



Foto Deltares

Het gebruik van moleculaire technieken draagt bij aan microbiologisch veilige drinkwaterproductie

AUTEURS



Bas van der Zaan en Marcelle van der Waals
(Deltares)



Anneke Roosma en Adrie Atsma
(Vitens)

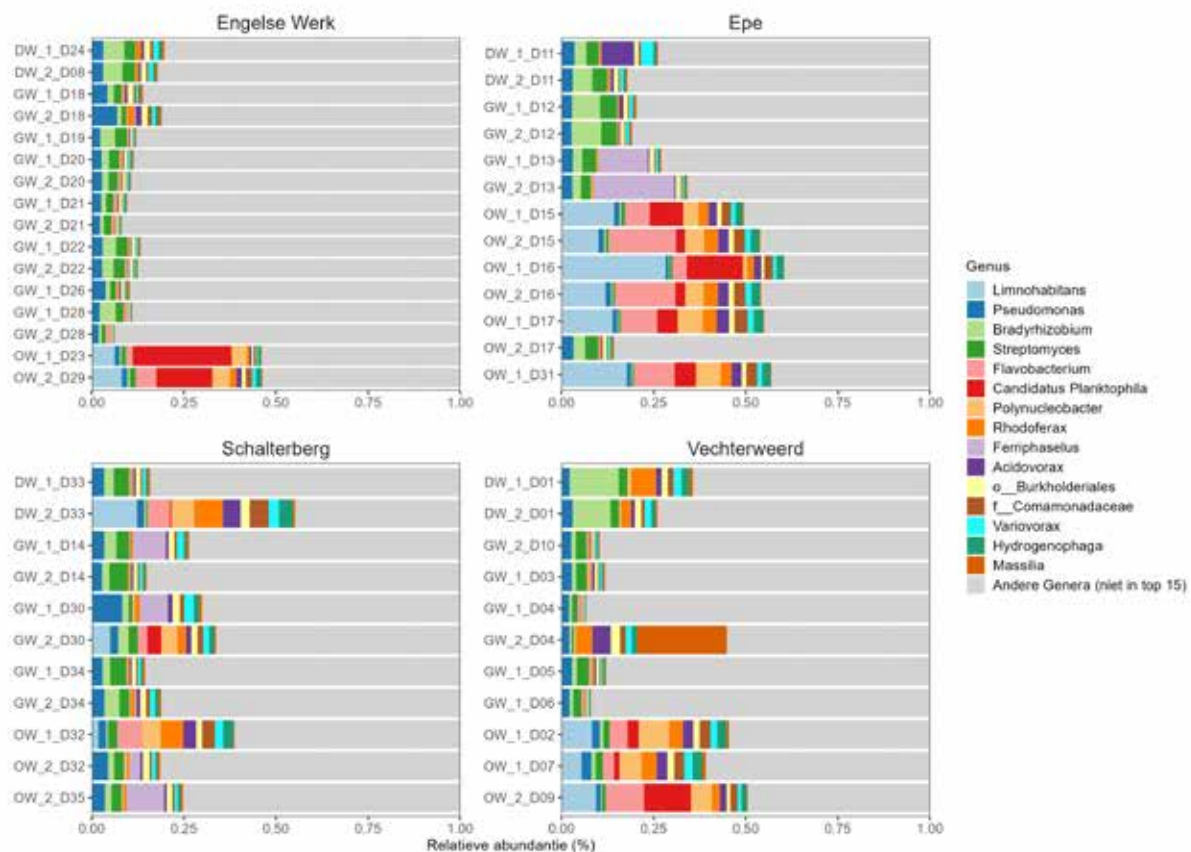


Merijn Schriks
(Vitens)

DNA-FINGERPRINTS TONEN HERKOMST EN MICROBIOLOGISCHE VEILIGHEID DRINKWATERWINNING

De microbiologische kwaliteit van drinkwater uit grondwater wordt met meerdere indicatoren gemonitord. Zo weten we of het water fecaal verontreinigd is, maar niet waar een eventuele verontreiniging vandaan komt. Vitens en Deltares hebben, met medewerking van de Wageningen Universiteit, onderzocht of DNA-fingerprinting fecale bacteriën kan aantonen en de bron kan identificeren. Met die informatie zouden drinkwaterbedrijven snel gerichte maatregelen kunnen nemen.

Grondwater bevat van nature weinig bacteriën, waardoor het in de basis erg geschikt is voor de productie van drinkwater. Er zijn echter grondwaterwinningen waar uitwisseling met oppervlaktewater plaatsvindt. Ze worden bijvoorbeeld gevoed door een infiltratieplas, of ze liggen dicht bij een rivier en hebben een instroomstroom van water vanuit de rivier.



Afbeelding 1: Microbiologische DNA-fingerprints van de individuele watermonsters op basis van het 16S rRNA gen. Watermonsters zijn van GW = grondwater (winput), DW = drinkwater, OW = oppervlaktewater. De kleuren geven de relatieve bijdrage van verschillende microbiële genera weer.

16

Door infiltratie van oppervlaktewater naar grondwater is er een verhoogde kans op het intreden van (pathogene, fecale) micro-organismen in het opgepompte water. Daarom wordt de kwaliteit van het inname water en de winputten hierop extra gemonitord. Kweek-gerelateerde methodes testen op meerdere microbiële indicatoren, o.a. *E. coli*, somatische colifagen en *Clostridium perfringens* bacteriën.

Naast de klassieke kweekmethodes is voor *E. coli* sinds 2019 de RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)-screeningsmethode in gebruik. Deze methode is ontwikkeld door de samenwerkende drinkwaterlaboratoria. Het voordeel van de RT-PCR-methode is dat hij relatief snel in beeld brengt of er een fecale verontreiniging aanwezig is. RT-PCR laat echter niet zien waar de verontreiniging vandaan komt. Komt hij met het oppervlaktewater mee, of is er een andere oorzaak voor de aanwezigheid ervan? Drinkwaterbedrijven hebben behoefte aan meer informatie over de potentiële microbiologische verontreinigingsbron, om gericht en sneller maatregelen te kunnen treffen.

Next Generation Sequencing geschikt?

Next Generation Sequencing (NGS) is een methode om

een 'DNA-fingerprint' van het drinkwater te maken, die een nagenoeg compleet beeld geeft van de microbiologische samenstelling van het geteste water. Daarmee is het mogelijk om bacteriën vanuit het oppervlaktewater in het hele drinkwaterproductieproces te volgen, en eventuele veranderingen tijdig te signaleren.

Maakt dat NGS ook bruikbaar om de herkomst en microbiologische kwaliteit van het water vast te stellen dat als bron voor drinkwaterbereiding gebruikt wordt?

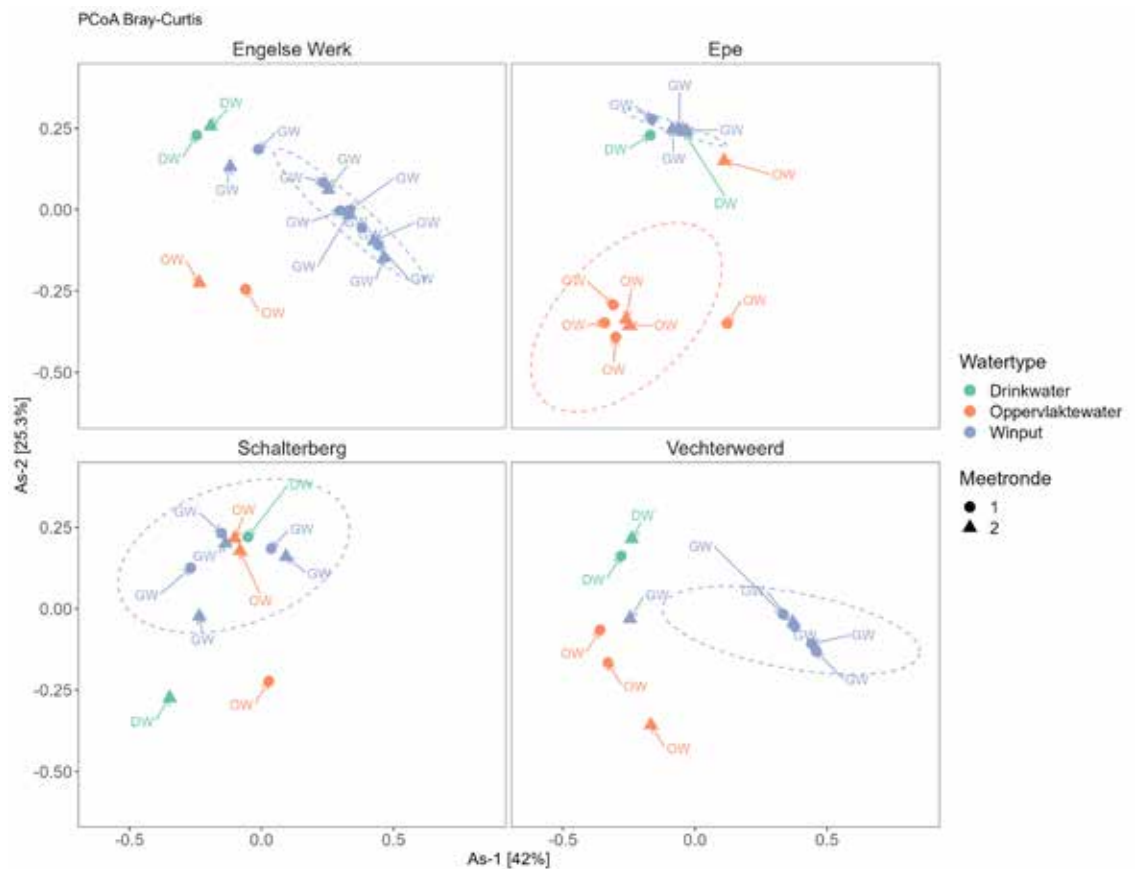
Is de methode geschikt voor gebruik op relatief schone watermonsters, en zijn de data goed te interpreteren?

Er worden bij NGS namelijk enorm veel data verzameld en het is de vraag hoe die kunnen worden omgezet naar bruikbare informatie om de microbiologische veiligheid van drinkwater beter te kunnen waarborgen.

Het tweejarig onderzoek 'Alternatieve indicator herkomst microbiële verontreiniging drinkwater' kortweg 'TRACER' genaamd, richtte zich op deze vragen.

Vier proeflocaties

Voor het TRACER-onderzoek zijn vier productielocaties gekozen, die alle vier onder invloed staan van oppervlaktewater: Engelse Werk, Vechterweerd, Epe en Schalterberg. In het voorjaar van 2019 en 2020 zijn hier monsters genomen van het reinwater (drinkwater), van diverse winputten



Afbeelding 2. PCoA-plot van de vier onderzochte locaties, waarin de informatie over de microbiologische samenstelling van monsters van verschillende oorsprong en van twee bemonsteringsrondes is samengebracht

(grondwater), en van het nabijgelegen oppervlaktewater. Van de monsters (54 in totaal) is de microbiologische samenstelling vastgesteld met twee verschillende NGS-technieken: '16S rRNA amplicon sequencing' en 'metagenoom sequencing'. De eerste techniek brengt alleen de genen voor 16S rRNA als marker in beeld. De tweede brengt al het aanwezige DNA in beeld, dus ook dat van alle andere organismen die in het water leven. Voor de uitwerking van de metagenoom sequence-data is samengewerkt met het Laboratorium voor Microbiologie van de Wageningen Universiteit. Zo mochten we onder meer gebruik maken van hun Bio-IT pipeline om alle DNA-sequenties goed te identificeren en onderling te vergelijken.

DNA-fingerprints

De markergenen voor 16S rRNA zien er in elke bacteriesoort net anders uit, en we weten hoe dan. Dat maakt ze een geschikte indicator om te bepalen welke bacteriën in welke mate in de monsters aanwezig zijn. De NGS-resultaten zijn in eerste instantie op 16S rRNA genen vergeleken omdat daarvoor al bioinformatica-methoden beschikbaar waren. De resultaten zijn per locatie op

genusniveau in staafdiagrammen weergegeven (afbeelding 1). De diagrammen geven dus een beeld van de microbiologische samenstelling per locatie, per monster en per watertype.

Vervolgens is met een *principle component analysis* (PCoA) per locatie de verwantschap tussen de typen monsters inzichtelijk gemaakt. Hierbij zijn de fingerprints van de individuele monsters onderling met elkaar vergeleken. Goed te zien is dan (afbeelding 2) dat voor de locaties Engelse Werk en Vechterweerd de monsters clusteren naar hun verschillende oorsprong. De oorsprong (drinkwater, oppervlaktewater, grondwater) kan dus op basis van de microbiologische samenstelling worden achterhaald. In mindere mate geldt dit ook voor de locatie Epe. Maar voor de locatie Schalterberg (oppervlaktewaterinfiltratie) lijken de fingerprints van monsters van verschillende oorsprong veel meer op elkaar. De invloed van het oppervlaktewater op het geproduceerde drinkwater is hier relatief groot in vergelijking met de andere winningen. Een aanzienlijk deel van de micro-organismen uit het oppervlaktewater werd hier teruggevonden in het drinkwater. Dat is opvallend, omdat het beeld bij Epe anders is, terwijl ook bij

Epe gebruik gemaakt wordt van een infiltratieplas. Dat bij Epe de microbiologische samenstelling van geproduceerd drinkwater veel meer overeenkomt met die van het grondwater wijst erop dat de filterende werking van de bodem in Epe beter is dan bij Schalterberg.

Snelle indicator afleiden

Bij het vaststellen van bacteriologische verschillen tussen oppervlaktewater, grondwater en drinkwater is voor de 'fingerprint' enkel gebruik gemaakt van het 16S rRNA gen. De onderlinge verschillen op basis van dit gen blijken al voldoende om de watertypen van elkaar te kunnen onderscheiden. Het totale genoom bevat uiteraard nog vele andere genen, waarvan een aantal potentieel gebruikt kan worden als snelle indicator. Algen zouden bijvoorbeeld een logische indicator voor oppervlaktewater kunnen zijn. Een gerichte analyse met genen die uitsluitend voorkomen in één watertype kan al snel uitsluitend geven of uitwisseling met dit specifieke watertype plaatsvindt. De relatieve aanwezigheid van honderd verschillende genen is voor alle monsters onderzocht (metagenoom-analyse), en weergegeven in een zogeheten heatmap. In de heatmap is de relatieve aanwezigheid van elk gen per monster met een kleur aangegeven. De drinkwatermonsters vertonen een herkenbaar profiel, dat duidelijk te onderscheiden is van de grondwater- en oppervlaktewatermonsters. Het *psbV*-gen (cytochrom c-gen van cyanobacterie) valt hierin op met een donkerrode weergave (= relatief sterke aanwezigheid) in drinkwatermonsters en kan dus een snelle indicator voor de invloed van oppervlaktewater op grondwater zijn. Inmiddels is onderzoek gestart naar de haalbaarheid van het gebruik van dit gen als indicator.

Wat is er geleerd?

NGS geeft een goed beeld van de microbiologische samenstelling van het grondwater dat als drinkwaterbron dient, en van de herkomst van het water. Anders dan verwacht is het hiervoor niet nodig een volledig metagenoom te analyseren; de eenvoudigere methode van '16S rRNA amplicon sequencing' geeft al uitsluitend. Dat is prettig, want vooral de uitwerking van de sequence-data is voor 16S rRNA amplicon sequencing minder ingewikkeld. De uitwerking van een metagenoom-analyse is namelijk behoorlijk specialistisch werk.

Om de aanwezigheid van een bepaald watertype vast te stellen is een metagenoom-analyse wel nuttig als er een specifieke indicator is (bijvoorbeeld genen die betrokken zijn bij de omzetting van bepaalde nutriënten in het (grond)water) waarvoor een gerichte analysemethode kan worden ontwikkeld (bijvoorbeeld qPCR).

Het TRACER-project heeft geen informatie opgeleverd over de aanwezigheid van specifieke pathogene micro-organismen in de monsters, ook al is de microbiologi-

sche samenstelling in kaart gebracht. Veelal konden de aanwezige micro-organismen worden geïdentificeerd tot op klasse- of familie-niveau, omdat de resolutie van de DNA-sequenties tot op heden te beperkt is om de bacteriën tot op soort-niveau te identificeren.

Vervolgonderzoek

De resultaten van het TRACER-onderzoek zijn voor Vitens aanleiding om te verkennen in hoeverre inzicht in de microbiologische samenstelling met behulp van NGS ook kan worden gebruikt om de stabiliteit van de waterkwaliteit bij grondwaterwinningen vast te stellen. Het inmiddels gestarte MIKROWSEQ-project moet hier duidelijkheid over geven. Dit project brengt gedurende één jaar elke twee maanden op vier potentieel kwetsbare grondwaterwinningen de microbiologische samenstelling van het grondwater in kaart met NGS of qPCR. Op elke winningslocatie gebeurt dit op meerdere plekken in de stroombaan, zodat de 'routes' van de bacteriën gevolgd kunnen worden. Door dit met regelmaat te evalueren, zo mogelijk in combinatie met de samenstelling van omliggend oppervlaktewater, kan de stabiliteit van de grondwaterkwaliteit kunnen eventuele veranderingen in de grondwaterkwaliteit in een vroeg stadium worden herkend.

Bas van der Zaan en Marcelle van der Waals (*Deltares*), Anneke Roosma, Adrie Atsma en Merijn Schriks (*Vitens*)

SAMENVATTING

Om de microbiologische kwaliteit van drinkwater vast te stellen wordt drinkwater op meerdere indicatoren gemonitord. De indicatoren geven aan of het water fecaal verontreinigd is, maar niet wat de herkomst van de verontreiniging is. Dat maakt het lastig om gerichte maatregelen te nemen. Dit tweejarige onderzoek, genaamd TRACER laat zien dat *Next generation sequencing* (NGS, 'DNA-fingerprinting') een vollediger beeld geeft van de microbiologische samenstelling van (drink) water, en van waar de verontreiniging vandaan kan komen. NGS kan dus worden ingezet voor bronopsporing van pathogene microbiologische verontreinigingen. Drinkwaterbedrijven kunnen op basis hiervan gerichte maatregelen nemen ter bescherming van de drinkwaterkwaliteit.