



## **Biologische fingerprinting biedt inzicht in verwijdering van medicijnen en zoetstoffen in rwzi's**

*Door Gerhard Wubbels (WLN), Hans de Vries (waterschap Noorderzijlvest), John Koop (waterschap Hunze en Aa's), Bonnie Bult (Wetterskip Fryslân), Peter van der Maas (WLN en Hogeschool VHL)*

Rioolwaterzuiveringen zijn de belangrijkste bron van geneesmiddelen en kunstmatige zoetstoffen in oppervlaktewater. De mate waarin rwzi's deze organische microverontreinigingen verwijderen, lijkt te variëren van locatie tot locatie en/of in de tijd. Oriënterend onderzoek bij zeven rwzi's in Groningen en Drenthe toonde aan dat de verwijdering van de zoetstof acesulfaam varieerde: van volledige verwijdering (>99%) op de rwzi in Assen tot minder dan 40 procent op de rwzi in Gieten [1]. Bovendien bleek dat de verwijdering van acesulfaam volledig is gebaseerd op biologische afbraak. Duits onderzoek heeft aangetoond dat de afbraak van acesulfaam sterk kan variëren in de tijd, maar dat er geen verband bestaat met de nitrificatiesnelheid en temperatuur [2].

Het grote verschil in acesulfaamverwijdering op rwzi's werpt mogelijk nieuw licht op de verwijdering van andere microverontreinigingen, zoals geneesmiddelen, in actiefslibsystemen. Op basis van een beperkte dataset lijken de zeven rwzi's in Noord- Nederland verschillend te presteren bij de verwijdering van geneesmiddelen. De verwijdering van geneesmiddelen lijkt dus, evenals die van acesulfaam, mede te worden bepaald door lokale factoren en condities [1].

Om het verschil in de biologische verwijderingscapaciteit voor acesulfaam en geneesmiddelen te kunnen verklaren, bieden nieuwe DNA-technieken wellicht uitkomst. In dit artikel laten we zien dat met Next Generation Sequencing (NGS) verschillen tussen bacteriepopulaties aan het licht komen die mogelijk verschillen in verwijdering van geneesmiddelen en zoetstoffen kunnen verklaren.

### **Slibonderzoek met NGS**

Van de rwzi's Assen en Gieten (waterschap Hunze en Aa's) zijn in april en juni 2017 monsters genomen van influent, effluent (24-uurs volume proportionele mengmonsters) en actief slib (steekmonsters). Van het influent en effluent zijn

de concentraties aan geneesmiddelen en zoetstoffen bepaald en het slib is geanalyseerd met NGS om de populatie aan micro-organismen vast te stellen. Bij de analyse van het slib is gekozen voor populatieonderzoek op DNA-niveau vanuit de gedachte dat verschillen in omzettingen in principe terug te voeren moeten zijn op verschillen in de bacteriepopulatie. Kortdurende veranderingen c.q. fluctuaties in activiteit kunnen beter inzichtelijk worden gemaakt door de NGS te focussen op RNA. In dat geval wordt meer informatie verkregen over de actieve micro-organismen en genen op dat specifieke moment. Hier onderzoeken we of inzicht in de bacteriepopulatie potentie biedt om het verschil in verwijdering voor bepaalde organische microverontreinigingen te verklaren.

De NGS-analyses zijn uitgevoerd door ORVION BV. De slibmonsters zijn bij afname geconserveerd in 75% DNA- en RNA-vrij ethanol en bewaard bij 4-8 °C. na homogenisatie is val elk monster 0,25 milliliter in behandeling genomen. DNA-extractie is uitgevoerd met een extractiekit van Qiagen. Het DNA is opgezuiverd volgens een protocol van ORVION BV en is daarna geconserveerd in 0,5 molair EDTA. De gevonden DNA-concentraties staan vermeld in tabel 1. Van genetisch materiaal dat uit het monster is geëxtraheerd zijn met de Minion™ (Oxford nanopore) de DNA-codes bepaald (sequencing). De verkregen DNA-codes zijn gebruikt voor identificatie van de micro-organismen in het slib.

Dit is gedaan door de DNA-codes te vergelijken met Operational Taxonomic Units (OTU's), oftewel soorten micro-organismen, in de online NCBI™ database. OTU's die minder dan 5 keer zijn aangetroffen zijn als ruis beschouwd en daarom niet meegenomen. Ook DNA-fragmenten van hogere organismen zijn verwijderd. Het aantal DNA-fragmenten dat zo per monster is geïdentificeerd staat weergegeven in tabel 1. Voor het analyseren en vergelijken van de OTU's uit de vier rwzi-slibmonsters is gebruik gemaakt van de microbiom analysetool Megan 6™, de open source community configuratie ontwikkeld door de universiteit van Tübingen, Duitsland [3].

Actiefslib RWZI	Datum bemonsterd	[DNA] (µg/ml)	DNA-fragmenten
Assen	20-4-2017	5,5	91.283
Assen	26-6-2017	4,8	70.765
Gieten	21-4-2017	5,8	57.978
Gieten	26-6-2017	5,1	96.280

*Tabel 1. Overzicht van de vier slibmonsters van de rioolwaterzuiveringen in Assen en Gieten, met de hoeveelheid geïsoleerd DNA per slibmonster en het bijbehorende aantal aangetroffen DNA-fragmenten. De DNA-fragmenten zijn vervolgens gekarakteriseerd met corresponderende sequenties van OTU's uit de NCBI-database.*

## **Populaties micro-organismen**

Het doel van dit onderzoek was om te onderzoeken of Next Generation Sequencing (NGS) een geschikte methode is om te bepalen welke bacteriepopulaties en welke biologische activiteit een rol spelen bij de afbraak van geneesmiddelen en zoetstoffen. Een belangrijk criterium hierbij is de aanwezigheid van een in de tijd constante bacteriepopulatie op de verschillende rwzi's. Daarnaast moet NGS eventuele veranderingen populaties ten gevolge van secundaire biologische processen kunnen detecteren. De opzet van dit onderzoek is te eenvoudig om vast te stellen welke micro-organismen verantwoordelijk zijn voor de afbraak van organische microverontreinigingen.

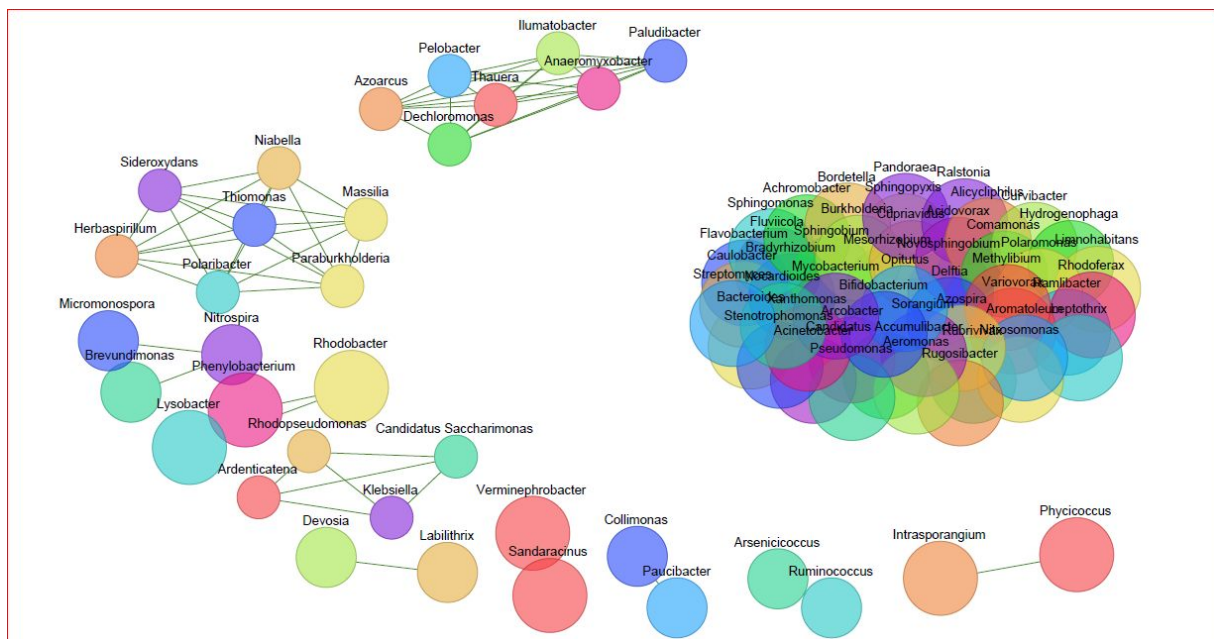
Er zijn verschillen in de verwijdering van geneesmiddelen en zoetstoffen tussen de rwzi's Assen en Gieten (Tabel 2). De rwzi in Assen heeft een hogere verwijdering dan die in Gieten. Daarnaast zijn ook verschillen geconstateerd in verwijdering tussen verschillende momenten in het jaar [1]. Beide rwzi's functioneren goed en boeken vergelijkbare resultaten bij de verwijdering van organische stof en stikstof.

Next Generation Sequencing geeft op allerlei niveaus van de taxonomie- boom informatie over de populatie. Het ontrafelen van NGS-data moet gepaard gaan met een duidelijk doel als het gaat om het taxonomische niveau van data-interpretatie. We hebben in dit onderzoek gekeken naar het gemeenschappelijk deel van de populaties dat verantwoordelijk is voor of betrokken bij nitrificatie op de rwzi. De verwachting was dat dit relatief constante populaties zijn die wellicht vergelijkbaar zijn.

In afbeelding 1 zijn de vaste populaties van de monsters uit Assen en Gieten weergegeven in een co-occurrence netwerk plot [5]. Dit is een grafische weergave van een verzameling datapunten die zijn geclusterd op basis van de mate van voorkomen. De lengte van de verbindingslijnen tussen de punten duidt de mate van verwevenheid aan – ze werken waarschijnlijk aan hetzelfde proces mee (bijv. nitrificatie). In dit onderzoek betekent dit dat micro-organismen zijn geclusterd met als criteria, de concentraties en in welke slibmonsters ze zijn aangetroffen. De grootste groep van micro-organismen is verzameld in één groot cluster met hoge dichtheid en de organismen zijn nauw aan elkaar verweven. De organismen in dit cluster komen in alle vier de monsters voor in een vergelijkbare dominantie. Om deze wolk heen zijn een aantal kleinere clusters van bacteriën die statistisch in meer of mindere mate gelinkt zijn maar niet in alle monsters in dezelfde dominantie voorkomen.

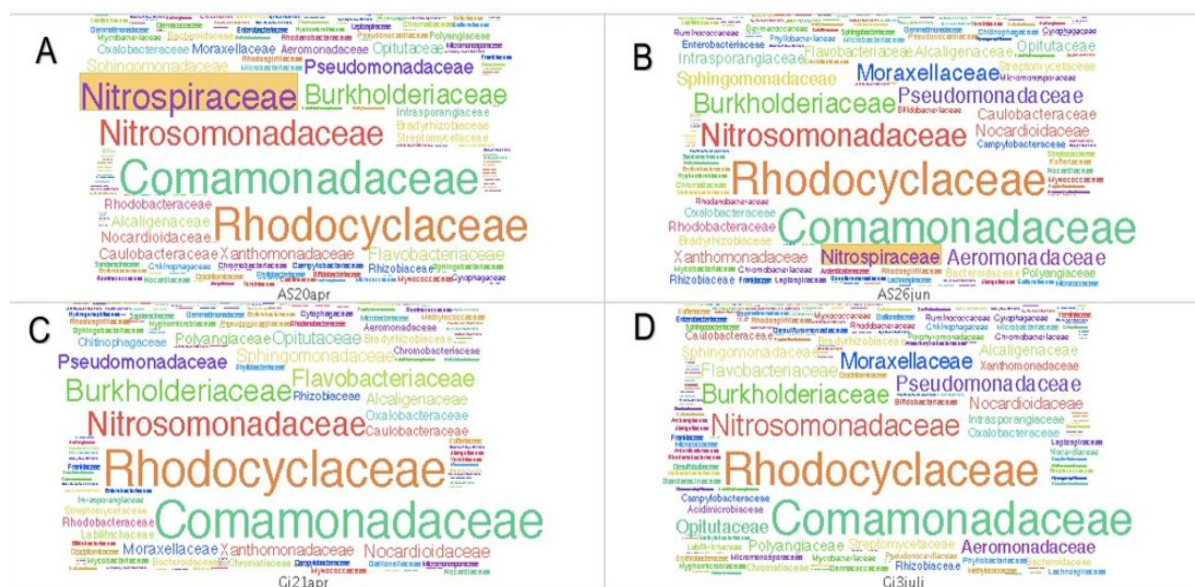
	Gieten		Assen	
	21-4-2017	3-7-2017	20-4-2017	26-6-2017
atenolol	78%	74%	94%	74%
caffeine	100%	99%	100%	69%
carbamazepine	12%	20%	<10%	<10%
diclofenac	39%	32%	44%	n.t.b.
dihydroxycarbamazepine	<10%	52%	15%	n.t.b.
gabapentine	59%	58%	47%	<10%
hydrochloorthiazide	<10%	n.t.b.	<10%	n.t.b.
ibuprofen	99%	98%	93%	34%
lidocaine	40%	n.t.b.	<10%	n.t.b.
metoprolol	26%	61%	26%	<10%
naproxen	99%	98%	98%	66%
paracetamol	100%	100%	100%	99%
propranolol	25%	51%	0%	27%
sotalol	29%	33%	7%	11%
sulfametoxazool	90%	n.t.b.	88%	n.t.b.
acesulfaam	<10%	61%	96%	64%
cyclamaat	99%	99%	99%	57%
saccharine	99%	98%	99%	66%
sucralose	15%	20%	10%	<10%

Tabel 2. Verwijdering van geneesmiddelen en zoetstoffen rwzi's Assen en Gieten; n.t.b. = niet te bepalen omdat de concentratie in het influent beneden de detectielimiet was.



Afbeelding 1. Co-occurrence netwerk plot populatie micro-organismen in slib rwzi Assen en Gieten (megan 6). De grootte van de afzonderlijke bollen geeft de relatieve hoeveelheid aan die in de monsters is aangetroffen.

Deze vorm van statistisch visuele presentatie geeft aan dat er een vast microbioom (grote cluster) aanwezig is in alle vier monsters, en dat dat cluster hoogstwaarschijnlijk ook verantwoordelijk zijn voor het biologische hoofdproces van omzetting van nutriënten. Next Generation Sequencing onderscheidt en detecteert zo een biologisch hoofdproces in de rwzi. Een andere vorm van presentatie is Word-view waarmee inzichtelijk wordt of er significante verschillen zijn tussen de verschillende monsters. In afbeelding 2 is te zien dat er bij de twee monsters van Assen een dominante groep van nitriet-oxiderende Nitrospiraceae aanwezig is die niet dominant voorkomt in de twee monsters van Gieten. Andere soorten nitrificeerders komen in beide rwzi's en op beide meetmomenten voor. Of Nitrospiraceae gelinkt kunnen worden aan de verwijdering van microverontreinigingen is niet te zeggen, daarvoor is een andere proefopzet nodig.



Afbeelding 2. Wordview bacteriepopulaties in RWZI-monsters; A=Assen 20 april, B=Assen 26 juni, C=Gieten 21 april en D= Gieten 3 juli.

## Conclusie

De resultaten van de Next Generation Sequencing analyses op DNA-niveau van de vier actiefslibmonsters laten zien dat het mogelijk is om verschillen in populaties zichtbaar te maken. Door gedurende een langere tijd deze DNA-resultaten te vergelijken met NGS op RNA-niveau, zouden processen gekarakteriseerd kunnen worden die afwijken van het hoofdproces (BZV en N-verwijdering). Het ontrafelen van factoren die verantwoordelijk zijn voor afbraak van medicijnen en/of zoetstoffen komt hiermee dichterbij. Dat geeft perspectief op de mogelijkheid om de afbraak te kunnen sturen. Vervolgonderzoek moet uitwijzen welke organismen of organismegroepen (microbioom) bijdragen aan afbraak van microverontreinigingen.

## REFERENTIES

- [1] Van der Maas, P, Bult, B, De Vries, H en Kluiving, O (2017), Verwijdering van Acesulfaam in rioolwaterzuiveringsinstallaties: Wat bepaalt het verschil. H2O-online , 17 juli-2017
- [2] Castronovo et al. (2017). Biodegradation of the artificial sweetener acesulfame in biological wastewater treatment and sandfilters. *Wat. Res.* 110, 342-353.
- [3] Vos van Steenwijk, A. de, Godschalk, F., Bommel, M. van en Loosdrecht, M. van (2017). Next-generation DNA-monitoringstechnieken voor het nieuwe zuiveren. H2O-Online, 9 januari 2017
- [4] Huson, D, Beier, S, Flade, I, Gorska, A, El-Hadidi, M, Mitra, S, Ruscheweyh, H, and Rewati Tappu, D (2016). MEGAN Community Edition - Interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data ; *PLoS Computational Biology*, 12(6):e1004957.
- [5] Freilich, Shiri; Kreimer, Anat; Meilijson, Isacc; Gophna, Uri; Sharan, Roded; Ruppin, Eytan (2010-02-27). "The large-scale organization of the bacterial network of ecological co-occurrence interactions". *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press (OUP). 38 (12): 3857–3868. doi:10.1093/nar/gkq118. ISSN 1362-4962