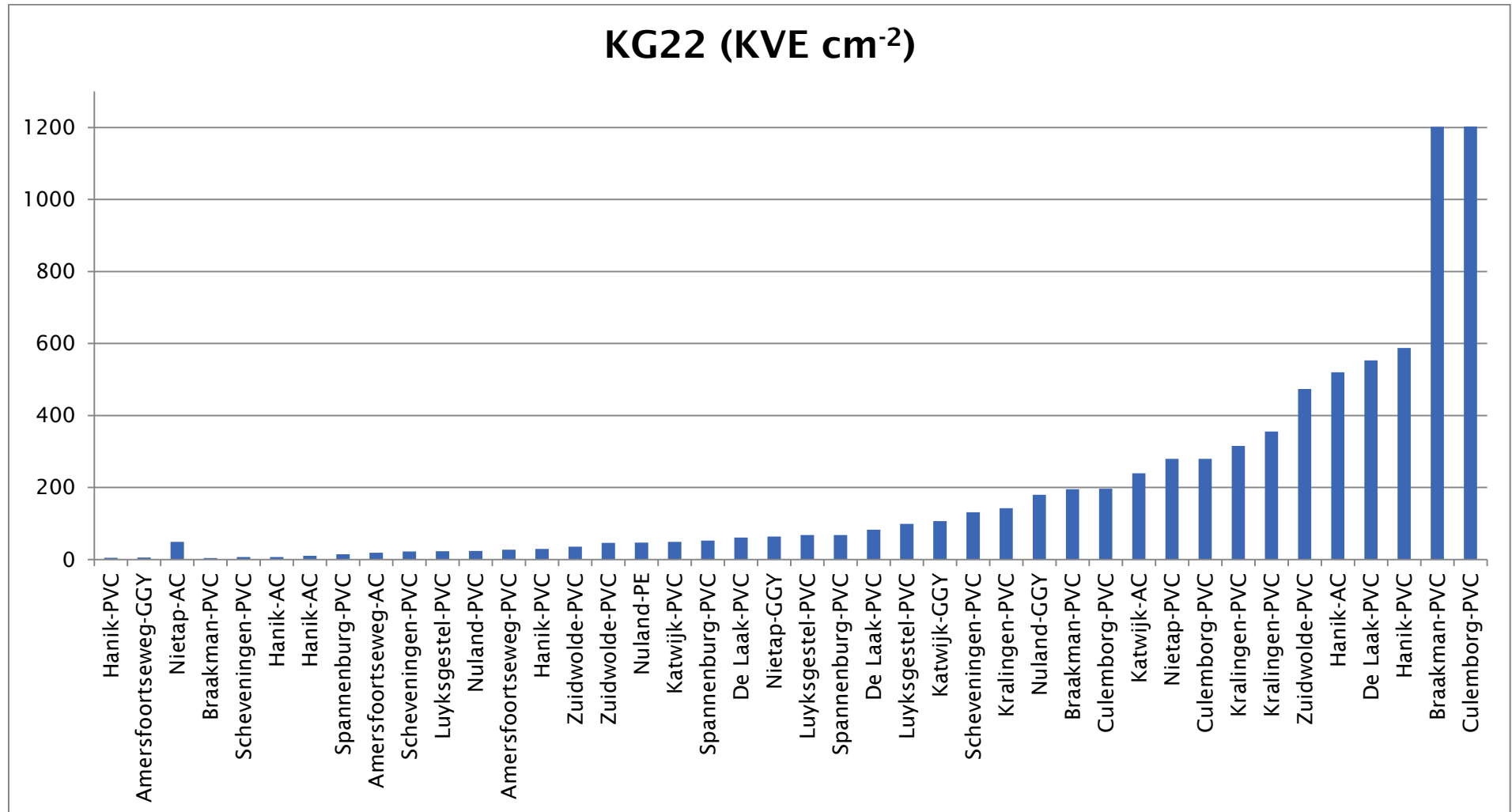






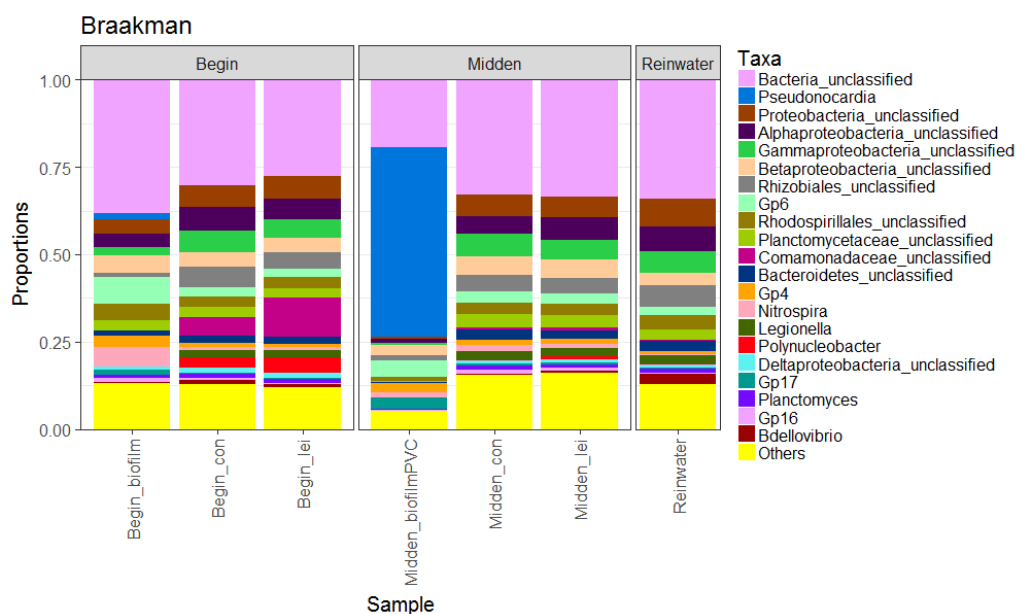
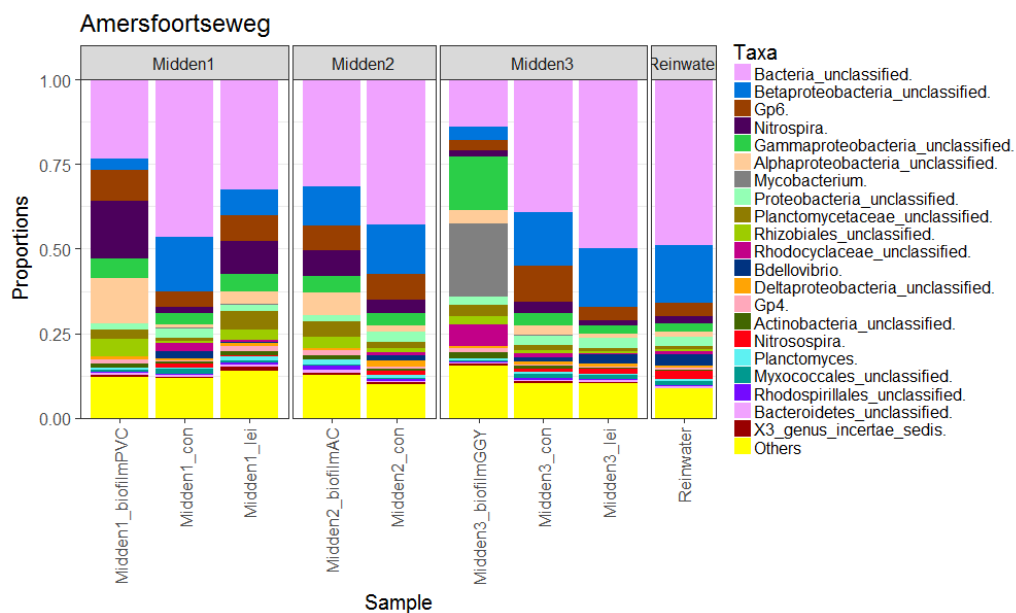


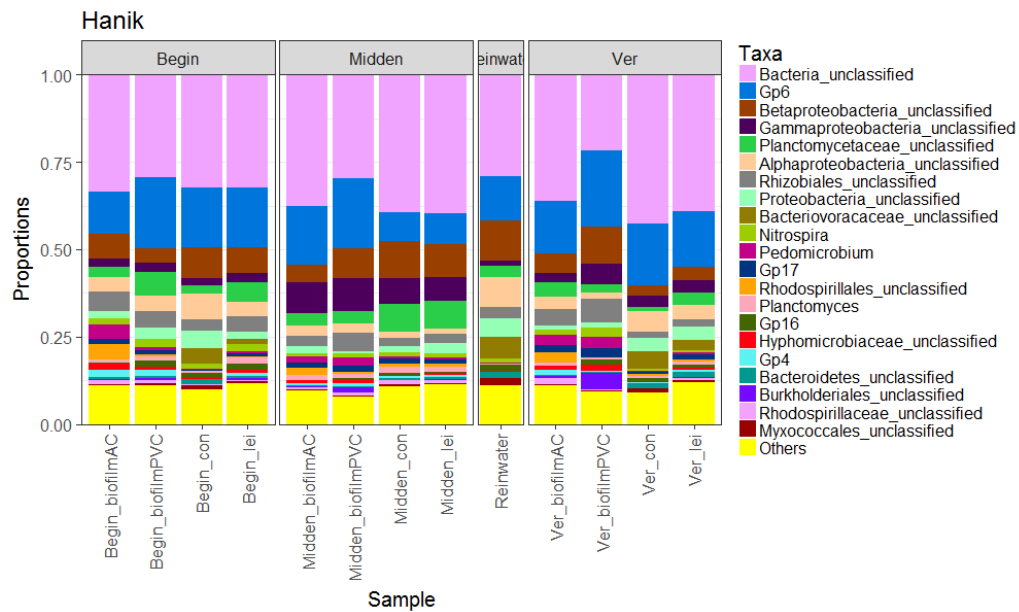
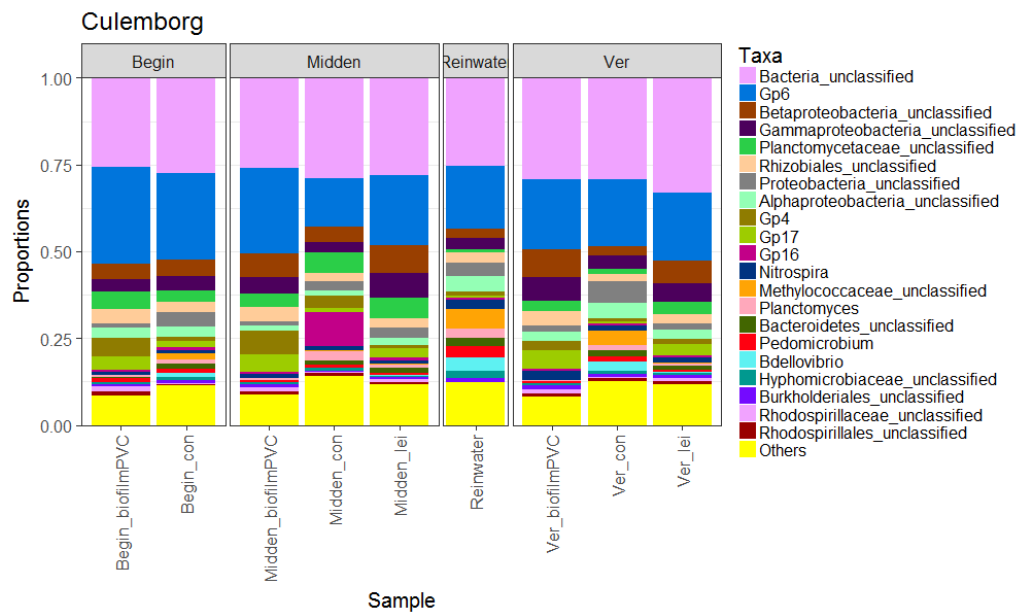


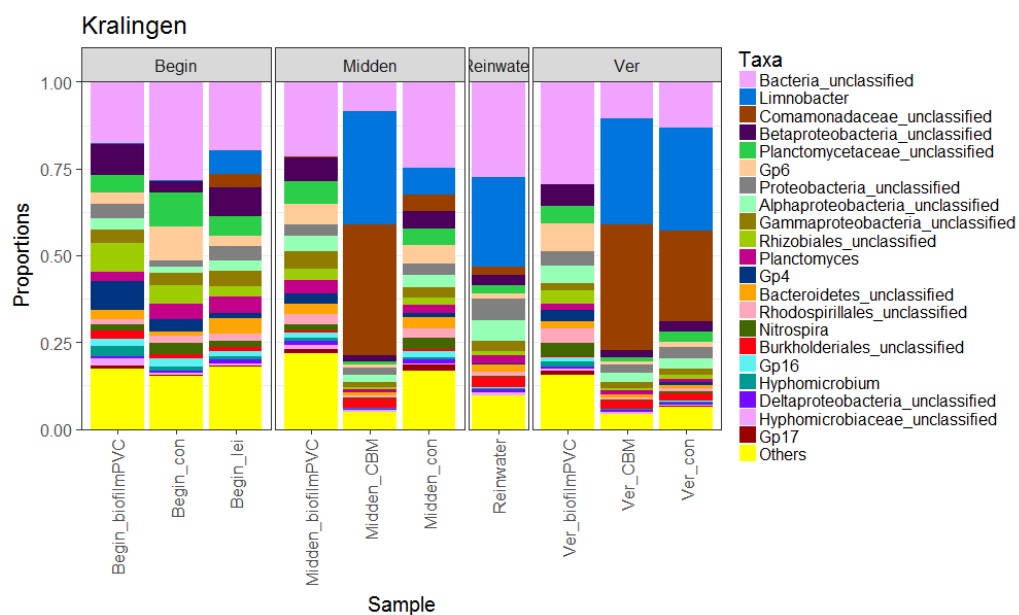
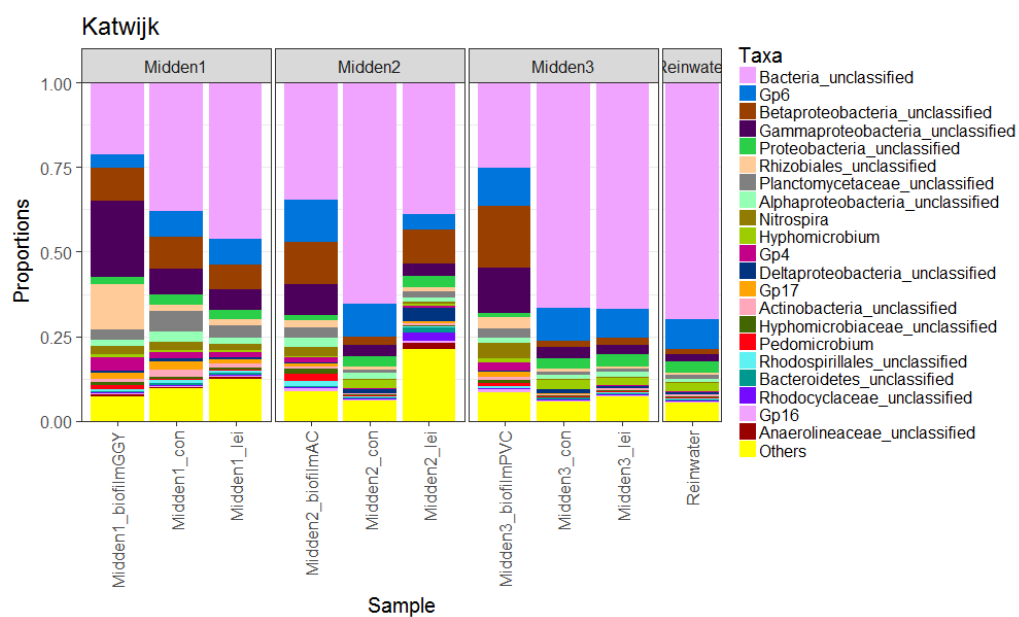


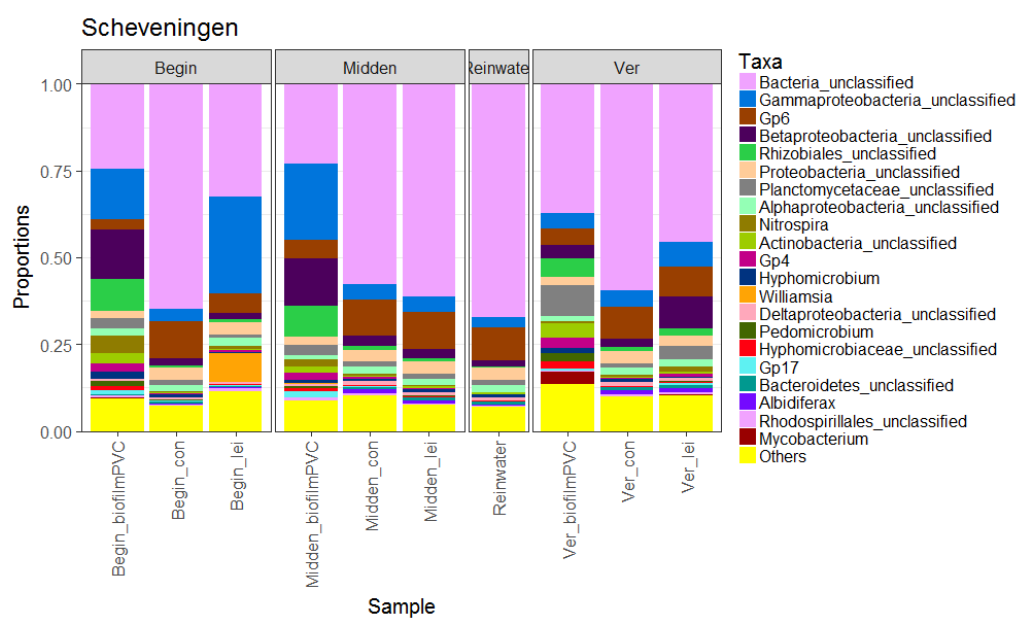
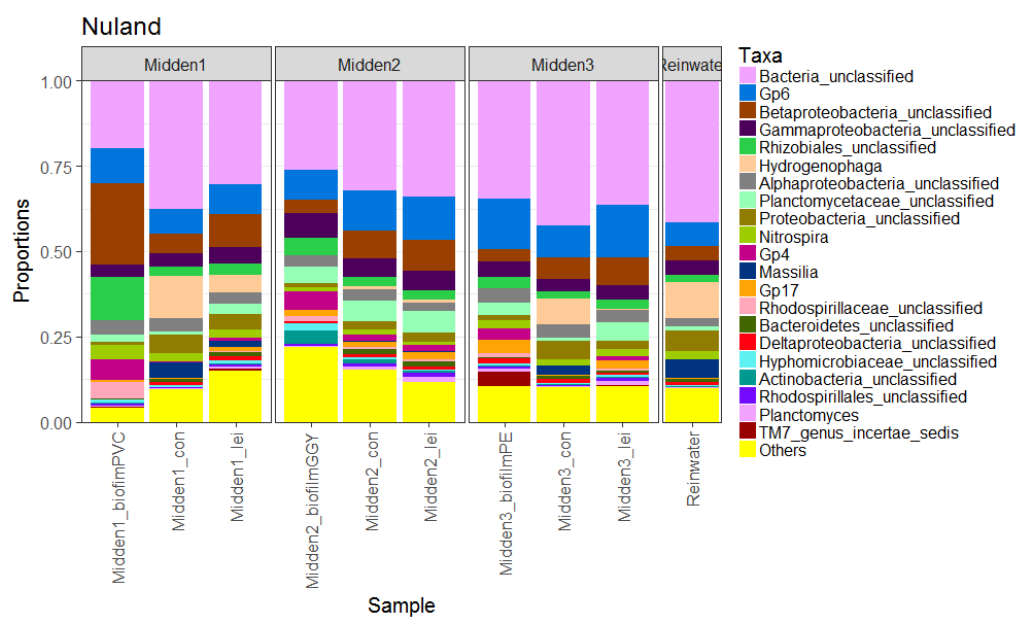
Bijlage III Resultaten NGS

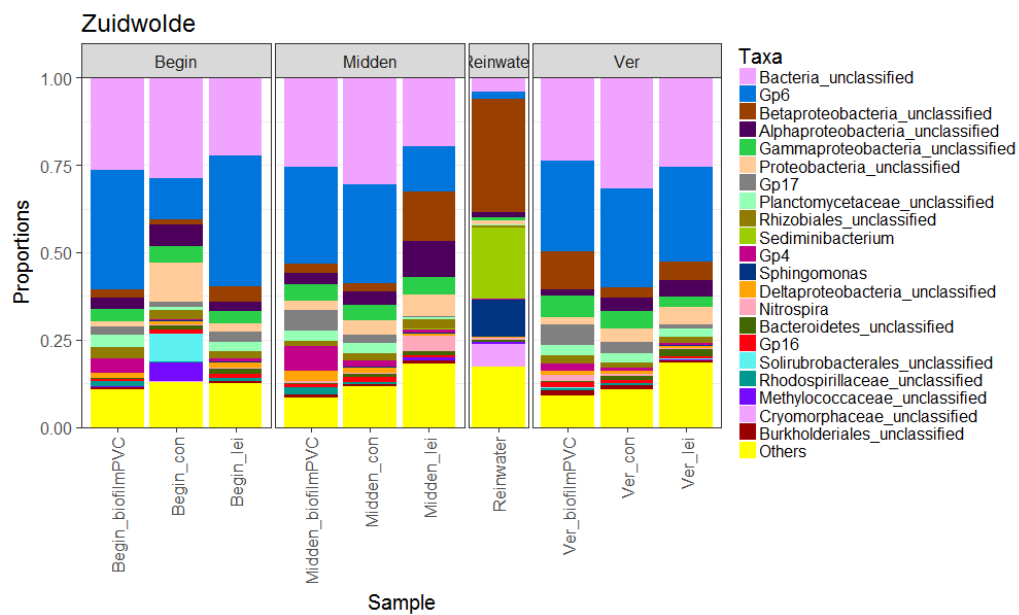
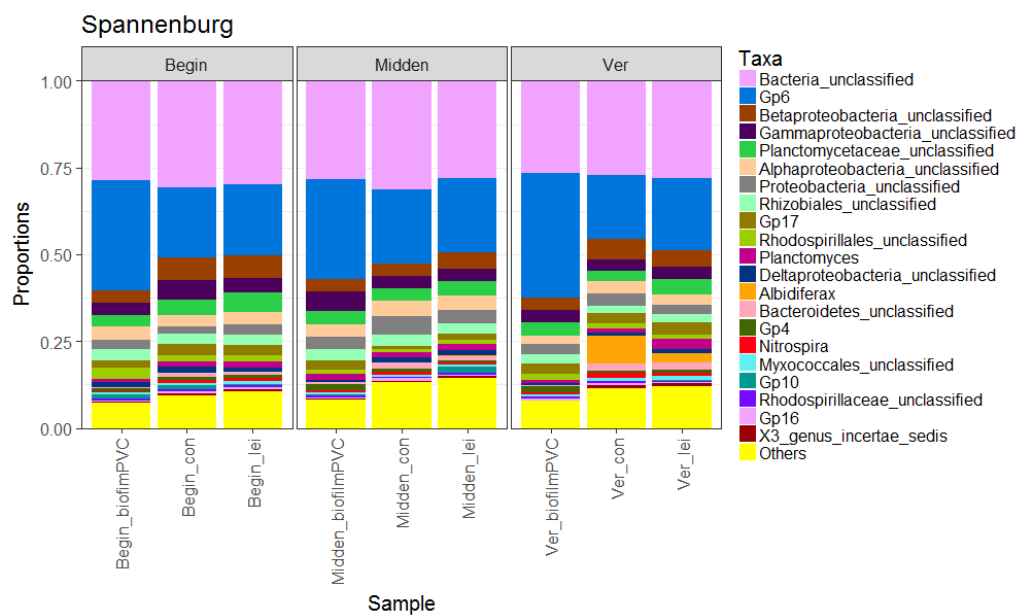
Top 21 van de aanwezige bacteriën per voorzieningsgebied

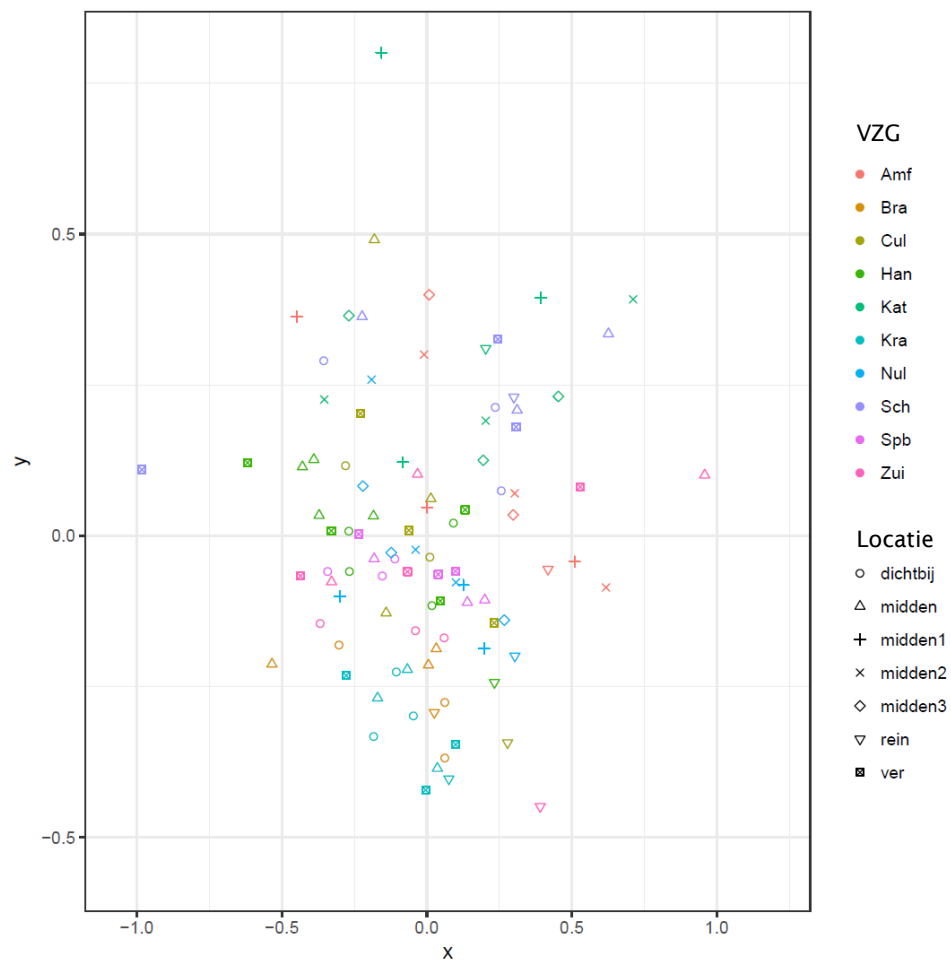






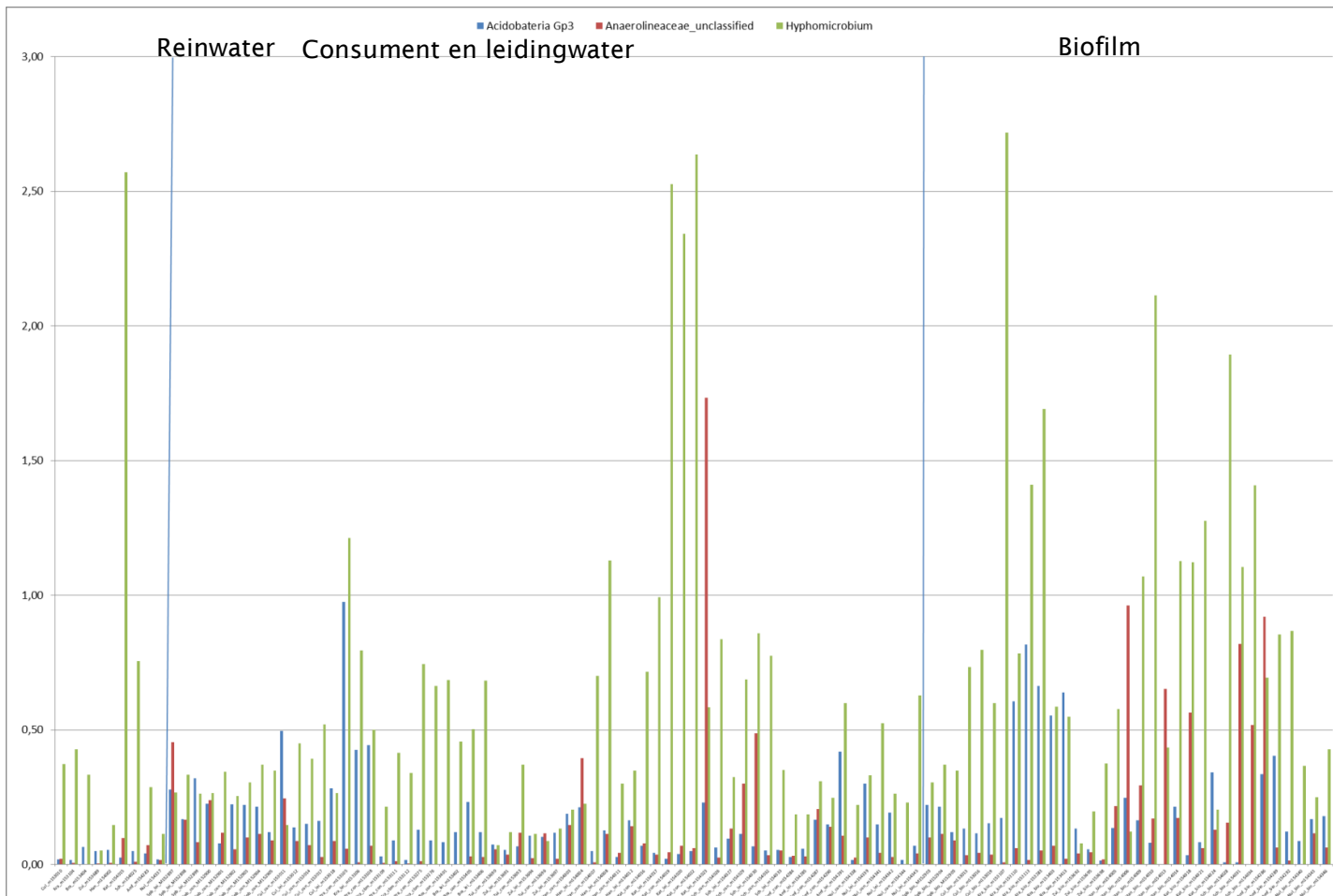






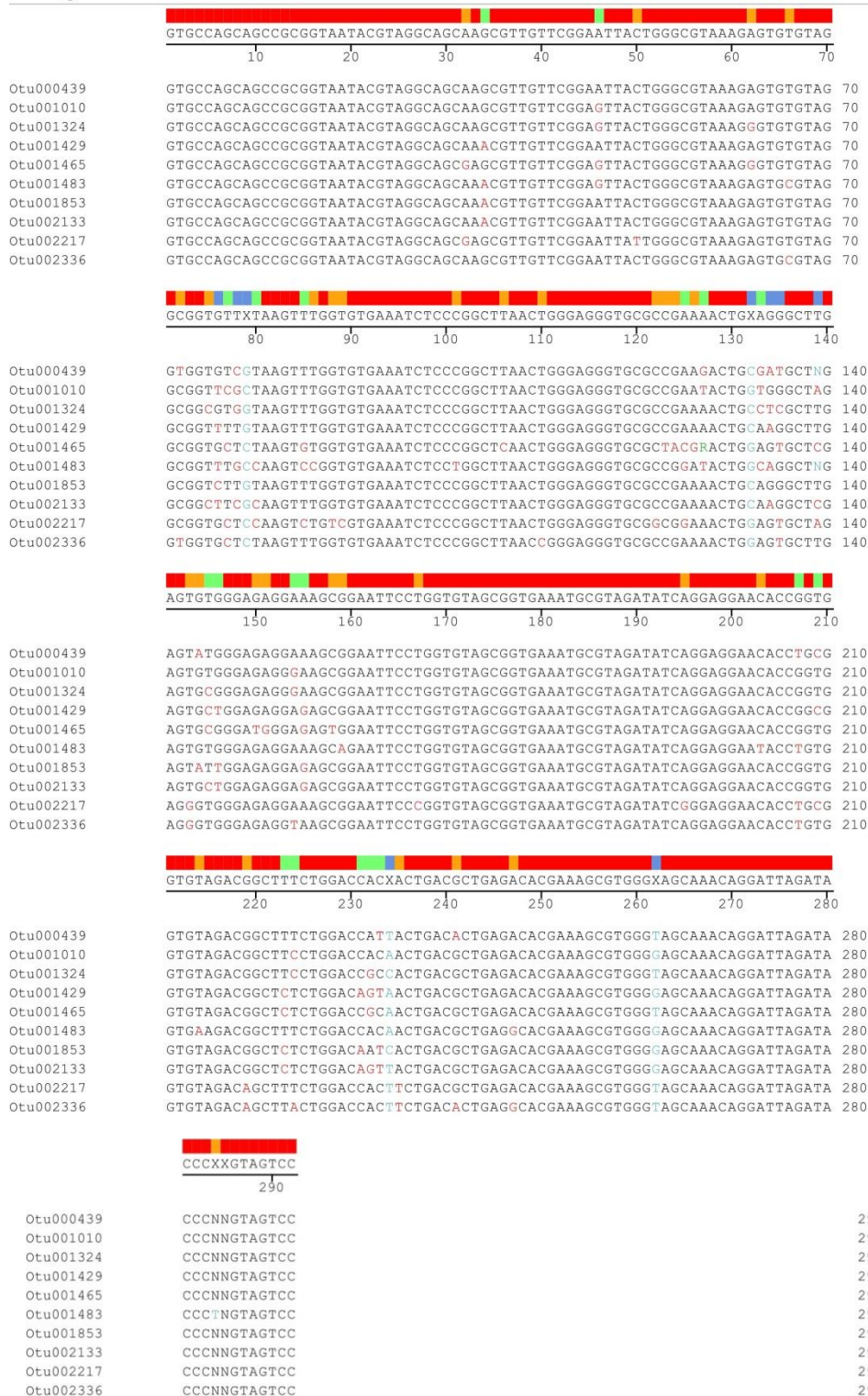
NMDS plot van OTU's van alle voorzieningsgebieden en matrices (reinwater, biofilm, consumentwater en leidingwater/cbm).

Bijlage IV Percentages van geanalyseerde sequenties van de drie geselecteerde bacteriesoorten in de monsters, gesorteerd op matrix.



Bijlage V Consensus sequenties DNA-markers

Alignment Workspace of Alignment Consensus OTO50 AcidobacteriaGp3.meg ClustalW (Slow/Accurate, 1000000) 1
dinsdag 14 november 2017 11:59



Alignment Workspace of Alignment Consensus OTO50 anaerolineaceae.meg ClustalW (Slow/Accurate, 100%)
dinsdag 14 november 2017 12:59

		
	GTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGAGCGGAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGTGXAG	
	10 20 30 40 50 60 70	
Otu000290	GTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGAGCGGAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGTGAG 70	
Otu000368	GTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGAGCGGAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGTGAC 70	
Otu000469	GTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGAGCGGAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGTGAC 70	
Otu000996	GTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGAGCGGAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGTGAC 70	
Otu001576	GTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGAGCGGAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGTGAC 70	
Otu003220	GTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGAGCGGAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGTGAC 70	
Otu003959	GTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGAGCGGAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGTGAC 70	
Otu006248	GTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGAGCGGAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGTGAC 70	
Otu006739	GTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGAGCGGAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGTGAC 70	
Otu007766	GTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGAGCGGAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGTGAC 70	
		
	GXGGTTTGGTAAGTTGGGCGTGAAATCTCXCXGGCTCAACTGGGAGAGGTCGTCAAAACTXCCAGACTGG	
	80 90 100 110 120 130 140	
Otu000290	GTGGCTTGAAAGTTGGACGTGAAAGCTCTGGCTTAAGTGGGAGAGGTCGTACAAAAGTACGAGCTTG 140	
Otu000368	GTGGCTTGCAAGTGGGCGATGAAATCTCTGGCTCAACCGGGAGAGGTTGTCCGATAGCTAGGCTTG 140	
Otu000469	GTGGTTTGGTAAGTCGGGCGATGAAAGCTCTGGCTCAACTGAGAGAGGTCGTCCGATAGCTAGGACTTG 140	
Otu000996	GCGGTTTCGGTAAGTCGGGCGATGAAAGCTCTGGCTCAACTGGGAGAGGCGGTCGATAGCTAGGACTTG 140	
Otu001576	GCGGCTCTCAAGTCGGGCGATGAAATCTCTGGCTCAACCGGGAGAGGTCGTCCGAACTGACAGGCTTG 140	
Otu003220	GTGGCGCGGAAAGTTGGACGTGAAAGCTCTGGCTTAAGTGGGAGAGGTCGTACAAAAGTACGAGCTTG 140	
Otu003959	GCGGTTTGACAAGTGGGTCGTGAAAGCTCTGGCTCAACTGGGAGAGGTCGTACCAAGTGTAGGCTTG 140	
Otu006248	GCGGTTTGGTAAGTTGGATGAAATCTCTGGCTCAACTAGGAGAGGTCGTCAAAAGTACGAGCTTG 140	
Otu006739	GTGGTTTGTAAAGTTGGGTTAAATCTCTGGCTCAACTGAGAGGTCGTCAAAAGTACGAGCTTG 140	
Otu007766	GTGGTTTGCTAAGTTGGGTTAAATCTCTGGCTCAACTGAGAGGTCGTCAAAAGTACGAGCTTG 140	
		
	AGGGCGGTAGAGGAGGTTGGAATTCGGGTGTAGTGGTGAAATGCGTAGATATCCGGAGGAACACCAAGT	
	150 160 170 180 190 200 210	
Otu000290	AGGTTGGAAGAGGAGAGCAGAAATCCGGGTGTAGTGGTGAAATGCGTAGATATCCGGAGGAATACCAAGT 210	
Otu000368	AGGGCAGTAGAGGAGGTTGGAATTCGGGTGTAGTGGTGAAATGCGTAGATATCCGGAGGAACACCAAGT 210	
Otu000469	AGGGTGTAGAGGAGGTTGGAATTCGGGTGTAGTGGTGAAATGCGTAGATATCCGGAGGAACACCAAGT 210	
Otu000996	AGGGCAGTAGAGGAGGTTGGAATTCGGGTGTAGTGGTGAAATGCGTAGATATCCGGAGGAACACCAAGT 210	
Otu001576	AGGGCAGTAGAGGAGGTTGGAATTCGGGTGTAGTGGTGAAATGCGTAGATATCCGGAGGAACACCAAGT 210	
Otu003220	AGGTTGGAAGAGGAGAGCGGAATTCGGGTGTAGTGGTGAAATGCGTAGATATCCGGAGGAACACCAAGT 210	
Otu003959	AGTTCGACAGAGGAGGTTGGAATTCGGGTGTAGTGGTGAAATGCGTAGATATCCGGAGGAACACCAAGT 210	
Otu006248	AGGACGGTAGAGGAGGTTGGAATTCGGGTGTAGTGGTGAAATGCGTAGATATCCGGAGGAATACCAAGT 210	
Otu006739	AGGACGGTAGAGGAGGTTGGAATTCGGGTGTAGTGGTGAAATGCGTAGATATCCGGAGGAACACCAAGT 210	
Otu007766	AGGACGGTAGAGGAGGTTGGAATTCGGGTGTAGTGGTGAAATGCGTAGATATCCGGAGGAATACCAAGT 210	
		
	GCGAAGGCGGCTCTCTGGACCGCTCTGACXCTCAGACGCGAAAGCTAGGGGAGCGAACGGGATTAGAAA	
	220 230 240 250 260 270 280	
Otu000290	GCGAAGGCGGCTCTCTGGTTCAATCTGACACTGAGATGCGAAAGCTAGGGGAGCGAACGGGATTAGATA 280	
Otu000368	GCGAAGGCGGCTCTCTGGACTGCACTGACCTGTACGCGGAAAGCTAGGGGAGCGAACGGGATTAGAAA 280	
Otu000469	GCGAAGGCGGCTCTCTGGCACACTCTGACACTCAGACGCGAAAGCTAGGGGAGCGAACGGGATTAGAAA 280	
Otu000996	GCGAAGGCGGCTCTCTAGTCTGCCCTGACCTCAGACGCGAAAGCTAGGGGAGCGAACGGGATTAGAAA 280	
Otu001576	GCGAAGGCGGCTCTCTGGACTGTACCTGACCTCAAAACGCGAAAGCTAGGGGAGCGAACGGGATTAGAAA 280	
Otu003220	GCGAAGGCGGCTCTCTGGTTCAATCTGACACTGAGATGCGAAAGCTAGGGGAGCGAACGGGATTAGATA 280	
Otu003959	GCGAAGGCGATGCTCTGGGTCGAAACTGACCTAAGACGCGAAAGCTAGGGGAGCGAACGGGATTAGAAA 280	
Otu006248	GCGAAGGCGGCTCTCTGGGCTCTCTGACCTCAGACGCGAAAGCTAGGGGAGCGAACGGGATTAGAAA 280	
Otu006739	GCGAAGGCGGCTCTCTGGACCGCTCTGACACTCAAAACGCGAAAGCTAGGGGAGCGAACGGGATTAGAAA 280	
Otu007766	GCGAAGGCGGCTCTCTGGACCGCTCTGACACTCAGACGCGAAAGCTAGGGGAGCGAACGGGATTAGAAA 280	
		
	CCCXXGTAGTCC	
	290	
Otu000290	CCCNNGTAGTCC	292
Otu000368	CCCNNGTAGTCC	292
Otu000469	CCCNNGTAGTCC	292
Otu000996	CCCNNGTAGTCC	292
Otu001576	CCCNNGTAGTCC	292
Otu003220	CCCNNGTAGTCC	292
Otu003959	CCCNNGTAGTCC	292
Otu006248	CCCNNGTAGTCC	292
Otu006739	CCCNNGTAGTCC	292
Otu007766	CCCNAGTAGTCC	292

Alignment Workspace of Alignment Consensus OTO50 Hyphomicrobium.meg ClustalW (Slow/Accurate, Page 1)
dinsdag 14 november 2017 13:02

		
	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAG	
	10 20 30 40 50 60 70	
Otu000042	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAG	70
Otu000050	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAG	70
Otu000068	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAG	70
Otu000289	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAG	70
Otu000850	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAG	70
Otu003444	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAG	70
Otu004710	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAG	70
Otu005947	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAG	70
Otu012255	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAG	70
Otu012489	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAG	70
		
	GCGGATTTGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAAGTGCCTTTTGATACTGCAAGTCTCG	
	80 90 100 110 120 130 140	
Otu000042	GCGGACTTTCAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAAGTGCCTTTTGATACTGTTGGTCTCG	140
Otu000050	GCGGATTTGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAAGTGCCTTTTGATACTGCAAACTCTCG	140
Otu000068	GCGGATTTGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAAGTGCCTTTTGATACTGCAAACTCTCG	140
Otu000289	GCGGATTTGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAAGTGCCTTTTGATACTGCAAACTCTCG	140
Otu000850	GCGGATTTGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAAGTGCCTTTTGATACTGCAAACTCTCG	140
Otu003444	GCGGATTTGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAAGTGCCTTTTGATACTGCAAACTCTCG	140
Otu004710	GCGGATTTGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAAGTGCCTTTTGATACTGCAAACTCTCG	140
Otu005947	GCGGATTTGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAAGTGCCTTTTGATACTGCAAACTCTCG	140
Otu012255	GCGGATTTGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAAGTGCCTTTTGATACTGCAAACTCTCG	140
Otu012489	GCGGATTTGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAAGTGCCTTTTGATACTGCAAACTCTCG	140
		
	AGTCCGGAAGAGGTGGGTGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTG	
	150 160 170 180 190 200 210	
Otu000042	AGTCCGGAAGAGGTGGGTGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTG	210
Otu000050	AGTCCGGAAGAGGTGGGTGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTG	210
Otu000068	AGTCCGGAAGAGGTGGGTGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTG	210
Otu000289	AGTCCGGAAGAGGTGGGTGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTG	210
Otu000850	AGTCCGGAAGAGGTGGGTGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTG	210
Otu003444	AGTCCGGAAGAGGTGGGTGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTG	210
Otu004710	AGTCCGGAAGAGGTGGGTGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTG	210
Otu005947	AGTCCGGAAGAGGTGGGTGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTG	210
Otu012255	AGTCCGGAAGAGGTGGGTGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTG	210
Otu012489	AGTCCGGAAGAGGTGGGTGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTG	210
		
	GCGAAGGCGGCCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATA	
	220 230 240 250 260 270 280	
Otu000042	GCGAAGGCGGCCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATA	280
Otu000050	GCGAAGGCGGCCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATA	280
Otu000068	GCGAAGGCGGCCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATA	280
Otu000289	GCGAAGGCGGCCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATA	280
Otu000850	GCGAAGGCGGCCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATA	280
Otu003444	GCGAAGGCGGCCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATA	280
Otu004710	GCGAAGGCGGCCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATA	280
Otu005947	GCGAAGGCGGCCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATA	280
Otu012255	GCGAAGGCGGCCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATA	280
Otu012489	GCGAAGGCGGCCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATA	280
		
	CCCXXGTAGTCC	
	290	
Otu000042	CCCNNGTAGTCC	292
Otu000050	CCCNNGTAGTCC	292
Otu000068	CCCNNGTAGTCC	292
Otu000289	CCCNNGTAGTCC	292
Otu000850	CCCNNGTAGTCC	292
Otu003444	CCCNNGTAGTCC	292
Otu004710	CCCNNGTAGTCC	292
Otu005947	CCCNNGTAGTCC	292
Otu012255	CCCNNGTAGTCC	292
Otu012489	CCCNNGTAGTCC	292

Bijlage VI Details primersequenties

Genus	Forward (5'→3')				Reverse (5'→3')				Tm ³ (°C)
	start ¹	stop ¹	Tm (°C)	GC (%)	start ¹	stop ¹	Tm (°C)	GC (%)	
Acidobacteria Gp3	19	38	60,1	50	214	195	60,0	60	84,5
Anaerolineaceae_unclassified	154	173	59,4	55	263	244	60,8	60	84,5
Hyphomicrobium	104	123	60,0	55	212	193	60,0	55	80,5

1, positie op basis van consensus DNA-sequentie; optimale smelttemperatuur volgens standaard berekening; 3, smelttemperatuur PCR-product

Bijlage VII DNA Kalibratie-fragmenten voor qPCR (G-blocks)

gBLOCK AnaerolineaceaeOT050 met IC

GTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGCTAGGAGCCGAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCG
TGtAGGtGGTTTGGTAAGTTGGGCGTGAAATCTCcCGGCTCAACTGGGAGAGGTCGTTCAAAACTaC
CAGACTGGAGGGCGGTAGAGGaAGGTGGAATTCGGGTGTAGTGGTGAAATGCGTAGATATCCGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCTtCTGGACCGCTCCTGACaCTCAGACGCGAAAGCTAGGGG
AGCGAACGGGATTAGAAACCCATGACAGCCACTCCTCCGGGAAGCAGAGACCCATTCCCTCAGAG
CAATGCACCAATCATGGATGAAGAAAGAGAAATCCCTGAACGTTCTGGAGTTCTGGACATGAGTG
GGTCACGGATTTTAAAGGGAAGACTGTTTGGTTCGTTCC

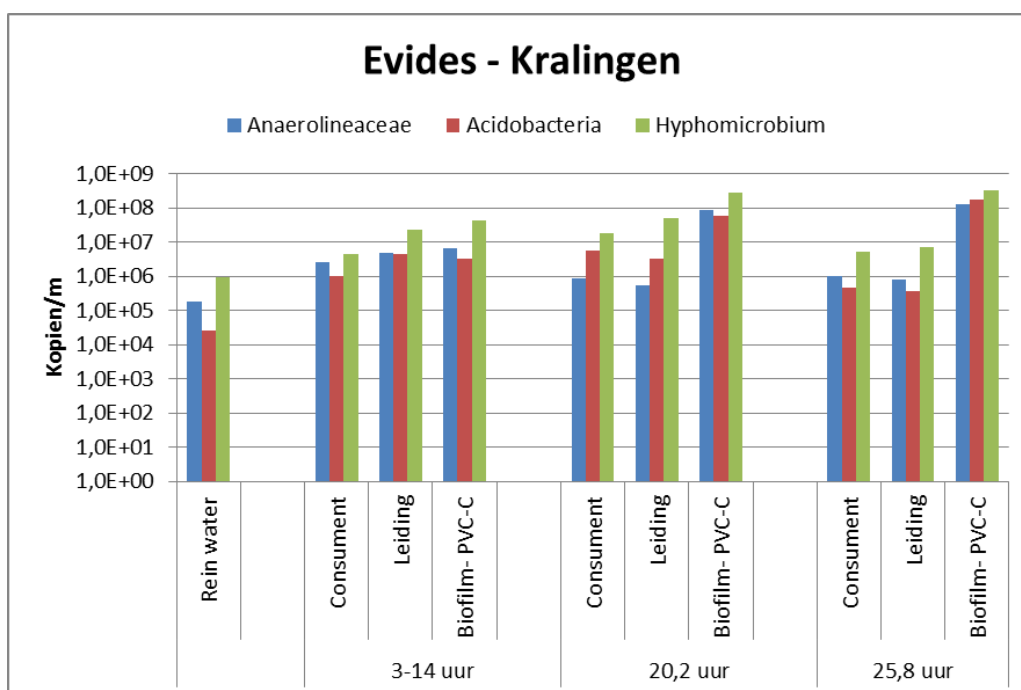
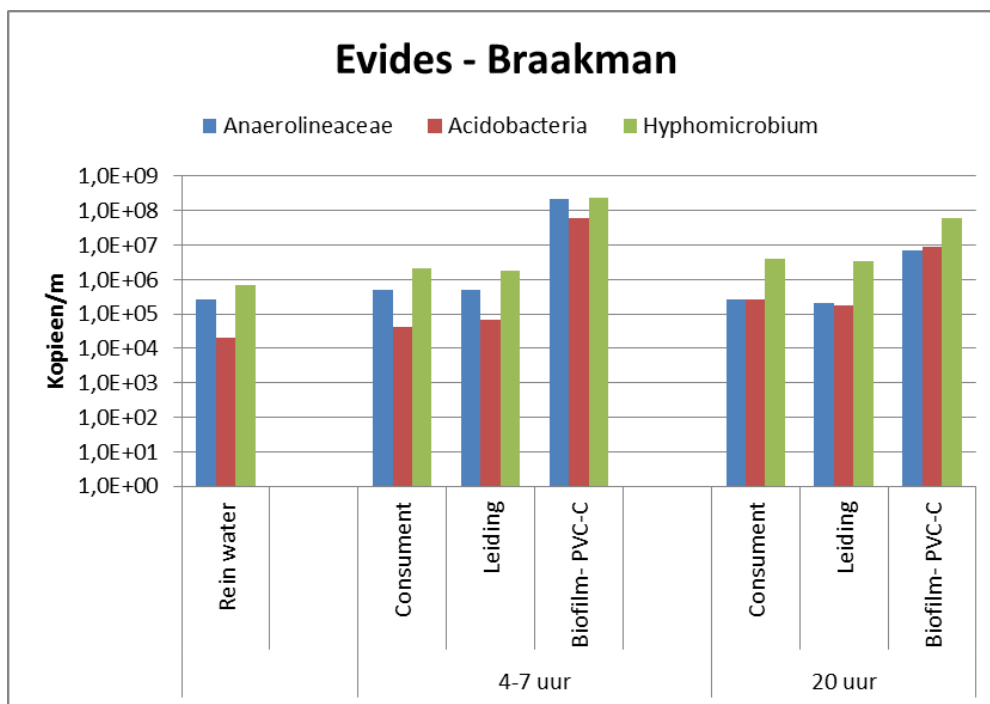
gBLOCK AcidobacteriaGp30TU50 met IC

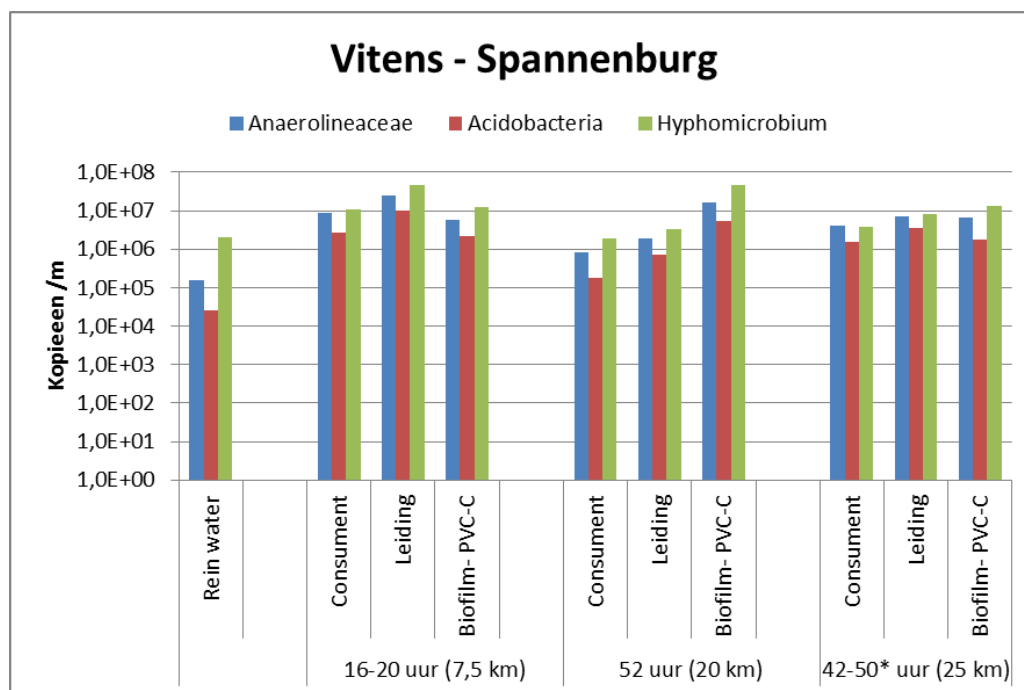
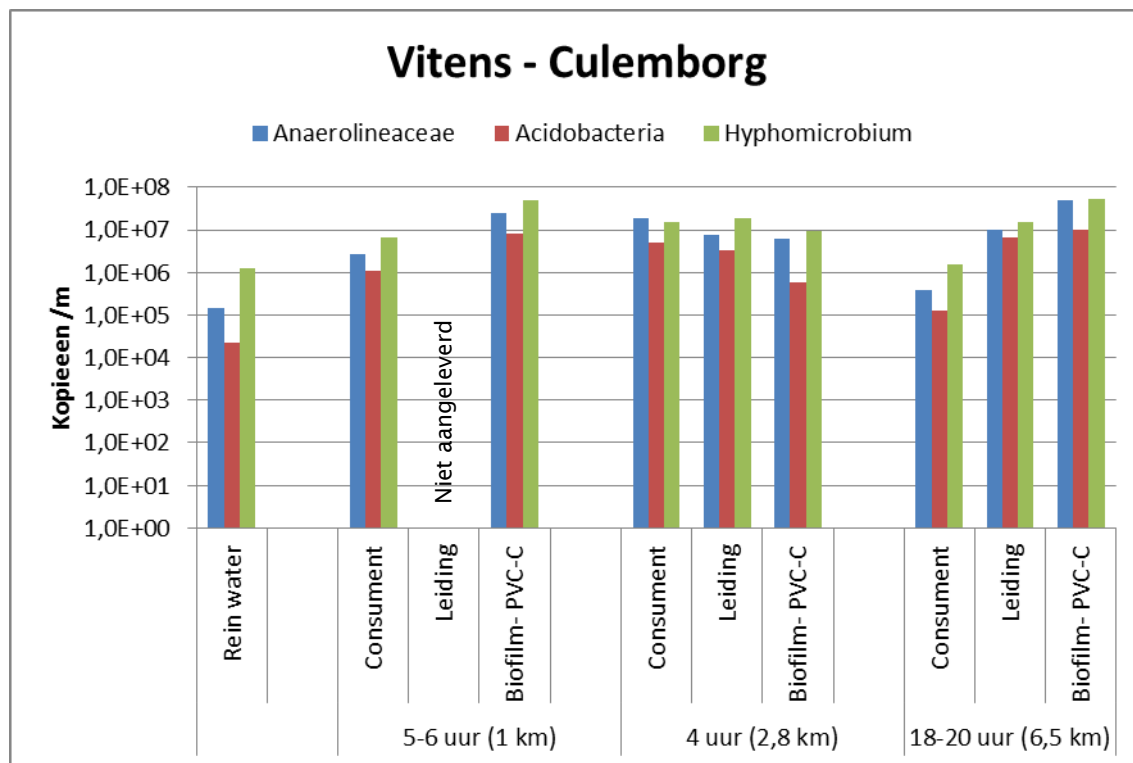
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGCAGCAAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTG
TGtAGGCGGTGTTgTAAGTTTGGTGTGAAATCTCCCGCTTAACTGGGAGGGTGCGCCGAAAAGTg
cAGGGCTTGAGTGTGGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAG
GAGGAACACCGGTGGTGTAGACGGCTTTCTGGACCACtACTGACGCTGAGACACGAAAGCGTGGGt
AGCAAACAGGATTAGATACCCATGACAGCCACTCCTCCGGGAAGCAGAGACCCATTCCCTCAGAG
CAATGCACCAATCATGGATGAAGAAAGAGAAATCCCTGAACGTTCTGGAGTTCTGGACATGAGTG
GGTCACGGATTTTAAAGGGAAGACTGTTTGGTTCGTTCC

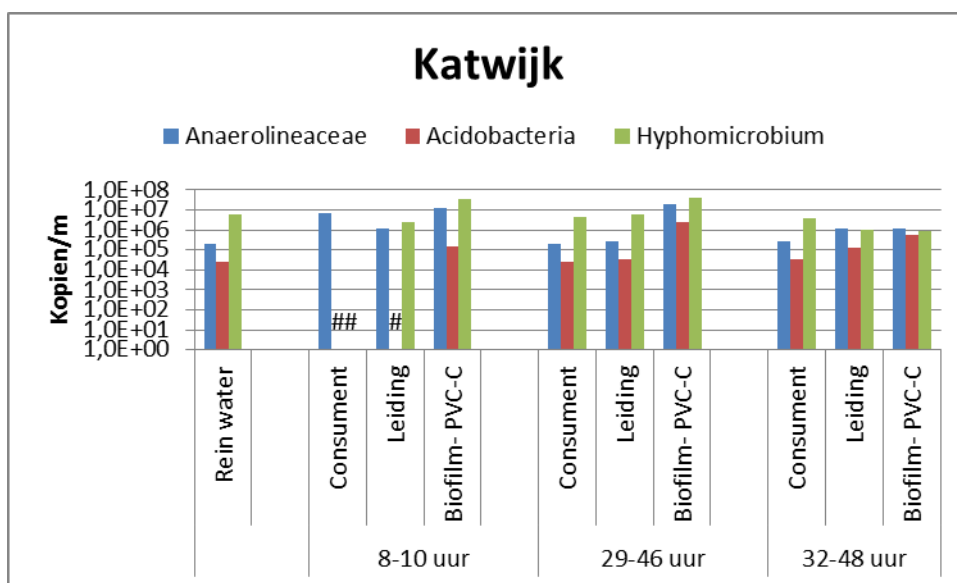
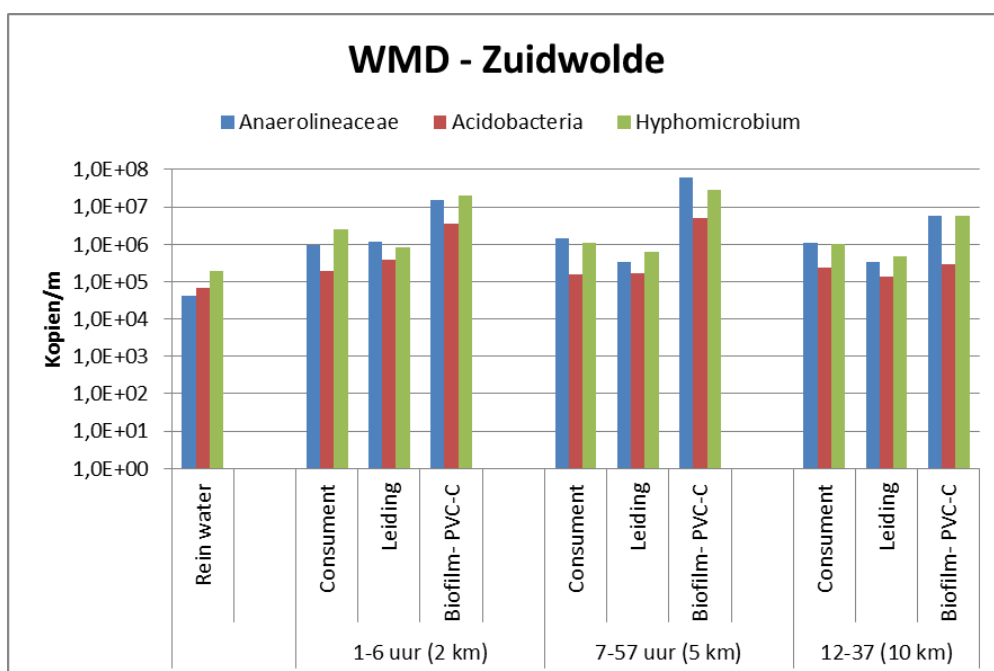
gBLOCK hyphomicrobiumOTU50 met IC

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGTAGGCGGATTTGTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAAGTGCCTTTGATACTG
CAAGTCTCGAGTCCGGAAGAGGTGGGTGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGG
AAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCcATGACAGCCACTCCTCCGGGAAGCAGAGACCCATTCCCTCAGAGC
AATGCACCAATCATGGATGAAGAAAGAGAAATCCCTGAACGTTCTGGAGTTCTGGACATGAGTG
GGTCACGGATTTTAAAGGGAAGACTGTTTGGTTCGTTCC

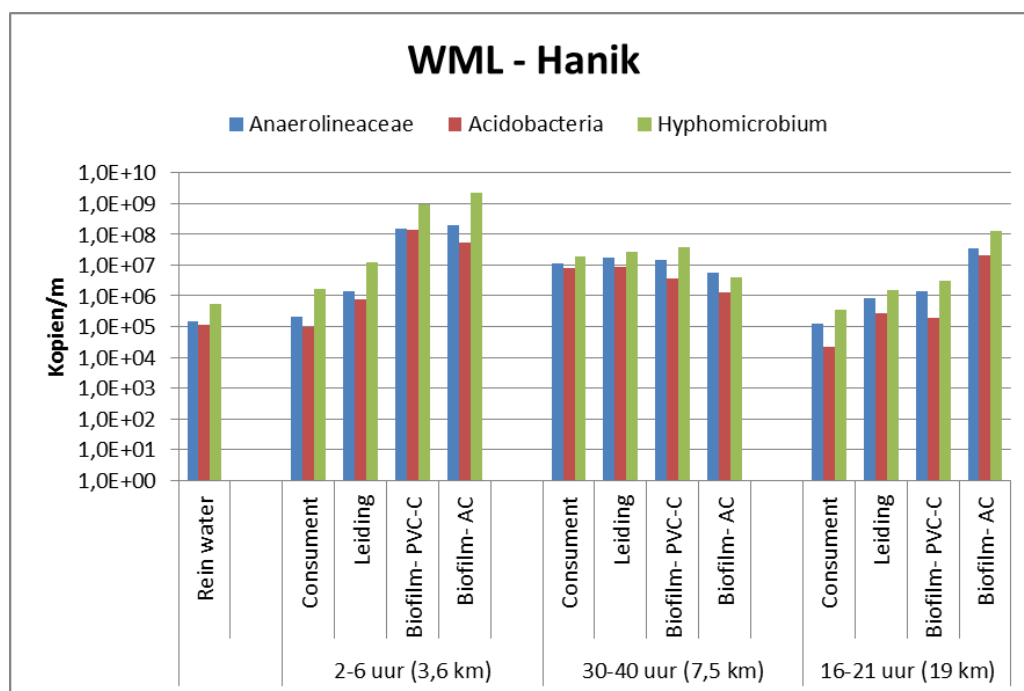
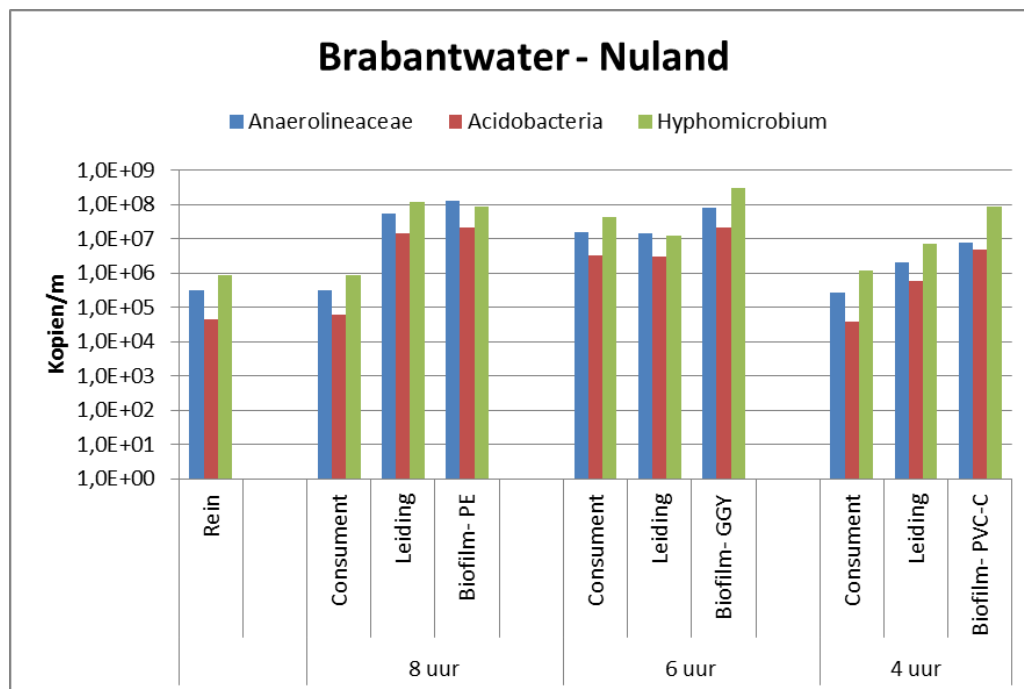
Bijlage VIII Resultaten indicator qPCR's

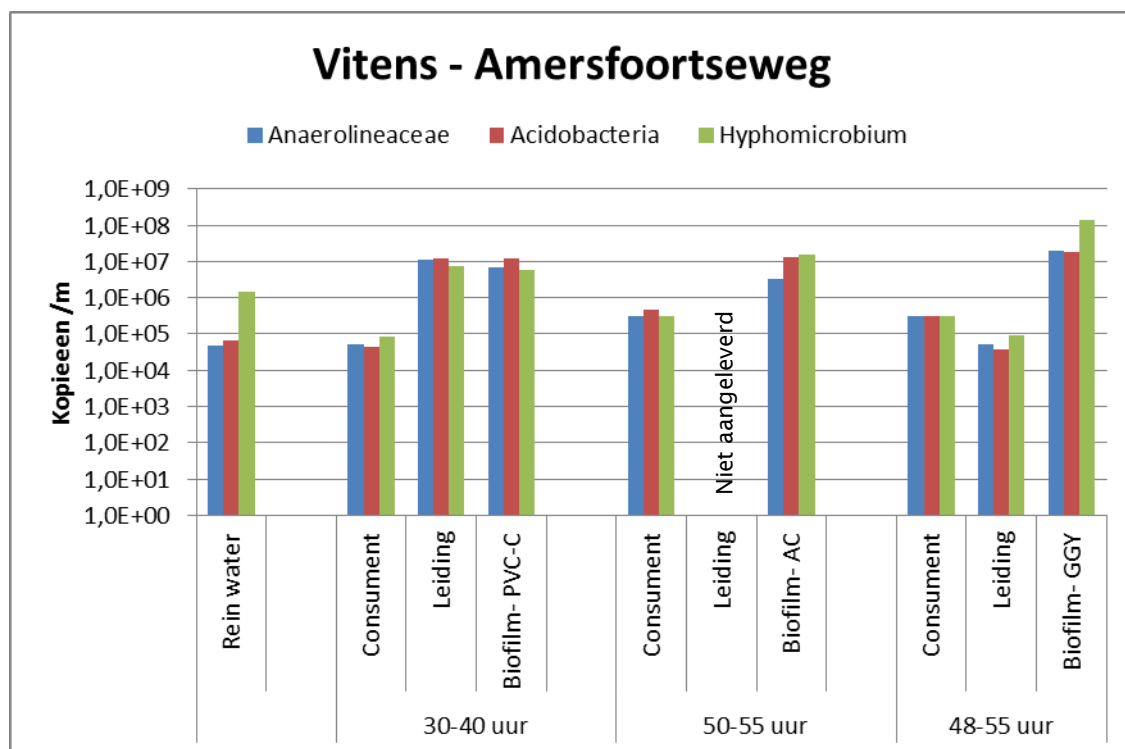
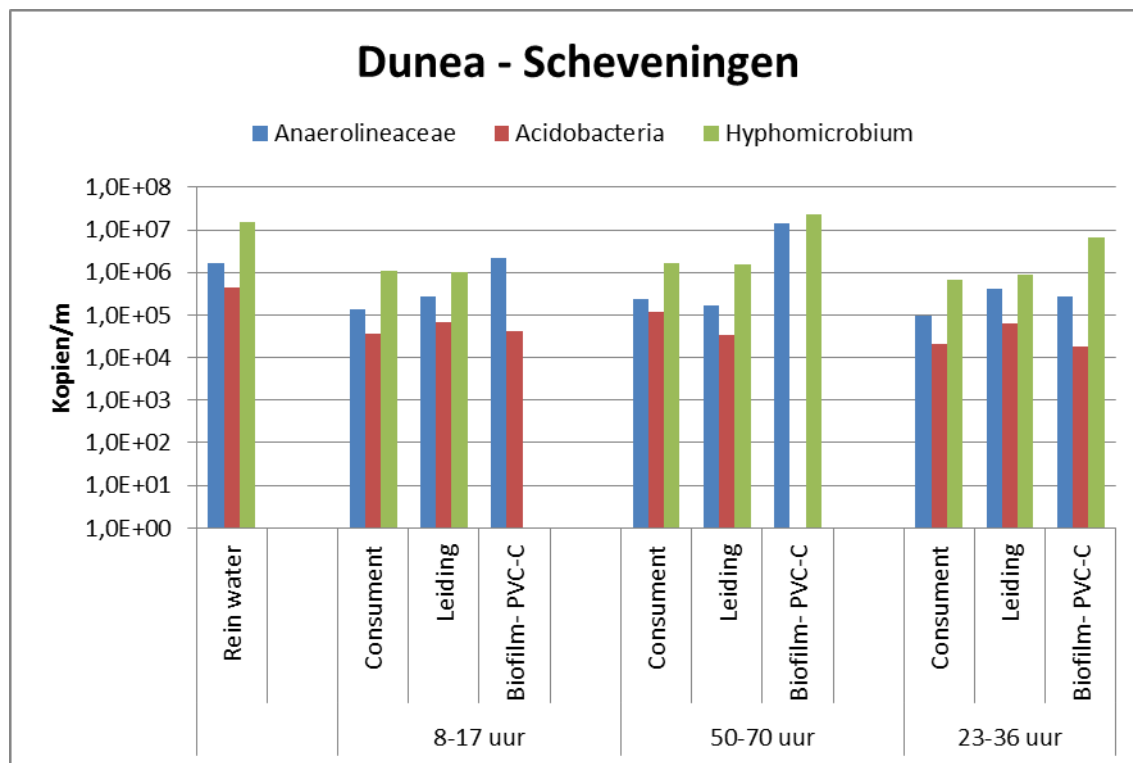




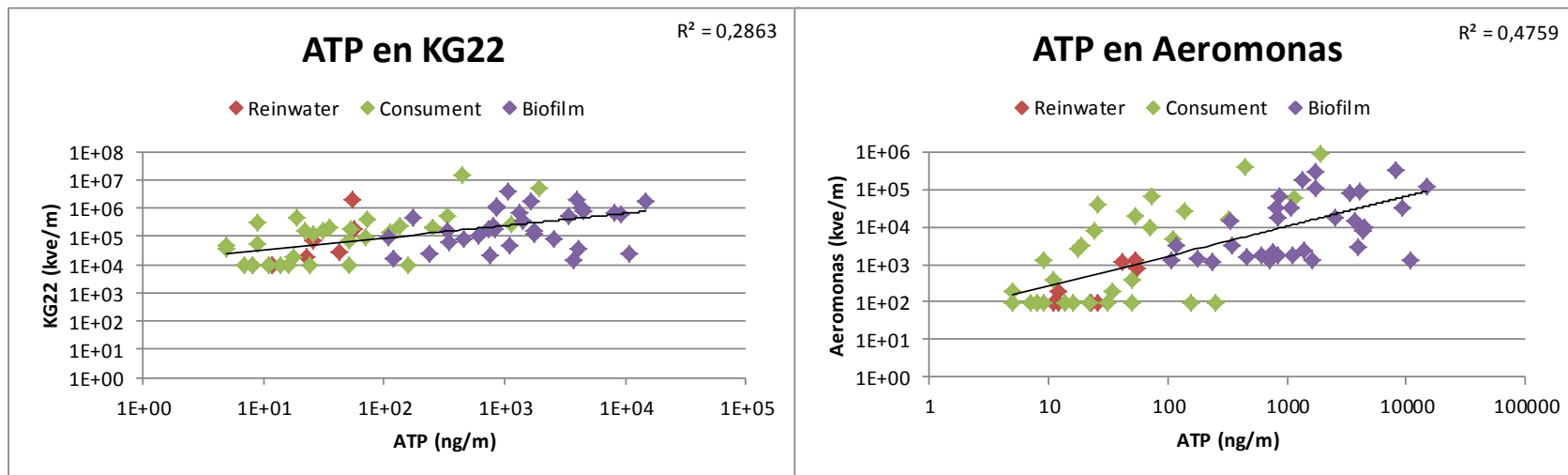


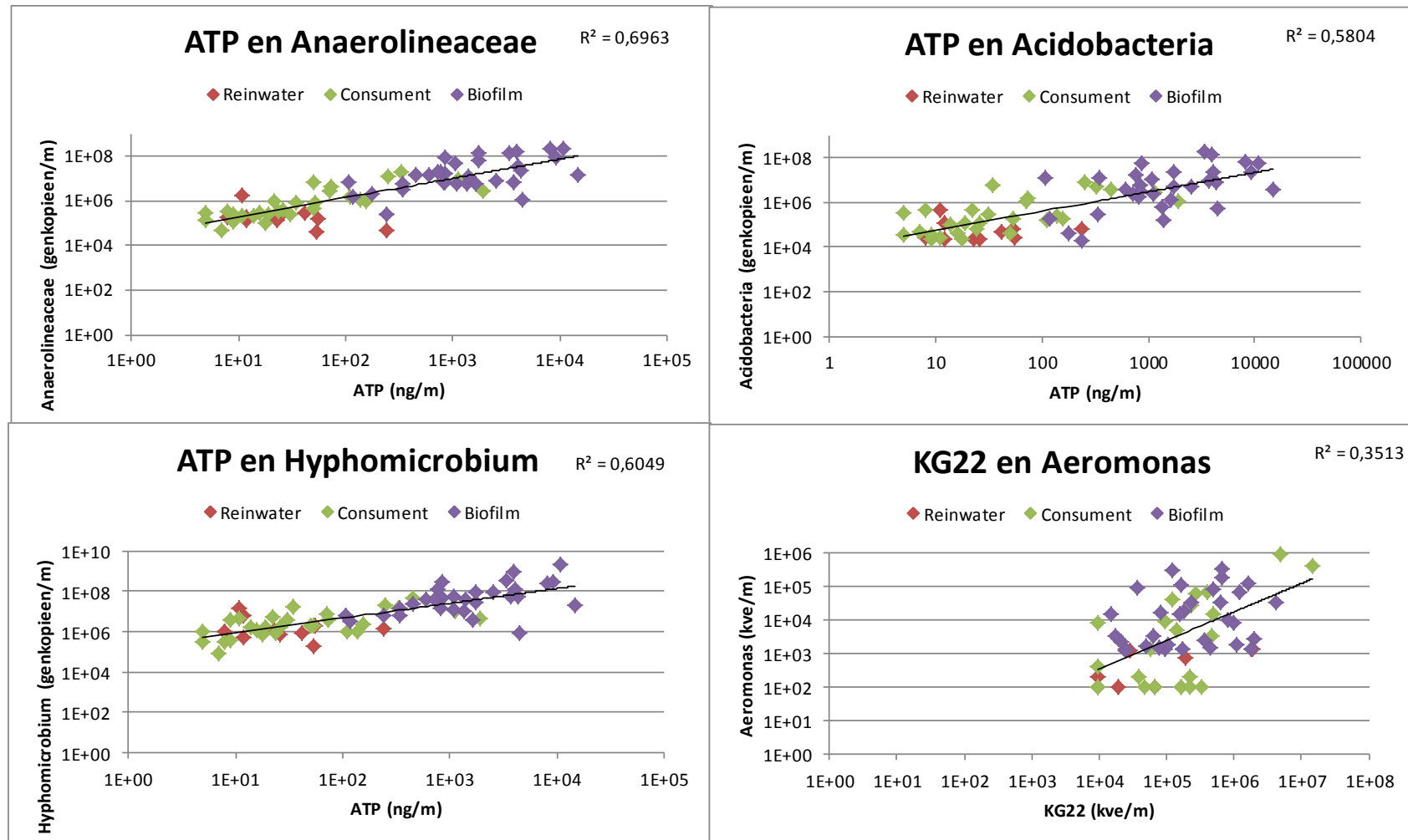
= beneden detectielimiet

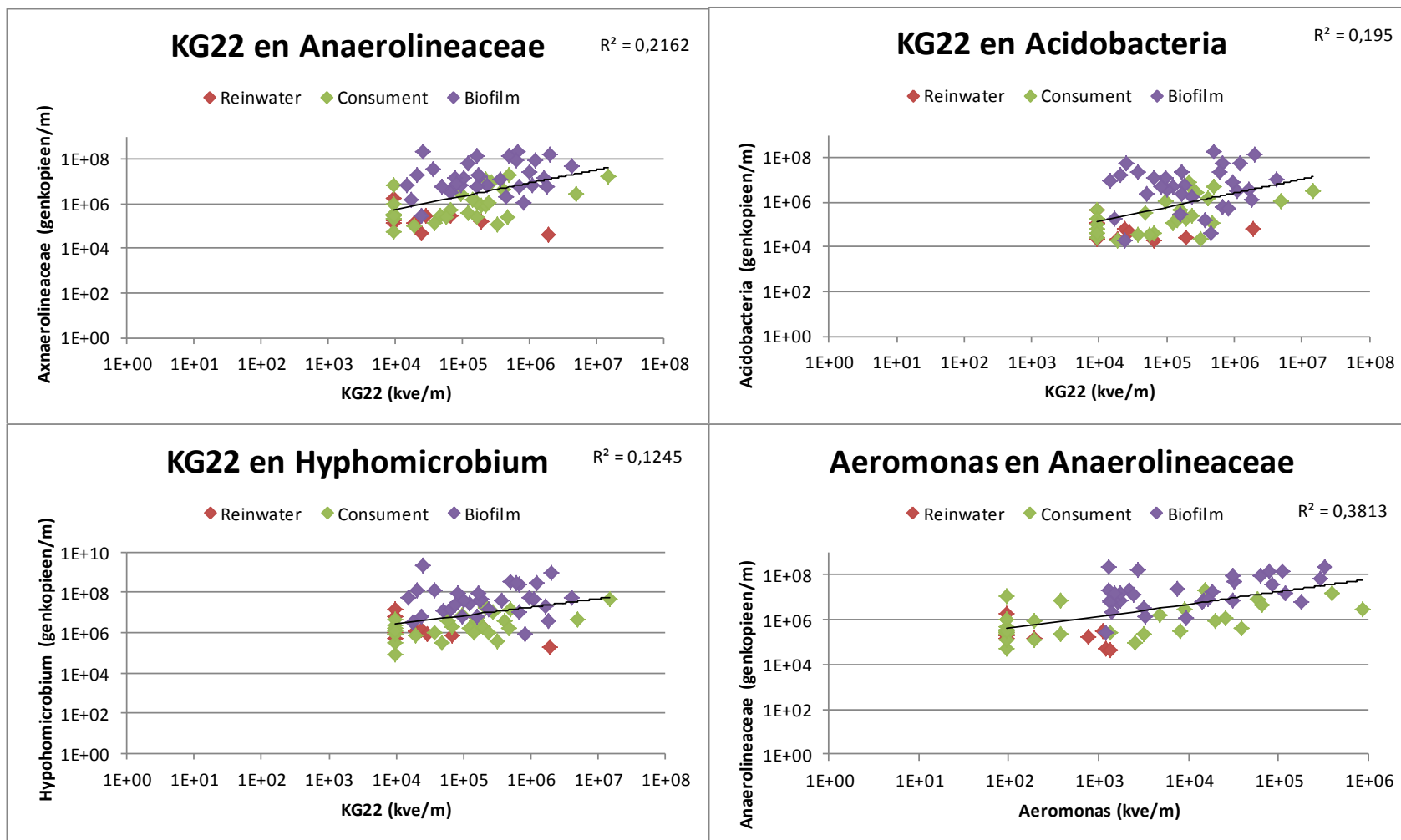




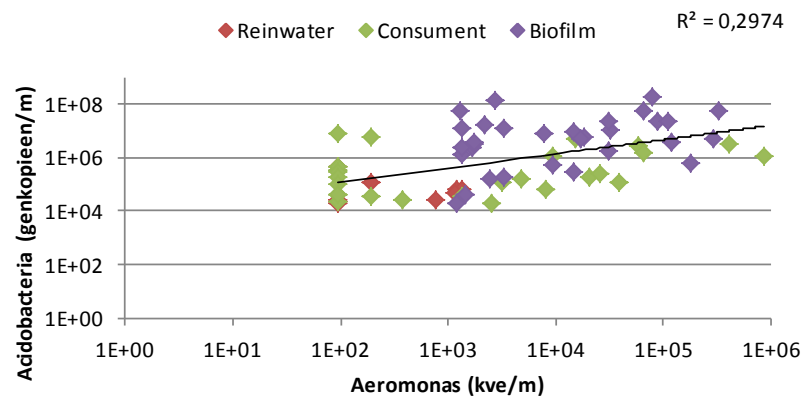
Bijlage IX Correlaties tussen de verschillende microbiologische parameters



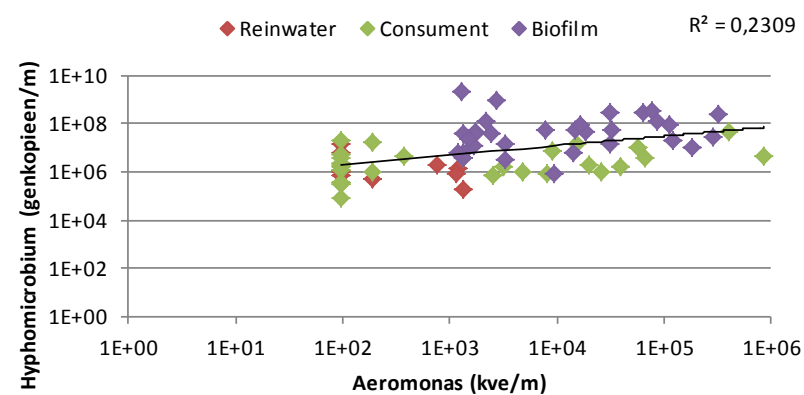




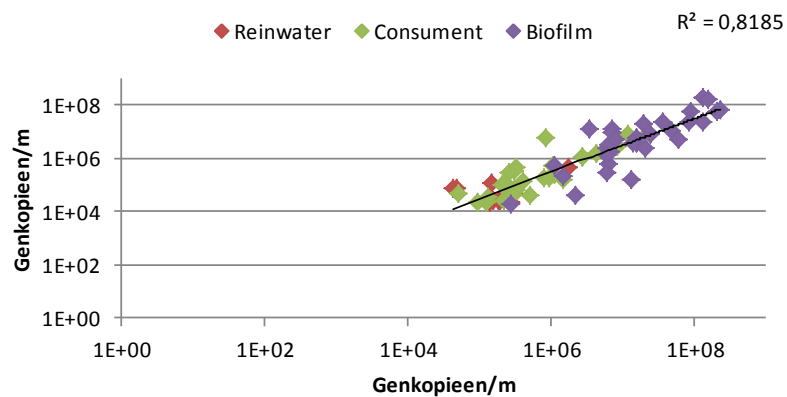
Aeromonas en Acidobacteria



Aeromonas en Hyphomicrobium



Anaerolineaceae en Acidobacteria



Acidobacteria en Hyphomicrobium

