

KWR 2015.106 | December 2015

qPCR methoden voor het kwantificeren van fosfaat verwijderende bacteriën in RWZI's

Een verkennende studie

qPCR methoden voor het kwantificeren van fosfaat verwijderende bacteriën in RWZI's

Een verkennende studie

KWR 2015.106 | December 2015

Opdrachtnummer

400546/001

Projectmanager

Luc Palmen

Opdrachtgever

TKI

Kwaliteitsborger(s)

Paul van der Wielen

Auteur(s)

Leo Heijnen (KWR), Robin Kraan (RHDHV), Paul Janssen (RHDHV)

Verzonden aan

Jaar van publicatie
2015

Meer informatie

T +31-306069743
E leo.heijnen@kwrwater.nl

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



KWR 2015.106 | December 2015 © 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.

Samenvatting

Lozing van gezuiverd afvalwater met een hoog gehalte opgeloste nitraten en fosfaten op het oppervlaktewater, kan door sterke groei van bepaalde soorten (o.a. algen) zorgen voor verstoring van het ecosysteem en resulteren in afname van de biodiversiteit (eutrofiering). Om eutrofiering zoveel mogelijk te beperken is er binnen de huidige praktijk van afvalwaterzuivering veel aandacht voor vergaande biologische nutriëntenverwijdering waaronder biologische fosfaatverwijdering (Bio-P). Binnen dit Bio-P proces spelen twee groepen van micro-organismen een belangrijke rol: Phosphate Accumulating Organisms (PAO's) en Glycogen Accumulating Organisms (GAO's). PAO's zijn micro-organismen met een metabolisme waarmee fosfaat biologisch wordt vastgelegd en GAO's zijn micro-organismen met een gelijk metabolisme als PAO's en concurreren daarom voor hetzelfde substraat maar leggen daarbij geen fosfaat vast. Voor een optimale biologische fosfaatverwijdering zijn dus hoge concentraties PAO's nodig en moet worden voorkomen dat GAO's de microbiologische populatie gaan domineren.

Om het Bio-P proces te kunnen monitoren, optimaliseren en bij te sturen is de beschikbaarheid van eenvoudig uitvoerbare methoden waarmee de concentratie PAO's en GAO's kan worden gemeten van belang. Daarom is in deze verkennende studie de mogelijkheid voor het toepassen van qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) methoden onderzocht. Met qPCR methoden is het mogelijk om een kenmerkend fragment van het erfelijk materiaal (DNA) van specifieke micro-organismen in korte tijd te vermenigvuldigen en kwantificeren. Deze enzymatische kettingreactie vindt plaats na specifieke binding van synthetische DNA-moleculen (primers) aan het DNA van het "target organisme".

In de eerste fase van deze studie is literatuuronderzoek uitgevoerd waarmee is geïnventariseerd welke dominante bacteriegroepen een belangrijke rol spelen binnen het Bio-P proces. Uit dit onderzoek kwamen twee belangrijke bacteriegroepen naar voren: "Candidatus Accumulibacter phosphatis" als belangrijke groep PAO-bacteriën en "Candidatus Competibacter phosphatis" als belangrijke groep GAO-bacteriën. Vervolgens is onderzocht welke primers mogelijk toepasbaar zijn om het DNA van bacteriën uit de beide groepen te detecteren. Er is één primerpaar geselecteerd voor het detecteren van het DNA (16S rRNA gen) van bacteriën behorende tot de groep "Candidatus Competibacter phosphatis" en er zijn vier primerparen (twee specifiek voor het 16S rRNA gen en twee voor het gen wat codeert voor "polyfosfaat kinase") geselecteerd voor het detecteren van het DNA van bacteriën behorende tot de groep "Candidatus Accumulibacter phosphatis". De reactieomstandigheden van de qPCR's zijn geoptimaliseerd en er zijn nauwkeurig gekwantificeerde DNA suspensies ontwikkeld waarmee standaard curves kunnen worden gegenereerd t.b.v. kwantificatie.

De analyse van 12 actief slibmonsters, afkomstig van zuiveringsstappen waar biologische fosfaatverwijdering verwacht wordt en stappen waarbij dat niet verwacht wordt, geeft een eerste indicatie dat qPCR resultaten vrij goed overeenkomen met de verwachting en met de resultaten die verkregen worden met fosfaatafgiftetesten. Om beter inzicht te krijgen in de mogelijkheid van deze qPCR methoden wordt het uitvoeren van aanvullend onderzoek voorgesteld. In dit aanvullende onderzoek zullen meer qPCR metingen op slib van een groot aantal afvalwaterzuiveringen en metingen in een nauwkeurig gecontroleerde laboratoriumopstellingen kunnen zorgen voor beter inzicht in de toepassingsmogelijkheden van deze nieuwe methoden.

De resultaten van deze verkennende studie geven aan dat de onderzochte qPCR methoden veelbelovend zijn om snel en eenvoudig inzicht te krijgen in het Bio-P proces. Deze methoden zijn daarom mogelijk bruikbaar voor het monitoren en optimaliseren van biologische fosfaatverwijdering in afvalwaterzuiveringen.

Inhoud

Samenvatting	2
Inhoud	3
1 Inleiding	5
2 Achtergronden	7
2.1 Rioolwaterzuivering	7
2.2 Fosfaatverwijdering	8
2.3 qPCR methoden	12
3 Materiaal en methoden	15
3.1 Actief slibmonsters	15
3.2 Conventionele monitoring Bio-P	15
3.3 qPCR methoden	18
3.4 Klonering van qPCR fragmenten en sequentie analyse	19
4 Resultaten	20
4.1 Fase I: Literatuuronderzoek	20
4.2 Fase II: Optimalisatie van potentieel toepasbare qPCR methoden	24
4.3 Fase III: Toepassing van qPCR methoden op actief slibmonsters	26
4.4 Resultaten fosfaatafgiftetesten	29
5 Analyse resultaten qPCR testen met P-afgifte testen	35
6 Conclusies en aanbevelingen	38
6.1 Conclusies	38
6.2 Aanbevelingen voor vervolgonderzoek	38
7 Literatuur	40
Bijlage I qPCR metingen GAO- en PAO-bacteriën	42
• GAO-specifieke metingen met GAO-16S_KWR655	42
• PAO-specifieke metingen met PAO-16S_Accl	42
• PAO-specifieke metingen met PAO-16S_Accll	43
• PAO-specifieke metingen met PAO-ppk_IA	43
• PAO-specifieke metingen met PAO-ppk_IIA	44
Bijlage II vergelijking qPCR metingen met afgiftetesten 16 juni 2014	45

•	Vergelijking qPCR GAO 16S_KWR655 met afgifte testen	45
•	Vergelijking qPCR PAO 16S_Accl met P-afgifte testen	45
•	Vergelijking qPCR PAO 16S_AccII met P-afgifte testen	46
•	Vergelijking qPCR PAO 16S_ppk IA met P-afgifte testen	46
•	Vergelijking qPCR PAO 16S_ppk IIA met P-afgifte testen	47
	Bijlage III vergelijking qPCR metingen met afgiftetesten 21 oktober 2014	48
•	Vergelijking qPCR GAO 16S_KWR655 met afgifte testen	48
•	Vergelijking qPCR PAO 16S_Accl met P-afgifte testen	48
•	Vergelijking qPCR PAO 16S_AccII met P-afgifte testen	49
•	Vergelijking qPCR PAO 16S_ppk IA met P-afgifte testen	49
•	Vergelijking qPCR PAO 16S_ppk IIA met P-afgifte testen	50

1 Inleiding

Binnen de huidige praktijk van afvalwaterzuivering gaat veel aandacht uit naar het verkrijgen van vergaande en stabiele biologische nutriëntenverwijdering (nitraten en fosfaten). Lozing van afvalwater met een hoog gehalte nitraten en fosfaten op het oppervlaktewater, kan de groei van bepaalde soorten organismen sterk bevorderen en zorgen voor verstoring van het ecosysteem, dat kan resulteren in afname van de biodiversiteit (eutrofiëring). Daarom vormt stabiele biologische fosfaatverwijdering (Bio-P) een steeds belangrijker onderdeel van de afvalwaterzuivering en is er sterke behoefte aan goede en eenvoudige methoden waarmee inzicht kan worden gekregen in dit Bio-P proces. De huidige analysemethoden, waaronder slibactiviteitstesten en chemische wateranalyses, geven geen informatie over specifieke bacteriegroepen die betrokken zijn bij biologische fosfaatverwijdering in de afvalwaterzuivering. Hierdoor blijft de beoordeling van de (biologische) fosfaatverwijdering tijdens het actiefslibproces beperkt. Een meer specifieke en snel uitvoerbare methode is daarom nodig om bacteriën die betrokken zijn bij de biologische fosfaatverwijdering te kwantificeren, zodat het Bio-P proces in de afvalwaterzuivering verder kan worden geoptimaliseerd en beheerst.

Wetenschappelijke doorbraken op het gebied van de moleculaire biologie hebben geleid tot een ontwikkeling van moleculairbiologische technieken, waarmee (complexe) microbiologische processen in detail kunnen worden geanalyseerd en geoptimaliseerd. Kwantitatieve real-time polymerase-kettingreactie (qPCR) is een moleculairbiologische methode, waarbij vermeerdering en identificatie van een kenmerkend fragment van het erfelijk materiaal (DNA) van een geselecteerde micro-organisme of groep van micro-organismen plaatsvindt. Met deze techniek is het mogelijk om in korte tijd (ca. 4 uur) informatie te verkrijgen over de concentratie van het DNA van specifieke micro-organismen in een complexe microbiologische populatie. De qPCR-analysetechniek is beduidend eenvoudiger, sneller en minder arbeidsintensief dan bijv. een Fluorescent-In-Situ-Hybridisatie (FISH-analyse) of een slibactiviteitstest. Niettemin staat deze methodiek, voor wat betreft de toepassing in afvalwatersystemen nog in de kinderschoenen.

Identificatie en kwantificatie van Bio-P-micro-organismen in actiefslib met de qPCR-techniek lijkt op voorhand tot de mogelijkheden te behoren. Ook het onderscheiden van enerzijds Phosphate Accumulating Organisms (PAO's: micro-organismen met een metabolisme waarmee fosfaat biologisch wordt vastgelegd en die goed voor korrelvorming zijn) en anderzijds Glycogen Accumulating Organisms (GAO's: micro-organismen met een gelijk metabolisme als PAO's, die ook goed voor korrelvorming zijn, maar waarmee geen fosfaat biologisch wordt vastgelegd) lijkt met behulp van qPCR mogelijk.

Het doel van dit project was om qPCR methoden te ontwikkelen voor het kwantificeren van bacteriën die betrokken zijn bij de biologische fosfaatverwijdering en om de geschiktheid van deze methode te toetsen voor het vaststellen van kwantitatieve relaties tussen het vóórkomen van (dominante) PAO's en GAO's in de actiefslibmonsters en de mate van biologische fosfaatverwijdering. Het onderzoek is gefaseerd uitgevoerd waarbij de volgende fasen zijn gedefinieerd:

- Fase 1: Literatuuronderzoek.
- Fase 2: Testen en optimaliseren van potentieel toepasbare qPCR methoden voor identificatie en kwantificatie van PAO's en GAO's.
- Fase 3: Toepassen van deze qPCR methoden op actief slib van afvalwaterzuiveringen.

Het in dit rapport beschreven onderzoek is het resultaat van een samenwerking tussen RoyalHaskoningDHV en KWR waarbij de volgende verdeling van de werkzaamheden is toegepast:

- RoyalHaskoningDHV:
 - o Fosfaatafgiftetesten
 - o Selectie van afvalwaterzuiveringen voor bemonstering

- Verzamelen van afvalwatermonsters
- KWR:
 - Ontwikkeling qPCR methoden
 - qPCR analyses op afvalwatermonsters

2 Achtergronden

2.1 Rioolwaterzuivering

Verontreiniging in rioolwater dat voor een groot deel uit huishoudelijk afvalwater bestaat, kan worden onderverdeeld in een tweetal groepen, namelijk organische verbindingen zoals koolhydraten, proteïnen, vetten etc. die goed biologisch afbreekbaar zijn en anorganische bindingen zoals minerale zouten (fosfor- en stikstofverbindingen), zuren en basen. De stoffen in bovengenoemde groepen in afvalwater zijn aanwezig als zichtbare, onopgeloste stoffen zoals haren, papier en vetten of als opgeloste stoffen zoals suikers en zouten.

Om het gehalte aan verontreiniging weer te geven, bestaan een tweetal analysemethoden gebaseerd op het zuurstofverbruik. Het biologische zuurstofverbruik (BZV) en chemische zuurstofverbruik (CZV). Het BZV is de hoeveelheid zuurstof die nodig is om door middel van bacteriën de biologisch afbreekbare verbindingen in een bepaald volume water af te breken. Het CZV wordt bepaald aan de hand van de hoeveelheid zuurstof die wordt verbruikt bij het laten oxideren van de organische bindingen met bijvoorbeeld kaliumdichromaat.

In rioolwater komt ook stikstof voor in de vorm van ammonium (NH_4^+) en als bestanddeel in organische verbindingen. De som van de concentraties ammonium en organische gebonden stikstof wordt de Kjeldahl-stikstof (Nkj) concentratie genoemd. Naast stikstof komt ook fosfaat voor in rioolwater; dit voor het grootste deel in de opgeloste vorm van ortho-fosfaat (PO_4^{3-}) en het resterende deel als bestanddeel in organische bindingen. De gemiddelde samenstelling van huishoudelijk afvalwater in Nederland wordt weergegeven in tabel 1.

Parameter	CZV	BZV	Zwevende stof	Nkj (mg N/l)	P-totaal (mg P/l)
Concentratie (mg/l)	600	220	250	55	9

Tabel 1. Samenstelling van huishoudelijk afvalwater (bron: UTAZ cursus Wateropleidingen)

2.1.1 Zuiveringseisen aan effluent van rioolwaterzuiveringsinstallaties

Wanneer afvalwater met een hoog gehalte aan zuurstofverbruikende verontreiniging op oppervlaktewater wordt geloosd, breken aërobe bacteriën deze verontreiniging af. De zuurstof die deze aërobe bacteriën hiervoor nodig hebben, worden uit het water gehaald, waardoor een zuurstoftekort kan optreden voor de overige aerobe micro-organismen. Afvalwater met een hoog gehalte opgeloste nitraten en fosfaten dat op oppervlaktewater wordt geloosd, kan eutrofiëring veroorzaken. Door het hoge gehalte aan voedingsstoffen (fosfaten en nitraten) treedt er een sterke algengroei op, waardoor sloten en plassen dichtgroeien en het biologisch evenwicht wordt verstoord.

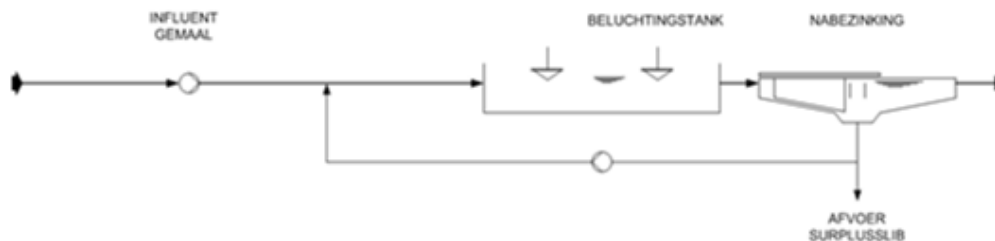
Om eutrofiëring en zuurstofloosheid in oppervlaktewater te voorkomen, zijn er zuiveringseisen voor de lozing van verontreinigd water ingesteld. Indien aan de zuiveringseisen van stikstof en fosfaat worden voldaan in het effluent van een zuiveringsinstallatie, wordt over het algemeen ook voldaan aan de effluenteisen voor BZV, CZV en zwevende stoffen. Dit vanwege het type biologische zuivering van afvalwater dat wordt toegepast in het actiefslibproces. De (jaar)gemiddelde effluenteisen voor rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) worden weergegeven in tabel 2.

Parameter	CZV	BZV	Zwevende stof	N-totaal (mg N/l)	P-totaal (mg P/l)
Concentratie (mg/l)	< 125	< 20	< 30	10-15	1-2

Tabel 2. Gemiddelde effluenteisen voor rwzi's

2.1.2 Bedrijfsvoering conventionele RWZI

De eerste stap in het zuiveringsproces van rioolwater is de roostergoedverwijdering; hierbij wordt grof vuil zoals hout, plastic e.d. uit het afvalwater verwijderd. De tweede stap in het zuiveringsproces is de zandverwijdering, waarbij zand wordt afgescheiden en verwijderd. Daarna volgt de voorbezinking, hierbij wordt zoveel mogelijk (organische) vaste stof verwijderd. Daarmee wordt in de voorbezinktank eveneens al een deel zwevende stof, CZV, BZV en N_{kj} verwijderd. Na de voorbezinktank wordt het voorbehandelde afvalwater (influent) naar de beluchtingstank geleid, waar het biologische zuiveringsproces start. Veruit de meeste RWZI's zijn gebouwd op basis van het continue actiefslibstelsysteem (Figuur 1), omdat met dit biologische proces kan worden voldaan aan de in Tabel 2 genoemde effluenteisen. Bij het actiefslibproces worden stikstof en fosfaat verwijderd met behulp van actiefslib. Actiefslib bestaat uit verschillende micro-organismen die met behulp van zuurstof of juist zonder zuurstof, stikstof en fosfaat kunnen verwijderen dan wel opnemen.



Figuur 1. Schematische weergave van een conventionele waterzuivering

In de beluchtingstank wordt het voorbehandelde influent gemengd met actiefslib, daarna wordt het water met actiefslib door de beluchtingstank verder geleid waar het actiefslib/influent mengsel deels belucht en deels onbelucht wordt doorgevoerd. Het afwisselend beluchten en niet beluchten van het actiefslib is noodzakelijk omdat sommige bacteriën in het actiefslib zuurstof (of nitraatgebonden) zuurstof 'verademen' tijdens hun omzettingproces, andere bacteriën hebben juist een zuurstofloze omgeving nodig. In de beluchtingstank, waar het slib deels belucht en deels onbelucht doorstroomt, vindt de stikstof en fosfaatverwijdering plaats d.m.v. nitrificatie, denitrificatie en fosfaatafgifte en -opname.

Na verblijf in de beluchtingstank, volgt de nabehandeling. Dit gebeurt in grote nabezinktanks, waar het actiefslib van het gezuiverde water (effluent) wordt gescheiden. Kenmerkend aan het actiefslibproces is dat het bezonken slib grotendeels als retourslib wordt teruggevoerd naar de beluchtingstank waar het weer opnieuw aan het zuiveringsproces deelneemt. Een klein deel van het retourslib wordt afgevoerd als overtollig (surplus) slib naar de slibverwerking.

2.2 Fosfaatverwijdering

Fosfaat kan biologisch en/of chemisch worden verwijderd. Bij chemische fosfaatverwijdering vindt voorprecipitatie in de voorbezinktanks plaats. Hierbij wordt ijzerchloride of

aluminiumzout gedoseerd in de influent-toevoer, waar het fosfaat mee neerslaat. Daarna bezinkt het gezamenlijk met de organische vaste stof in de voorbezinktanks. Het is ook mogelijk de chemicaliën aan het actiefslib te doseren (simultane precipitatie) waarbij het fosfaat chemisch neerslaat en met het actiefslib (het surplusslib) wordt afgevoerd. In deze paragraaf wordt verder alleen ingegaan op de biologische fosfaatverwijdering.

Het biologische fosfaatverwijderingsproces, ook wel Bio-P proces genoemd, is een complex proces binnen het actiefslibstelsel. Naast processen die verbonden zijn aan het Bio-P proces vinden er namelijk ook allerlei andere microbiologische processen tegelijkertijd plaats zoals hydrolyse, verzuring, nitrificatie en denitrificatie in een actiefslibproces. Deze andere processen kunnen een duidelijke invloed hebben op de kenmerken en het gedrag van de bacteriën die in staat zijn om in fosfaat in verhoogde mate op te nemen.

Het Bio-P proces berust op het principe dat bepaalde bacteriën in staat zijn om grote hoeveelheden opgelost (ortho-) fosfaat als onopgelost polyfosfaat in hun cel op te slaan. Hierbij kan het polyfosfaat worden gezien als een fosfaat- of energiereserve die de Bio-P bacteriën onder bepaalde procesomstandigheden in het actiefslibproces een groeivoordeel geven ten opzichte van de overige bacteriën in het actiefslib.

Er zijn twee bacteriesoorten/ groepen die in staat zijn fosfaat in verhoogde mate op te nemen.

- 1) Poly-P-organismen. Deze organismen slaan fosfaat op in de vorm van poly-P voor 'maintenance' doeleinden onder aërobe omstandigheden. Voorbeelden hiervan zijn de *Acinetobacter* en *Microthrix parvicella*.
- 2) Fosfaataccumulerende organismen (PAO's). Dit zijn organismen die onder invloed van substraatopname in de anaërobe fase, fosfaat in de vorm van polyfosfaat opslaan in de anoxische en/of aërobe fase.

Beide groepen zijn heterotrofe bacteriën. Heterotroof betekent dat ze organische stof als voeding nodig hebben naast energie voor groei. Tijdens een anaërobe periode kunnen beide groepen overleven omdat ze een polyfosfaatreserve bezitten. De PAO's worden echter dominant ten opzichte van de poly-P-organismen en andere bacteriën in de anaërobe periode, omdat ze met de energie uit het polyfosfaat substraat (lagere vetzuren) kunnen opnemen. De PAO's zijn in feite de bacteriën waarop het Bio-P proces berust.

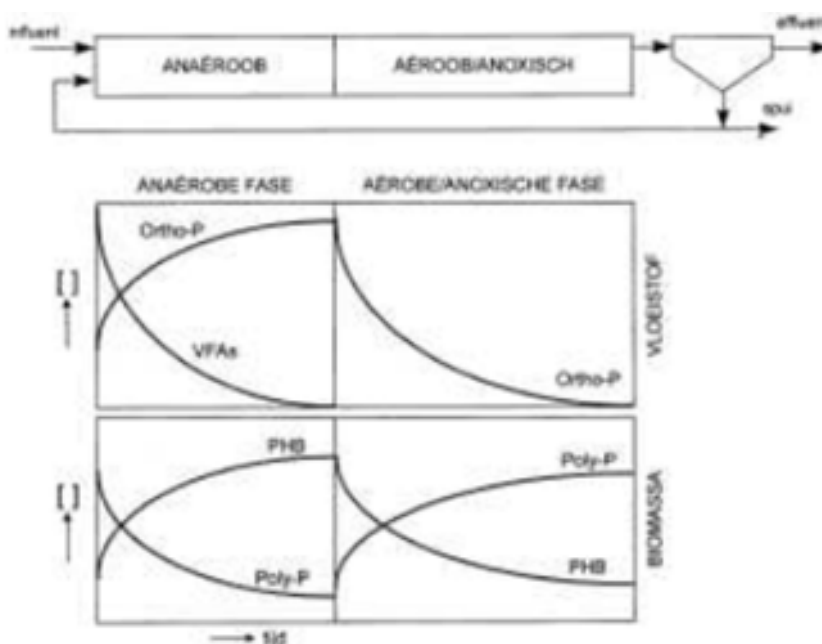
Het acetaat of de lagere vetzuren die door PAO's kunnen worden opgenomen zijn aanwezig in het afvalwater, of worden gevormd door hydrolyse- en/ of verzuringprocessen in de anaërobe fase. Bij de hydrolyse worden namelijk complexe organische verbindingen zoals zetmeel, eiwitten en vetten omgezet in eenvoudige oplosbare stoffen zoals suikers, aminozuren en glycerine. Vervolgens vindt een omzetting plaats in organische zuren en waterstofgas. Bij het verzuringproces worden hogere organische zuren omgezet in lagere organische vetzuren, methanol, waterstof en kooldioxide. Vaak hebben de hydrolyse en verzuringsprocessen al plaatsgevonden in het aanvoerstelsel, riolering, naar de RWZI.

2.2.1 Principe Bio-P proces

De werking van het Bio-P proces is als volgt; tijdens het mengen van influent met actiefslib in een strikt anaërobe fase nemen de PAO's substraat op in de vorm van acetaat of andere lagere vetzuren en zetten dit om in een koolstofreserve, zoals poly-hydroxyalkanoaten (PHA). Een voorbeeld van deze koolstofreserve is polyhydroxybutyraat (PHB). Naast PHB wordt ook poly-hydroxyvaleriaat (PHV) gevormd, maar in het vervolg wordt deze koolstofreserve aangeduid met enkel de term PHB. De benodigde energie voor de substraatopname en -conversie komt vrij bij de splitsing (hydrolyse) van het opgeslagen polyfosfaat, wat op zijn beurt resulteert tot een fosfaatafgifte in de vloeistoffase in de vorm van ortho-fosfaat.

Onder aërobe of anoxische omstandigheden wordt de koolstofreserve, het zogenaamde PHB, met behulp van zuurstof of nitraat omgezet tot energie in de vorm van ATP. Het ortho-fosfaat uit de vloeistoffase wordt door de PAO's opgenomen m.b.v. deze vrijgekomen energie, waarna het ortho-fosfaat als polyfosfaat in de cel wordt opgeslagen. Hierbij vindt groei van de PAO's plaats (Figuur 2).

Ten opzichte van een zuiveringsproces waarbij geen Bio-P plaatsvindt, neemt het P-gehalte in het slib toe bij een Bio-P proces. Kenmerkend voor een zuiveringsproces met Bio-P is de aanwezigheid van een strikt anaerobe fase, bijvoorbeeld een separate, niet beluchte tank.



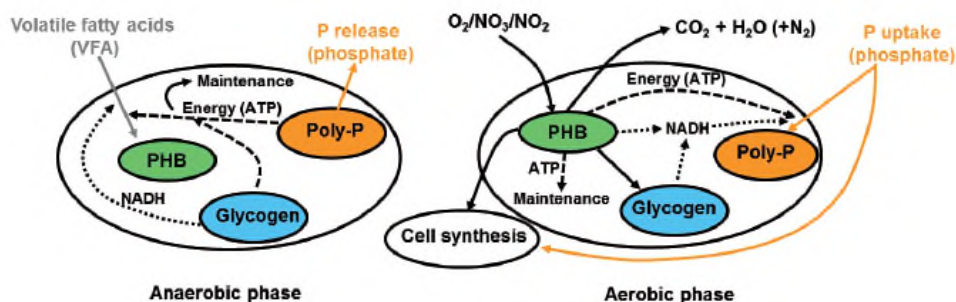
Figuur 2. Schematische weergave van het proces van fosfaat-afgifte en -opname in een afvalwaterzuivering (13).

Als gevolg van de netto groei van de PAO's wordt met het afvalwater binnenkomend fosfaat verwijderd. Door het constant houden van de slibhoeveelheid in het actiefslibproces, door het afvoeren van surplusslib en daarmee ook PAO's wordt fosfaat in opgeslagen vorm uit het zuiveringssysteem verwijderd.

2.2.2 Biochemie van het Bio-P proces

Bij het Bio-P proces spelen drie belangrijke opslagverbindingen een rol; polyfosfaat, glycogeen en PHA. Het PHA komt voornamelijk voor in de vorm van PHB.

De biochemische processen die plaats vinden binnen een PAO, onder anaërobe en aërobe omstandigheden worden weergegeven in figuur 3.



Figuur 3. Schematische weergave van de biochemische processen die er plaats vinden bij PAO's

Onder anaërobe omstandigheden wordt acetaat opgenomen, omgezet naar en opgeslagen in de vorm van PHB. Om acetaat om te zetten tot de gereduceerde polymere verbinding PHB, is energie nodig. De energie die hiervoor wordt gebruikt is aanwezig in de vorm van NADH₂, deze energieverbinding wordt in de cel van een PAO gevormd tijdens de omzetting van de opslagstof glycogeen tot PHB. Om glycogeen om te zetten tot PHB is ook energie nodig, de hiervoor benodigde energie (in de vorm van ATP) wordt verkregen uit de hydrolyse van polyfosfaat. De splitsing van polyfosfaat resulteert in een afgifte van ortho-fosfaat aan de vloeistoffase.

Onder aërobe of anoxische omstandigheden wordt het PHB in de cel geoxideerd tot CO₂ waarbij NADH₂ vrijkomt. Met behulp van zuurstof of nitraat wordt de NADH₂ omgezet tot ATP. De gevormde ATP, wordt hierna door de PAO gebruikt als energie voor groei, om ortho-fosfaat op te slaan tot polyfosfaat en om glycogeen te vormen.

De vorming van glycogeen tijdens de aërobe of anoxische fase is essentieel, omdat dit de bron is voor de vorming van NADH₂ dat nodig is voor de omzetting van acetaat tot PHB tijdens de anaërobe fase.

Het Bio-P proces kenmerkt zich door een cyclische opslag en verbruik van glycogeen en polyfosfaat, gedurende afwisselend aërobe/ anoxische en anaërobe fasen.

2.2.3 Invloeden op het Bio-P proces

De temperatuur heeft een directe en indirecte invloed op het Bio-P proces. Over het algemeen kan worden opgemerkt dat bij verhoogde procestemperaturen de fosfaatafgifte- en opnamesnelheden toenemen (direct), evenals de omzettingssnelheden van de nitrificatie, denitrificatie en het verzuringproces (indirect).

Limiterende stoffen van binnen uit de PAO's tijdens de fosfaatafgifte kunnen zijn: glycogeen, acetaat en/ of poly-P.

De aanwezigheid van nitraat en zuurstof hebben een positieve als negatieve invloed op het Bio-P proces. Enerzijds zijn beide noodzakelijk om fosfaat biologisch op te slaan in de aërobe of anoxische periode. In de anaërobe fase kunnen zuurstof en nitraat (bevat gebonden zuurstof) storend werken op het Bio-P proces doordat als gevolg van denitrificatie en zuurstofverbruik het acetaat zal worden weggenomen dat daarmee niet meer beschikbaar is voor PAO's.

De slibbelasting en slibleeftijd van een actiefslibproces hebben ook grote invloed op het Bio-P proces. Een hoge slibbelasting resulteert in een lagere slibleeftijd. Een lagere slibleeftijd

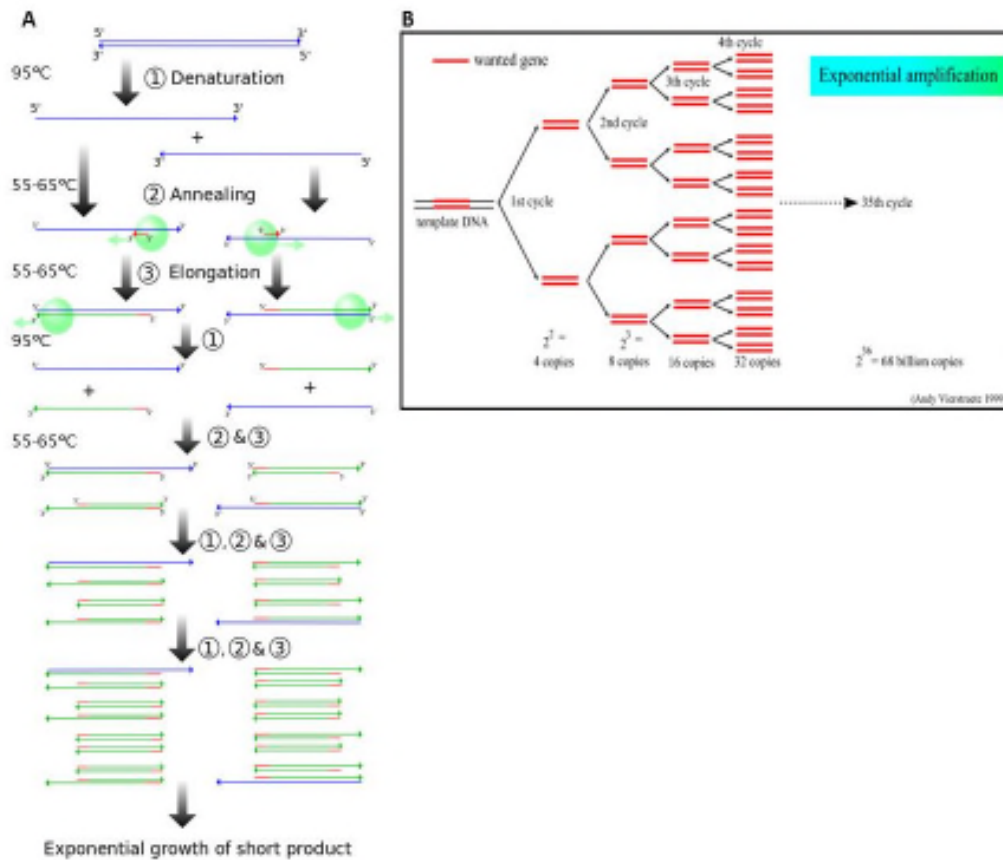
leidt tot verminderde nitrificatie, waardoor de remming van het Bio-P proces door nitraat wordt verminderd. Anderzijds neemt bij een lagere slibleeftijd de slibproductie toe, waardoor de afvoercapaciteit van fosfaat via het slib, inclusief de PAOs, toeneemt.

2.3 qPCR methoden

Met qPCR-methoden is het mogelijk om een kenmerkend fragment van het erfelijk materiaal (DNA) van de te detecteren organismen in korte tijd tot grote hoeveelheden te vermenigvuldigen en kwantificeren. Voor deze vermenigvuldiging worden korte synthetische DNA moleculen (primers) gebruikt. De DNA-sequentie (volgorde en samenstelling van de individuele bouwstenen van het DNA: A, C, G en T) van deze primers is zodanig gekozen dat ze alleen kunnen binden aan een specifiek DNA-fragment van het te detecteren organisme. Onder invloed van cyclische temperatuurswisselingen (wisselingen tussen 95°C en 55-65°C) vindt, d.m.v. een enzymatische reactie, exponentiële vermeerdering van het kenmerkende DNA-fragment plaats. Figuur 4A is een schematische weergave van de verschillende stappen die plaatsvinden tijdens elke cyclus van het PCR-proces:

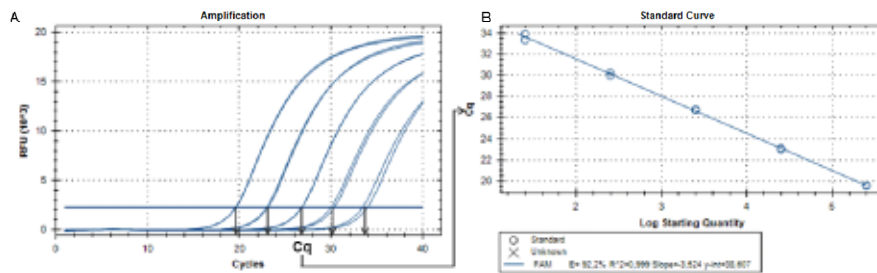
- 1) Onder invloed van hoge temperatuur (95°C) vindt denaturatie plaats van het DNA waarbij het dubbelstrengs DNA twee enkele strengen vormt.
- 2) Bij een lagere temperatuur (55-56°C) zullen de synthetische primers selectief binden aan een kenmerkend fragment van het te detecteren organisme (annealing).
- 3) Na binding van de primers zal het enzym Taq polymerase individuele DNA-bouwstenen (A, C, G, T) gebruiken om een copy te maken van het kenmerkende DNA-fragment.
- 4) Vervolgens wordt het cyclische proces herhaald waarbij weer begonnen wordt met stap 1 (denaturatie bij 95°C).

Tijdens elke herhaling van dit proces (cyclus) vindt een verdubbeling van de concentratie van het kenmerkende DNA-fragment plaats resulterend in een kettingreactie waarbij exponentiële vermeerdering van het DNA-fragment plaats vindt tot ca. 2^{36} fragmenten na het uitvoeren van 35 cycli, zie Figuur 4B.



Figuur 4. De individuele stappen die plaats vinden tijdens elke cyclus van het PCR-proces (A) en het resultaat van de cyclische uitvoering van de verschillende stappen (B).

De toevoeging van een kleurstof die gaat fluoresceren na binding aan dubbelstrengs DNA (SYBR-green) of de toevoeging van synthetische fluorescente DNA-moleculen (probes) aan de PCR-reactie maakt het mogelijk om de vorming van het kenmerkende DNA-fragment al tijdens de PCR-reactie waar te nemen, door meting van fluorescentielicht ("Real-time-PCR"). Monitoring van het fluorescentielicht tijdens de PCR-reactie resulteert in de vorming van een amplificatiecurve (Figuur 5A) waarbij het aantal cycli dat nodig is voor het genereren van een detecteerbare hoeveelheid fluorescentielicht (C_q, quantification Cycle) afhankelijk is van de concentratie DNA aan het begin van de PCR-reactie.



Figuur 5. Resultaat van PCR reacties uitgevoerd op een verdunningsreeks van specifiek DNA in aanwezigheid van de fluorescente kleurstof SYBR-green (A). De verkregen Cq waarden worden, t.b.v. kwantificatie, gebruikt voor het genereren van een ijklijn (B).

Deze eigenschap wordt gebruikt om kwantificatie mogelijk te maken. Voor kwantificatie worden Real-time PCR metingen uitgevoerd op een verdunningsreeks van DNA suspensies met bekende concentraties (ijklijnsuspensies) waarbij voor elke verdunning Cq waarden worden verkregen (Figuur 5A). Voor het genereren van een ijklijn die bruikbaar is voor het kwantificeren van concentraties in onbekende monsters worden de Cq waarden uitgezet tegen de logaritme van de bekende concentraties uit de ijklijnsuspensies (Figuur 5B). Deze ijklijn wordt gebruikt om op basis van de Cq waarde van de monsters te bepalen wat de concentratie is in de onbekende monsters (qPCR).

3 Materiaal en methoden

3.1 Actief slibmonsters

Er zijn op twee data (16 juni en 31 oktober 2014, tabel 3) door Royal HaskoningDHV actiefslibmonsters bij verschillende RWZI's verzameld in monsterpotjes met een volume van ca. 250 ml en gekoeld getransporteerd naar KWR en naar Royal HaskoningDHV. Binnen 24 uur na aankomst is uit een klein volume van deze monsters DNA geïsoleerd in het laboratorium van KWR en zijn bij Royal HaskoningDHV slibactiviteitstesten uitgevoerd.

KWR monstercode	Datum	Herkomst	RHDHV code op de fles
Eerste serie			
M141589	16-6-2014	RWZI-Utrecht Trap-B	B
M141591	16-6-2014	RWZI-Zeist	RWZI-Zeist
M141592	16-6-2014	RWZI-Bunnik	RWZI-Bunnik
M141588	16-6-2014	RWZI-Utrecht Trap-A	A
M141590	16-6-2014	Nereda Utrecht	PNU
Tweede serie			
M143608	21-10-2014	Sharon Garmerwolde	Sharon Garmerw.
M143609	21-10-2014	Utrecht B1	Utrecht B1
M143610	21-10-2014	N-trap Straat 3 Garmerwolde	N-trap Straat 3 Garmerw.
M143611	21-10-2014	Bunnik	Bunnik
M143612	21-10-2014	Nereda Utrecht	Nereda Utrecht
M143613	21-10-2014	RWZI Zeist	Zeist
M143614	21-10-2014	Garmerwolde Nereda	Nereda Garmerw.

Tabel 3. Overzicht actief slibmonsters

3.2 Conventionele monitoring Bio-P

Om iets te kunnen zeggen over de performance van de PAO cultures in afvalwaterzuiveringsinstallaties waarin het Bio-P proces wordt gehanteerd, wordt meestal volstaan met analyse van fosfaatconcentraties in het influent en effluent. Voor meer inzicht kan de fosfaatfractie van het actief slib worden bepaald. Mocht de werking van het Bio-P proces in voornoemde installaties nog zorgvuldiger geanalyseerd moeten worden, dan gebeurt dit over het algemeen middels activiteitstesten aan het actiefslib.

3.2.1 Doel

Om meer duidelijkheid te verkrijgen over de activiteit van PAO's in een Bio-P proces kunnen P-afgifte- en P-opnametesten worden uitgevoerd.

Via deze testen, die als batchtest worden uitgevoerd, kunnen de maximale P-afgiftesnelheid onder anaërobe omstandigheden en de maximale P-opname en P-opnamesnelheid onder aërobe en anoxische omstandigheden van een biologisch defosfaterend slib worden vastgesteld.

De volgende testen kunnen worden onderscheiden:

- anaërobe P-afgiftetest;
- aërobe P-opnametest;
- anoxische P-opnametest;
- endogene P-afgiftetest (= anaërobe P-afgiftetest zonder dosering van extern substraat).

In het kader van dit onderzoek is alleen gebruik gemaakt van anaerobe P-afgiftetesten.

Hierna wordt ingegaan op achtereenvolgens de benodigdheden, het in bewerking te nemen slibmonster en de werkwijze van de vier testen. Indien nodig wordt, via een letter, verwezen naar "**Opmerkingen bij de uitvoering**".

3.2.2 Benodigdheden

- proefvaten met mogelijkheid tot mengen (C);
- voorziening om een proefvat te beluchten, bijvoorbeeld een aquariumpompje met een beluchtingselementje;
- acetaat in de vorm van geconcentreerde, op neutrale pH gebrachte, natriumacetaatoplossing; nitraat in de vorm van een geconcentreerde, op neutrale pH gebrachte, natriumnitratoplossing;
- pH-meter (E);
- zwavelzuur en natronloog voor pH-correctie (E);
- zuurstofmeter;
- materiaal voor monsternamen en monsterconservering, zoals monsterbuizen, trechter, zwartbandfilters, stopwatch en koelvoorzieningen (G);
- analyseapparatuur ter bepaling van ortho-fosfaat, nitraat, nitriet, drogestof en asrest (H).

Eventueel:

- stikstofgas voor het vermijden van zuurstofinslag in de proefvaten (F);
- waterbad voor uitvoering van experimenten bij constante temperatuur (D);
- membraanfilter (0,45 µm) en analyseapparatuur (gaschromatograaf) voor acetaatbepaling (I).

3.2.3 Slibmonster

Neem voor het experiment actief slib uit de beluchtingsruimte, bij voorkeur bij de overstort naar de nabezinktanks, of retourslib (A, B).

3.2.4 Werkwijze

De werkwijze die voor de uitvoering van de verschillende testen moet worden gevolgd, is hierna stapsgewijs beschreven.

Werkwijze anaërobe P-afgiftetest

- 1) Vul het proefvat met slib. Belucht het slib, afhankelijk van de bewaartijd (A). Meet de pH en corrigeer indien nodig (E). Neem een monster voor drogestof- en eventueel een asrestbepaling.
- 2) Doseer een overmaat aan acetaat; ongeveer 150 mg CZV/g. d.s. Schat daartoe vooraf het gehalte aan drogestof. Roer het slib (let op F!).
- 3) Neem een monster op tijdstip $t = 0$. D.w.z. ná het eventueel beluchten van stap 1 maar vóórdat het acetaat wordt gedoseerd in stap 2.
- 4) Neem vervolgens monsters op $t = 15, 30, 60, 90$ en 120 minuten. Filtreer de monsters direct en bepaal het ortho-fosfaat in het filtraat (G). Neem eventueel monsters voor een acetaatbepaling (I).

Opmerkingen bij de uitvoering

- A. Bij voorkeur dient het experiment zo spoedig mogelijk na de monsternamen van het slib te worden uitgevoerd. Bij transport van slib (maximaal enkele uren) dient het slib 15 tot 30 minuten te worden belucht, alvorens het acetaat wordt gedoseerd (stap 1). Indien het slib langer wordt overgehouden, bijv één nacht, dient het slib onbelucht en zonder voeding te worden bewaard. Bij de uitvoering van het experiment op de volgende dag dient het slib 30 tot 60 minuten te worden belucht alvorens het acetaat kan worden gedoseerd.

- B. Gunstig voor uitvoering van de anaërobe afgiftetest is als het uitgangsslib géén of slechts enkele milligrammen nitraat ($< 3 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$) bevat. Een nacht "overhouden" van het slib heeft als voordeel dat eventueel aanwezig nitraat wordt gedenitrificeerd.
- C. Voor de uitvoering van enkel de anaërobe P-afgiftetest of de endogene afgiftetest is één proefvat nodig. Bij uitvoering van een gecombineerde anaërobe P-afgifte en P-opnametest zijn minimaal twee vaten nodig. Voer de testen uit met voldoende slib, minimaal 1 liter per test.
- D. Indien mogelijk kunnen de experimenten bij een constante temperatuur worden uitgevoerd. Met plaatsing van de proefvaten in een waterbad met constante temperatuur kan dit worden bereikt. In ieder geval dient de begin- en eindtemperatuur tijdens het experiment te worden gemeten.
- E. De pH beïnvloedt de P-afgifte (zie par. 2.7. van het handboek) Tijdens de afgiftetesten dient de pH dan ook op een constant niveau te worden gehouden ($\pm 0,1 \text{ pH eenheid}$). Neem als start-pH de pH-waarde waarbij het actiefslibproces in de praktijk wordt bedreven. Corrigeer indien noodzakelijk met (geconcentreerd) zwavelzuur of natronloog. Let op: een hoge pH ($> 7,5\text{-}8,0$) kan aanleiding geven tot precipitatiereacties. In dat geval moeten de uitkomsten voorzichtig worden geïnterpreteerd.
- F. Zuurstofinslag in de proefvaten tijdens de anaërobe en endogene afgiftetest en de anoxische opnametest stoort het Bio-P metabolisme. Om dit te voorkomen dient of het slibmengsel, of de bovenstaande luchtlaag, met stikstof te worden doorblazen. Een adequate afdekking met een drijvend plaatje polystyreen, met diameter die gelijk is aan de diameter van het vat, is ook mogelijk.
- G. Indien de monsters niet direct worden geanalyseerd, dienen ze na filtratie gekoeld te worden weggezet. Indien de analyses de volgende dag plaatsvinden, dient het filtraat te worden geconserveerd met enkele druppels zwavelzuur (18M). De monsters voor de fosfaatbepaling dienen niet te worden ingevroren.
- H. Nitriet stoort de ortho-fosfaatbepaling. Normaliter zullen de nitrietgehalten op een laag niveau liggen ($< 1 \text{ à } 2 \text{ mg/l}$). Dit dient echter gecontroleerd te worden.
- I. Filtreer een deel van het filtraat van de genomen monsters ook over een membraan ($0,45 \mu\text{m}$) ten behoeve van een acetaatbepaling. Conserveer deze monsters in de vriezer (niet aanzuren !).

[Bron: STOWA Handboek Biologische Fosfaatverwijdering. 2001 P.M.J. Janssen, H.F.R. van der Roest, K.M Meinema-Linders]

3.2.5 Uitwerking

- Bereken de afgifte en/of opname als mg P per g droge of organische stof en zet de punten grafisch uit. Geef eventueel ook de afname van de acetaat en/of nitraatconcentratie weer in de grafiek, uitgedrukt als mg CZV dan wel N per g droge stof of organische stof.
- Bereken de maximale afgifte- dan wel opnamesnelheden. Hiervoor worden de beginsnelheden, d.w.z. de steile delen van de curven in beschouwing genomen. Een redelijk lineaire lijn met minimaal 3 meetpunten voldoet daarbij .

3.3 qPCR methoden

3.3.1 Extractie van DNA

Voor de extractie van DNA uit afvalwatermonsters is voor elk monster een volume (0,1-1 ml) eerst verdund in 100 ml gedestilleerd "PCR-grade" gedestilleerd water en aansluitend gefiltreerd over polycarbonaat membraanfilters (Track-edge filters, Sartorius) met een poriëgrootte van 0,2 µm en een doorsnede van 4,5 cm. Voor extractie van DNA uit de, op de filters, geconcentreerde organismen is het filter opgevouwen en overgebracht naar een bead-bead buisje (met hierin keramische beads van verschillend formaat en een lysis buffer) van de PowerBiofilm Kit van de firma MoBio (MoBio, USA). Een "inhibitie en recovery" controle (IC, zie 2.2.3) is aan de lysis buffer toegevoegd. Een bead-bead stap, waarin de buisjes zeer krachtig worden geschud waardoor de keramische beads met grote snelheid door het monster worden bewogen, zorgt in combinatie met de lysis buffer voor het open breken van de cellen en het vrijkomen van (o.a.) het DNA. Aansluitend wordt via een affiniteitskolom het DNA gezuiverd van celresten en monstercomponenten. Ten slotte wordt het DNA geëluëerd van de affiniteitskolom in een volume van 200 µl. De stappen die zijn genomen voor het zuiveren van het DNA zijn uitgevoerd zoals in het protocol van MoBio staat beschreven.

3.3.2 qPCR reacties

De polymerase ketting reactie (PCR) is een enzymatische reactie waarmee, onder invloed van nauwkeurig gecontroleerde temperatuurwisselingen (cycli), een kenmerkend DNA-fragment (merker) tot hoge aantallen wordt vermenigvuldigd. Met behulp van korte synthetische DNA-moleculen (primers) met een DNA-volgorde (sequentie) die zeer specifiek is voor een bepaald bacterietype kan in de PCR een DNA-fragment van dit bacterietype selectief worden vermenigvuldigd. In tabel 4 staat de informatie van de in dit onderzoek toegepaste primers weergegeven. Alle toegepaste primers zijn gesynthetiseerd door "Integrated DNA Technologies" (IDT, Leuven, België).

Naam methode	Namen Primers	Target Gen	Fragment Lengte (bp)	Referentie
GAO-specifiek				
GAO_16S	GAOQ431 GAOQ989	16S rRNA	558	(2)
GAO-16S_KWR655	GAOQ431 GAO-16S_KWR655	16S rRNA	224	(2) Dit onderzoek
PAO-specifiek				
PAO-16S_Accl	PAO-16S_AcclA-F PAO-16S_AcclA-R	16S rRNA	211	(8)
PAO-16S_AcclI	PAO-16S_AcclIA-F PAO-16S_AcclIA-R	16S rRNA	213	(8)
PAO-ppk_IA	Acc-ppk1-763F Acc-ppk1-1170R	Polyphosphaat Kinase	408	(8, 9, 11)
PAO-ppk_IIA	Acc-ppk1-893F Acc-ppk1-997R	Polyphosphaat Kinase	105	(8, 9, 11)

Tabel 4. Toegepaste qPCR methoden

Voor het uitvoeren van kwantitatieve RT-PCR reacties wordt gebruik gemaakt van een reactiemengsel waarin de componenten die nodig zijn voor de qPCR-reactie (buffer, het enzym Taq polymerase, MgCl₂, dNTP's en SYBR-green als fluorescente kleurstof) al door de fabrikant van de kit zijn gemengd (BioRad "SYBR-green Master mix"). Aan 25 µl mengsel van

de kit worden specifieke primers en 10 µl van het geïsoleerde DNA toegevoegd en het volume wordt met "PCR-grade" H₂O op een reactiemengsel met een volume van (in totaal) 50 µl gebracht. Aansluitend wordt de PCR reactie uitgevoerd: 5 min bij 95°C voor het activeren van het enzym gevolgd door 40 cycli waarbij de temperatuur bij elke cyclus wisselt van 95°C (20 sec) naar 55-60°C (1 min.). De sterkte van het fluorescentielicht wordt, voor ieder monster, aan het einde van elke cyclus gemeten en uitgezet in amplificatiecurves (aantal cycli/fluorescentiesterkte).

3.3.3 Rendement en Inhibitie controle (IC)

Het rendement van de DNA-isolatie en de eventuele aanwezigheid van remmende stoffen in het DNA van de monsters is bepaald door aan elk monster een interne controle (IC) toe te voegen en hiervan de opbrengst te bepalen. Het IC-DNA bestaat uit een suspensie met een bekende hoeveelheid plasmide-DNA. Dit plasmide-DNA bevat een uniek DNA-fragment wat niet aanwezig is in watermonsters. Voor detectie van dit unieke fragment zijn primers en een probe ontworpen. Met deze primers en probe is het mogelijk om het unieke DNA-fragment te amplificeren en kwantitatief te detecteren. Door dit plasmide-DNA aan elk monster toe te voegen en de concentratie ervan (na extractie van DNA) te bepalen en te vergelijken met eenzelfde hoeveelheid plasmide-DNA dat geen extractiestap heeft ondergaan, is het mogelijk om de opbrengst van de isolatieprocedure te bepalen en een indruk te krijgen van de eventuele aanwezigheid van stoffen die de PCR-reactie remmen. De, met het IC-DNA, gemeten opbrengst van de isolatieprocedure is gebruikt om de meetwaarden voor elk individueel monster te corrigeren voor verlies van DNA t.g.v. de extractiemethode.

3.3.4 Constructie DNA suspensies t.b.v. ijklijnen

Voor het kwantificeren van de verschillende DNA-merkers zijn er in dit onderzoek *E. coli* plasmides geconstrueerd waarin de DNA-sequenties van verschillende qPCR fragmenten gecloneerd zijn. Deze plasmiden zijn vermeerderd in *E. coli* cellen en vervolgens gezuiverd. Het DNA van het gezuiverde plasmide is gekwantificeerd door toepassing van fluorescente kleuring en meting met een fluorometer (QuBit). Op basis van deze kwantificaties zijn verdunningsreeksen samengesteld met hierin tienvoudige verdunningen van DNA-suspensies met bekende concentraties. qPCR reacties, uitgevoerd op deze verdunningsreeksen, zijn gebruikt voor het genereren van ijklijnen. Deze ijklijnen zijn vervolgens gebruikt voor het kwantificeren van het DNA van potentiële GAO- en PAO-bacteriën in afvalwater.

3.4 Klonering van qPCR fragmenten en sequentie analyse

Om te controleren of de d.m.v. qPCR gegenereerde DNA-fragmenten afkomstig zijn van de bacteriën waarvoor de qPCR methoden ontwikkeld zijn (*Candidatus Competibacter* en *Candidatus Accumulibacter*) is de DNA-sequentie van de gevormde qPCR fragmenten bepaald. Hiervoor zijn de gevormde DNA-fragmenten eerst gekloneerd in een *E. coli* plasmide en vervolgens is de DNA-sequentie van individuele gekloneerde qPCR fragmenten bepaald. Voor klonering van de qPCR fragmenten is gebruik gemaakt van de pGEM-Teasy Kit van Promega (Promega, Madison, USA). De qPCR fragmenten worden hierbij gekloneerd in een bacterieel plasmide, door elk plasmide wordt één PCR molecuul ingesloten in de circulaire structuur van het plasmide. Aansluitend worden de plasmiden in *E. coli* cellen gebracht (transformatie), hierbij wordt door een deel van de *E. coli* cellen één plasmide opgenomen (met hierin één RT-PCR molecuul). De getransformeerde *E. coli* cellen worden uitgespateld op een vaste voedingsbodem. Na incubatie bij 37 °C groeien deze cellen uit tot individuele kolonies met hierin plasmiden die afkomstig zijn van één qPCR molecuul. Van elk gekloneerd RT-PCR fragment zijn van acht klonen (afkomstig van acht individuele qPCR moleculen) de sequentie bepaald.

4 Resultaten

Het verkennen van de mogelijkheden voor de toepassing van qPCR methoden voor het kwantificeren van het DNA van PAO- en GAO-bacteriën in afvalwater t.b.v. de optimalisatie van de zuiveringsprocessen is gefaseerd uitgevoerd waarbij de volgende drie fasen zijn gedefinieerd:

- **Fase I (hoofdstuk 4.1)**
In deze fase is d.m.v. literatuuronderzoek gezocht naar informatie waarmee antwoord wordt verkregen op de volgende vragen:
 - o Welke bacteriën zijn belangrijk in het proces van biologische fosfaatverwijdering?
 - o Welke DNA-methoden en gensequenties zijn beschikbaar op basis waarvan qPCR methoden te ontwikkelen zijn?
 - Door toepassing van bioinformaticasoftware is een evaluatie uitgevoerd van de DNA-sequenties van potentieel toepasbare primers en is er een selectie gemaakt van primers die experimenteel getest zijn (Fase II).
- **Fase II (hoofdstuk 4.2)**
In deze fase zijn potentieel toepasbare primersequenties experimenteel getest en zijn qPCR methoden geoptimaliseerd voor specifieke en gevoelige detectie en kwantificatie van het DNA van PAO- en GAO-bacteriën.
- **Fase III (hoofdstuk 4.3)**
In fase III zijn de geoptimaliseerde methoden getest op actief slib van afvalwaterzuiveringen en zijn de resultaten van qPCR analyses vergeleken met resultaten van standaard analyses.

4.1 Fase I: Literatuuronderzoek

Voor de ontwikkeling van qPCR methoden waarmee het DNA van GAO- en PAO-bacteriën kan worden gekwantificeerd is eerst literatuuronderzoek uitgevoerd. Bij dit literatuuronderzoek is onderzocht welke bacteriegroepen behoren tot de groep PAO-en GAO-bacteriën en vervolgens is onderzocht welke DNA-sequenties het beste kunnen worden toegepast voor specifieke detectie van het DNA van de meest relevante PAO- en GAO-bacteriën.

4.1.1 Welke PAO en GAO bacteriegroepen zijn van belang?

Voor optimalisatie van de biologische verwijdering en terugwinning van fosfaat (Bio-P) bij de zuivering van afvalwater is inzicht in de aanwezigheid en concentratie bacteriën die behoren tot de groep van "Polyphosphate-accumulating-organisms" (PAO) en "glycogen-accumulating-organisms" (GAO) van belang. Efficiënte fosfaatverwijdering is mogelijk in aanwezigheid van hoge concentraties PAO's. GAO bacteriën zijn in staat om glycogeen te binden en dragen niet bij aan verwijdering van fosfaat. GAO's kunnen in de zuivering concurreren met PAO's voor hetzelfde substraat waardoor hoge concentraties GAO's kunnen resulteren in lagere concentraties PAO's en daardoor verminderde verwijdering van fosfaat. Voor efficiënte fosfaatverwijdering is daarom te verwachten dat er groei nodig is van PAO's en beperking van de groei van GAO's.

Met de introductie van de moleculairbiologische sequentieanalyse is het mogelijk geworden om een steeds beter beeld te verkrijgen van de dominante bacteriën in complexe microbiologische gemeenschappen. Toepassing van deze methoden heeft geleid tot meer kennis over de samenstelling van microbiologische gemeenschappen in slib van RWZI's en tot identificatie van bacteriën die behoren tot de groepen van PAO- en GAO-bacteriën. Hoewel nog niet volledig duidelijk is welke bacteriegroepen (en eventueel andere

organismen) allemaal een belangrijke rol spelen bij het Bio-P proces is van een aantal bacteriegroepen, op basis van de huidige kennis, duidelijk dat deze groepen een duidelijke rol spelen binnen het Bio-P proces. De meest relevante bacteriegroepen hier weergegeven.

4.1.1.1 Relevante PAO bacteriën

In diverse studies is aangetoond dat de groep "*Candidatus Accumulibacter phosphatis*" bacteriën (*Accumulibacter*) zeer dominant aanwezig zijn in afvalwaterzuiveringen met efficiënte verwijdering van fosfaat. Het is daarom zeer waarschijnlijk dat *Accumulibacter* een belangrijke groep van PAO-bacteriën is (3, 9, 10, 20). Deze bacteriën behoren tot de klasse van de betaproteobacteriën en het is nog niet gelukt om deze bacteriën in het laboratorium te kweken.

In een beperkt aantal studies worden ook andere bacteriën, zoals *Tetrasphaera* (4, 16) en *Comamonadaceae* (7) en mogelijk ook *Actinobacteria* (4, 15) aangetroffen als dominante bacteriën in afvalwaterzuiveringen met efficiënte fosfaatverwijdering, zodat te verwachten is dat meerdere bacteriegroepen een rol kunnen spelen bij fosfaatverwijdering. Vanwege de grote hoeveelheid informatie over de rol van *Accumulibacter* bij fosfaatverwijdering in verschillende afvalwaterzuiveringen is echter wel te verwachten dat deze bacteriegroep een sleutelrol vervult bij het proces van fosfaatverwijdering. Er is daarom gekozen om dit onderzoek te beperken tot de ontwikkeling van qPCR methoden waarmee een kenmerkend DNA-fragment van *Accumulibacter*-bacteriën in afvalwater kan worden gekwantificeerd.

4.1.1.2 Relevante GAO bacteriën

Bacteriën die behoren tot de groep "*Candidatus competibacter phosphatis*" (*Competibacter*) worden in diverse studies beschreven als de meest relevante GAO bacteriën (2, 19). Bacteriën uit de groep *Competibacter* behoren tot de klasse van gammaproteobacteriën en zijn onder laboratoriumcondities (nog) niet kweekbaar. Mogelijk dat ook bacteriën van de groep *Defluviicoccus vanus* (alphaproteobacteriën) behoren tot de GAO's (16), maar de rol van deze groep lijkt minder duidelijk en minder algemeen. Er is daarom gekozen om dit onderzoek te beperken tot de ontwikkeling van qPCR methoden waarmee DNA van *Competibacter*-bacteriën in afvalwater kan worden gekwantificeerd.

4.1.2 Welke DNA-sequenties kunnen worden toegepast?

Voor de ontwikkeling van qPCR methoden, waarmee het DNA van PAO- en GAO-bacteriën specifiek kan worden gekwantificeerd, is de beschikbaarheid van DNA-sequenties die alleen bij deze bacteriegroepen voorkomen noodzakelijk. De DNA-sequenties die alleen voorkomen bij deze bacteriegroepen kunnen worden gebruikt voor de ontwikkeling van twee synthetische DNA-moleculen (primers) die gebruikt kunnen worden om een kort DNA-fragment van PAO- of GAO-bacteriën zeer specifiek te vermenigvuldigen d.m.v. PCR. In de wetenschappelijke literatuur zijn diverse, potentieel bruikbare, primer-sequenties beschreven. Door gebruik te maken van Bioinformaticasoftware (Bionumerics, ARB (18), Blast (1)) is onderzocht in hoeverre te verwachten is dat deze primers geschikt zijn voor het specifiek detecteren van de tot nu toe bekende GAO (*Competibacter*) en PAO (*Accumulibacter*) bacteriën.

4.1.2.1 DNA sequenties voor detectie van DNA van PAO-bacteriën

Voor detectie van het DNA van *Accumulibacter*-bacteriën zijn in de wetenschappelijke literatuur diverse methoden beschreven waarbij twee verschillende genetische targets worden gebruikt: het 16S rRNA gen en het Polyphosphate kinase gen 1 (ppk1).

- *Het 16S rRNA gen*

Het 16S rRNA-gen (ribosomaal RNA-gen) komt voor in alle bacteriesoorten. Een deel van de DNA-sequentie van dit gen is sterk geconserveerd en een ander deel varieert sterk tussen bacteriesoorten. Hierdoor wordt de sequentie van dit gen algemeen gebruikt voor het onderscheiden van verschillende bacteriesoorten en wordt de 16S rRNA gensequentie algemeen toegepast voor classificatie en identificatie van de "bacteriële wereld".

Bij de eerste initiatieven voor de ontwikkeling van methoden waarmee DNA van PAO-bacteriën specifiek kan worden gedetecteerd is gebruik gemaakt van 16S rRNA sequenties voor de ontwikkeling van Fluorescentie-in-situhybridisatie (FISH) technieken waarbij fluorescent gelabelde synthetische DNA-fragmenten (probes) worden gebruikt voor het microscopische zichtbaar maken van het DNA van PAO-bacteriën (3). Er zijn, op basis van 16S rRNA sequenties verschillende FISH probes (17) en PCR-primers (8, 9, 19) ontwikkeld.

De groep van *Accumulibacter*-bacteriën is zeer heterogeen, dat betekent dat er veel verschillen zijn tussen 16S rRNA sequenties van de verschillende *Accumulibacter*-bacteriën. Hierdoor zijn er op basis van 16S rRNA verschillende groepen te onderscheiden. Dit maakt het moeilijk om één primerpaar te ontwikkelen waarmee het mogelijk is om alle verschillende *Accumulibacter*-bacteriën te detecteren. Daarom zijn er primerparen ontwikkeld waarmee de verschillende subgroepen binnen de *Accumulibacter* kunnen worden gedetecteerd (8).

- *Het ppk1 gen*

Het ppk1 gen bevat de genetische informatie voor de vorming van het eiwit Polyphosphate kinase, een eiwit dat betrokken is bij de vorming van polyphosphate. Efficiënte binding en daardoor verwijdering van fosfaat verloopt het meest efficiënt in de aanwezigheid van hoge concentraties Polyphosphate kinase, de concentratie van het ppk1 gen heeft dus een direct verband met de potentiële capaciteit voor de verwijdering van fosfaat. Doordat in de DNA-sequentie van het ppk1 gen sterk kan variëren is het mogelijk om op basis van de pkk1 sequenties vijf verschillende groepen van *Accumulibacter*-bacteriën (9) te onderscheiden (IA, IIA, IIB, IIC en IID). Vooral groep IA en IIA zijn zeer dominant aanwezig in afvalwaterzuiveringen waarin efficiënte fosfaatverwijdering plaats vindt. Op basis van verschillende onderzoeken lijkt er een verschil te zijn tussen groep IA en IIA in het vermogen om nitraat te reduceren waarbij groep IA in staat is nitraat te gebruiken als electronen acceptor bij de anoxische fosfaatopname terwijl groep IIA hier niet toe in staat is (6). Er zijn, op basis van sequenties van het ppk1-gen van *Accumulibacter*, diverse DNA-primers ontwikkeld (5, 12, 14) die mogelijk toepasbaar zijn voor qPCR methoden waarmee DNA van de verschillende *Accumulibacter* groepen in afvalwater kan worden gekwantificeerd.

Evaluatie van potentieel toepasbare methoden voor kwantificatie van *Accumulibacter*

Na uitgebreide analyse van de in de wetenschappelijke literatuur beschreven primersequenties voor specifieke detectie van *Accumulibacter* zijn de volgende conclusies getrokken:

- Op basis van databaseanalyses is te verwachten dat een beschreven methode voor het detecteren van "alle" *Accumulibacter*-soorten (9, 19) niet voldoende specifiek is. Slechts één van de beide 16S-rRNA (518f/PAO-846R) specifieke primers is specifiek voor *Accumulibacter*-bacteriën, waardoor te verwachten is dat niet alleen *Accumulibacter*-bacteriën, maar ook andere bacteriën gedetecteerd kunnen worden. Sequenties van de primers:
 - 518F: 5'-CCAGCAGCCGCGGTAAT-3'
 - PAO-846R: 5'-GTTAGCTACGGCACTAAAAGG-3'
- De 16S-rRNA specifieke methoden (8) waarmee onderscheid gemaakt kan worden tussen twee verschillende *Accumulibacter*-groepen (clades) lijken, op basis van database-searches, zeer specifiek te zijn. De DNA-sequenties van de toegepaste primers:
 - Groep 1A (Clade 1A):PAO-16S_Accl
 - PAO-16S_AcclA-F: 5'-TTGCTTGGGTTAATACCCTGAG-3'
 - PAO-16S_AcclA-R: 5'-CTGCCAAACTCCAGTCTTGC-3'
 - Groep IIA (Clade IIA): PAO-16S_AcclI
 - PAO-16S_AcclIA-F: 5'-TTGCACGGGTTAATACCCTGTG-3'

- PAO-16S_AcclIA-R: 5'-CTCTGCCAAACTCCAGCCTG-3'
- De primers die gebruikt worden voor de PCR-methoden waarbij fragmenten van het *ppk1* gen worden geamplificeerd lijken zeer specifiek te zijn voor detectie van verschillende groepen van *Accumulibacter*-bacteriën.
Sequenties van de primers:
 - PAO-*ppk*_IA:
 - Acc-*ppk*1-763f: 5'-GACGAAGAAGCGGTCAAG-3'
 - Acc-*ppk*1-1170r: 5'-AACGGTCATCTTGATGGC-3'
 - PAO-*ppk*_IIA:
 - Acc-*ppk*1-893f: 5'-AGTTCAATCTCACCGAGAGC-3'
 - Acc-*ppk*1-997r: 5'-GGAAGTTCAGGTCGTTGC-3'
 - PAO-*ppk*_IIB:
 - Acc-*ppk*1-870f: 5'-GATGACCCAGTTCCTGCTCG-3'
 - Acc-*ppk*1-1002r: 5'-CGGCACGAACTTCAGATCG-3'
 - PAO-*ppk*_IIC:
 - Acc-*ppk*1-254f: 5'-TCACCACCGACGGCAAGAC-3'
 - Acc-*ppk*1-460r: 5'-CCGGCATGACTTCGCGGAAG-3'
 - PAO-*ppk*_IID:
 - Acc-*ppk*1-375f: 5'-GGGTATCCGTTTCCTCAAGCG-3'
 - Acc-*ppk*1-522r: 5'-GAGGCTCTTGTTGAGTACACGC-3'

Op basis van bovenstaande resultaten is besloten om de toepassingsmogelijkheden van vier primersets te verkennen voor specifieke detectie van *Accumulibacter*-bacteriën die behoren tot groep IA en IIA.

- Specifiek voor het 16S rRNA gen:
 - o PAO-16S_Accl: PAO-16S_AcclIA-F/PAO-16S_AcclIA-R
 - o PAO-16S_AcclII: PAO-16S_AcclIIA-F/PAO-16S_AcclIIA-R
- Specifiek voor het *ppk1* gen, waarbij de *ppk* genen van de meest dominante *Accumulibacter*-groepen (IA en IIA) worden gedetecteerd:
 - o PAO-*ppk*_IA: Acc-*ppk*1-763f/Acc-*ppk*1-1170r
 - o PAO-*ppk*_IIA: Acc-*ppk*1-893f/Acc-*ppk*1-997r

4.1.2.2 DNA sequenties voor detectie van DNA van GAO-bacteriën

Voor detectie van het DNA van *Competibacter phosphatis* zijn methoden beschreven waarmee het 16S rRNA gen specifiek wordt aangetoond:

- Een PCR methode op basis van 16S rRNA gen (2, 19).
- Aansluitend is er onderzocht of sequenties van het 23S rRNA gen gebruikt kunnen worden voor de ontwikkeling van een *Competibacter*-specifieke qPCR methode. Maar, vanwege de beperkte beschikbaarheid van 23S rRNA sequenties is er momenteel nog onvoldoende informatie beschikbaar voor het ontwerpen van *Competibacter*-specifieke primers op basis van dit gen.

Evaluatie van potentieel toepasbare methoden voor kwantificatie van *Competibacter phosphatis*

Na evaluatie van de beschreven methoden (na uitgebreide analyse van de primersequenties) zijn de volgende conclusies getrokken:

- Met de primers die in de beide publicaties zijn beschreven (2, 19) is te verwachten dat:
 - o Het DNA van een groot deel, maar niet alle, "*Candidatus Competibacter*"-bacteriën kan met de toegepaste primers worden gedetecteerd.
 - o De groep van "*Candidatus Competibacter*" bacteriën is een zeer grote groep met een grote diversiteit aan 16S rRNA sequenties. Het is daarom zeer moeilijk om primers te ontwerpen waarmee het mogelijk is om het DNA van alle *Competibacter*-bacteriën te detecteren.

- Het DNA-fragment dat tijdens de PCR reacties wordt gevormd is vrij lang (558 bp) waardoor de vermenigvuldiging van het fragment mogelijk minder efficiënt verloopt en de methode minder robuust is.
- Voor de amplificatie van een korter fragment (334 bp) en voor detectie van het DNA van een groter deel van de *Competibacter*-bacteriën is door KWR een alternatieve primer ontworpen (GAO_16S_KWR655).
 - Sequenties van de in de literatuur beschreven primerset (2):
 - GAOQ431: 5'-AAGCCCTTTAGGCGGGGA-3'
 - GAOQ989: 5'-TTCCCCGGATGTCAAGGC-3'
 - Sequenties van de alternatieve primerset:
 - GAO_16S_KWR655: 5'-GTGGGCTAGAGGATCGTGGA-3'
 - GAOQ989: 5'-TTCCCCGGATGTCAAGGC-3'

Op basis van bovenstaande resultaten is besloten om de toepassingsmogelijkheden van, in eerste instantie, één primerset te verkennen voor detectie van *Competibacter*:

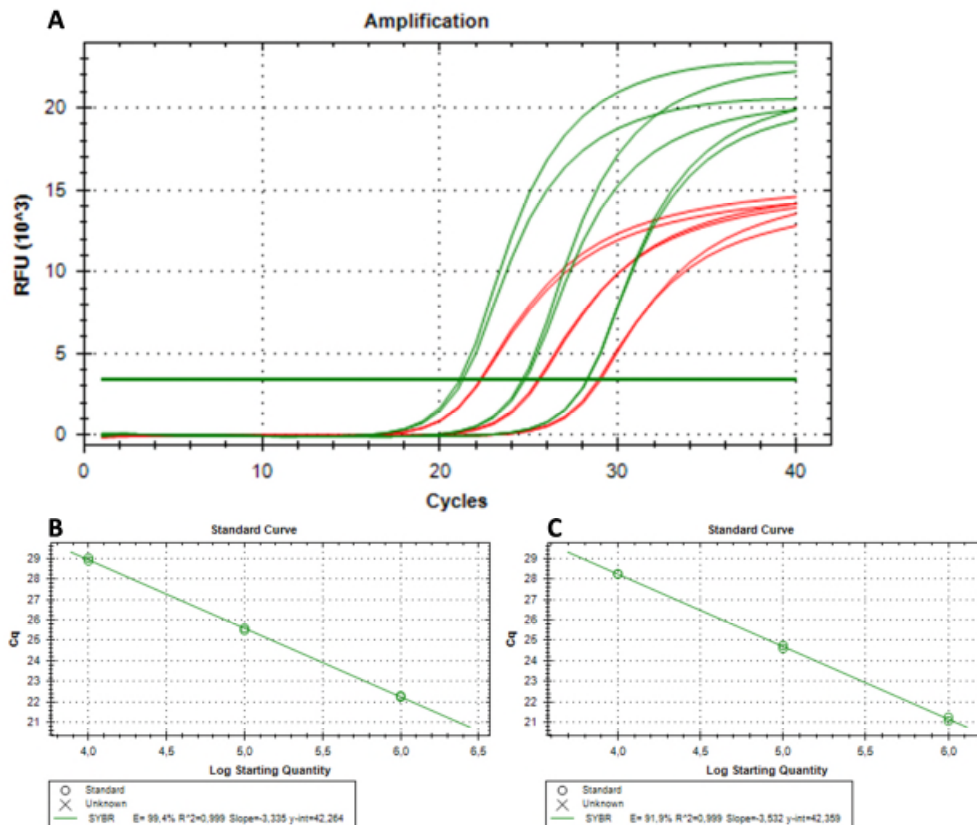
- Specifiek voor het 16S rRNA gen:
 - GAO_16S_KWR: GAO_16S_KWR655/GAOQ989

4.2 Fase II: Optimalisatie van potentieel toepasbare qPCR methoden

Voor optimalisatie van de verschillende qPCR methoden zijn qPCR reacties uitgevoerd bij verschillende temperaturen op verdunningsreeksen van nauwkeurig gekwantificeerde DNA suspensies (2.2.4). Bij dit experiment wisselt de temperatuur tijdens de qPCR reactie van 95°C naar een (annealing) temperatuur tussen 55 tot 65°C. De optimale temperatuur is geselecteerd aan de hand van de volgende criteria:

- De temperatuur waarbij alleen het *Accumulibacter*- of *Competibacter*-specifieke fragment wordt gevormd. Bij een suboptimale temperatuur kunnen ook a-specifieke fragmenten gevormd worden (primer-dimers).
- De efficiëntie van de qPCR reactie benadert de 100%: bij deze temperatuur vindt er een verdubbeling van het PCR-fragment plaats tijdens elke cyclus.
- De sterkte van het fluorescentiesignaal is zo hoog mogelijk.

Een voorbeeld is weergegeven in Figuur 6. In dit voorbeeld zijn PAO-*ppk*_IIA specifieke qPCR reacties uitgevoerd bij 2 temperaturen (60 en 65°C) op 10-voudige verdunningsreeksen met $2,5 \times 10^5 / 2,5 \times 10^4 / 2,5 \times 10^3$ DNA kopieën van het plasmide-DNA met hierin het PAO-*ppk*_IIA fragment gekloneerd.



Figuur 6. Amplificatiecurves (A) van PAO-ppk_IIA specifieke qPCR reacties uitgevoerd bij 59°C (groen) en 65°C (rood) verdunningsreeksen met $2,5 \times 10^5/2,5 \times 10^4/2,5 \times 10^3$ DNA kopieën en de standaardcurves (met efficiënties; E) van reacties uitgevoerd bij 60°C (B) en 65°C (C)

Dit voorbeeld maakt duidelijk dat de PAO-ppk_IIA specifieke qPCR reacties beter verlopen (hogere efficiëntie E, en hogere signaalsterkte) bij temperatuurswisselingen tussen 95°C en 59°C dan bij temperatuurswisselingen tussen 95°C en 65°C. Vergelijkbare experimenten zijn uitgevoerd met de andere vier, potentieel toepasbare, qPCR methoden om daarmee het optimale temperatuurprofiel voor deze reacties te bepalen. De resultaten van deze analyses zijn samengevat in tabel 5. De vorming van a-specifieke fragmenten (primer-dimers) werd in deze experimenten niet waargenomen.

qPCR methode	Optimale temperatuur (°C)
GAO_16S_KWR	57-62
PAO-16S_Accl	59-64
PAO-16S_AcclI	60-65
PAO-ppk_IA	60-65
PAO-ppk_IIA	60-65

Tabel 5. Optimaal temperatuurtraject

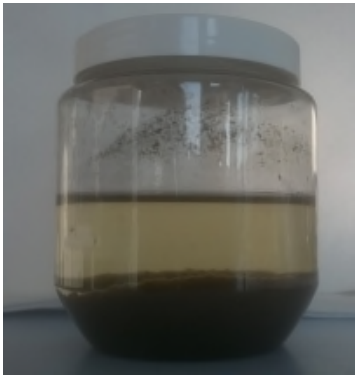
Het temperatuurtraject waarbij de reactie optimaal verloopt (tabel 5) is in vervolgentoelagen toegepast bij het uitvoeren van qPCR analyses.

4.3 Fase III: Toepassing van qPCR methoden op actief slibmonsters

De verschillende qPCR methoden zijn toegepast op actief slibmonsters afkomstig van verschillende afvalwaterzuiveringen (Tabel 1). Er zijn twee monsterseries verzameld en geanalyseerd: één op 16 juni en één op 21 oktober 2014.

4.3.1 Isolatie van DNA uit actief slibmonsters

Voor het uitvoeren van betrouwbare kwantificaties met qPCR is een efficiënte DNA-isolatie stap van groot belang. Tijdens deze DNA-isolatie stap is het belangrijk dat DNA wordt geïsoleerd met hoge opbrengst en lage concentratie stoffen die de qPCR-reacties kunnen remmen. Daarom is eerst onderzocht of het, met de bij KWR toegepaste isolatiemethoden, mogelijk is om efficiënt DNA te isoleren uit actief slib en welk volume slib hiervoor kan worden gebruikt. Metingen van toegevoegd IC-DNA zijn gebruikt om een indruk te krijgen van de efficiëntie van de DNA-extractie en/of remming van de PCR-reactie. Dit IC-DNA is aan elk monster toegevoegd en de concentratie ervan is na extractie van DNA bepaald en vergeleken met eenzelfde hoeveelheid IC-DNA dat geen extractiestap heeft ondergaan (100%). De procentuele verhouding tussen de concentratie IC-DNA geïsoleerd uit het monster en de concentratie IC-DNA zonder isolatie geeft de opbrengst van de DNA-isolatie en/of remming van de PCR weer.



Figuur 7. Voorbeeld van een actief slibmonster na bezinking van de slibfase

Om te onderzoeken welk volume slib in behandeling genomen kan worden voor isolatie van DNA zijn de actieve slib monsters eerst 30 min. stil gestaan, waardoor een duidelijke scheiding ontstond tussen de bovenstaande heldere vloeistof (waterfase) en de donkere onderste fase (slibfase). Vervolgens zijn verschillende volumes van water- en slibfase verzameld en gebruikt voor isolatie van DNA. De opbrengst van IC-DNA is in deze monsters gemeten om een indruk te krijgen van de opbrengst van de DNA-isolatiestap en/of remming van PCR. De resultaten van de metingen van de opbrengst van isolatie van IC-DNA zijn samengevat in Tabel 1.

KWR monstercode	Locatie	Volume (µl)		
		100	250	1000
Waterfase				
M141588	RWZI-Utrecht Trap-A		36,9	24,5
M141589	RWZI-Utrecht Trap-B	9,4	10,0	12,4
M141590	Nereda Utrecht		14,2	31,4
M141591	RWZI-Zeist	13,5	8,9	13,9
M141592	RWZI-Bunnik	15,2	10,1	12,6
	Gemiddeld	12,7	16,0	18,9
Slibfase				
M141588	RWZI-Utrecht Trap-A	29,7	16,3	
M141589	RWZI-Utrecht Trap-B	16,5	18,4	0,2
M141590	Nereda Utrecht	29,7	22,1	
M141591	RWZI-Zeist	10,2	31,1	0,6
M141592	RWZI-Bunnik	3,4	<0,1	0,7
	Gemiddeld	17,9	17,6	0,5

Tabel 1. Opbrengst van IC-DNA (in %) na isolatie van DNA uit verschillende volumes water- of slibfase.

De opbrengsten van de DNA-isolaties uit monsters waarin 1000µl van de slibfase in behandeling is genomen zijn erg laag (0,2 tot 0,7%) en de opbrengst van alle volumes van de slibfase van RWZI-Bunnik zijn erg laag (<0,1 tot 3,4%). Op basis van deze metingen is ervoor gekozen om, voor het bepalen van de concentratie DNA van GAO- en PAO-bacteriën, specifieke qPCR reacties uit te voeren op DNA geïsoleerd uit 100µl slibfase en 250µl waterfase.

Bij de tweede serie monsters is opnieuw gestart met het bepalen van de opbrengst van de DNA-isolatie stap. Hierbij zijn isolaties van DNA uitgevoerd op 1 ml waterfase, 1 ml slibfase en op een volume van 1 ml mengsel van water- er slibfase. Het mengsel van water- en slibfase is gemaakt door het monster eerst gedurende 1 minuut zeer grondig te homogeniseren (door vortexen op hoge snelheid). De opbrengsten van deze DNA-isolaties zijn samengevat in tabel 7.

KWR monstercode	Locatie	1 ml		
		Waterfase	Slibfase	Water-slib Mengsel
M143608	Sharon Garmerwolde		0,2	14,5
M143609	Utrecht B1	33,6		9,8
M143610	N-trap Straat 3 Garmerwolde	28,8	0,4	9,4
M143611	Bunnik	23,3		13,1
M143612	Nereda Utrecht	23,6	2,2	11,5
M143613	RWZI Zeist	23,5	0,8	9,2
M143614	Garmerwolde Nereda	24,4	1,9	10,2

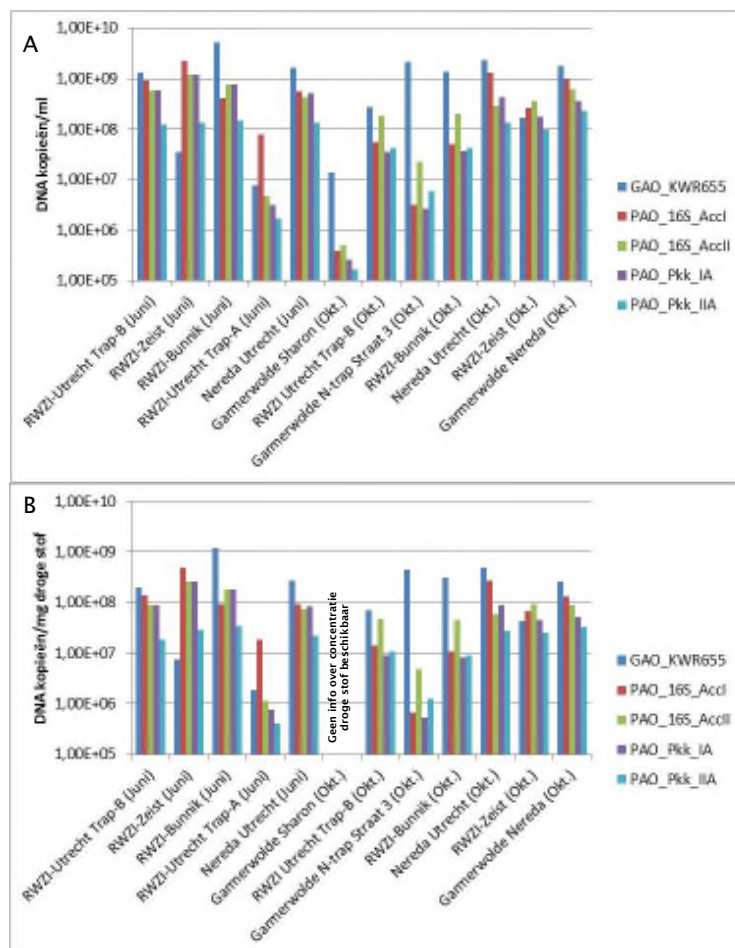
Tabel 7. Opbrengst DNA isolaties 2e serie monsters

De opbrengsten van de DNA-isolaties uit monsters waarin 1000µl van de slibfase in behandeling is genomen zijn erg laag (0,2 tot 2,2%), de opbrengsten van DNA-isolaties uit de waterfase (23,3-33,6%) en de water-slib mengsels (9,2-14,5%) van de monsters zijn aanmerkelijk hoger. Op basis van deze metingen is ervoor gekozen om, voor het bepalen van de concentratie DNA van GAO- en PAO-bacteriën, specifieke qPCR reacties uit te voeren op DNA geïsoleerd uit 1 ml water-slib mengsel. Door de qPCR analyses uit te voeren op een mengsel van water en slib zijn de resultaten beter vergelijkbaar met de fosfaatafgiftetesten, deze zijn namelijk ook uitgevoerd op een gehomogeniseerde suspensie van een mengsel van water en slib.

4.3.2 Metingen van DNA concentraties van (potentiële) PAO- en GAO-bacteriën

Voor het bepalen van de concentratie DNA van PAO- en GAO-bacteriën zijn bij de 1^e serie monsters (van 16 juni 2014) metingen uitgevoerd op DNA geïsoleerd uit 150 µl waterfase en 100 µl slibfase. Deze meetwaarden zijn gecorrigeerd voor de opbrengst van de DNA-isolatie (IC-meting) en het gemiddelde van de meetwaarden van de slib- en waterfase is gebruikt als maat voor de concentratie PAO- en GAO-bacteriën in deze actief slibmonsters. Deze gemiddelde waarde geeft dan een beeld van de concentratie PAO- en GAO-bacteriën in een monster waarin de water- en slibfase zijn gehomogeniseerd (zoals is uitgevoerd bij de fosfaatgifttesten). Overigens maken de afzonderlijke water- en slibfasemetingen duidelijk dat vrijwel al het qPCR signaal (met alle onderzochte qPCR-methoden) gedetecteerd wordt in de slibfase van de monsters (data niet weergegeven). Dit geeft aan dat de gedetecteerde (potentiele) PAO en GAO bacteriën vooral aanwezig zijn in de korrelstructuur van het slib. Bij de 2^e serie monsters (van 21 oktober 2014) zijn metingen uitgevoerd op DNA geïsoleerd uit 1 ml actief slib na homogenisatie van de water- en slibfase.

Op alle monsters zijn metingen uitgevoerd met de GAO-specifieke (GAO-16S_KWR655) en vier verschillende PAO specifieke (PAO-16S_Accl, PAO-16S_AcclII, PAO-pkk_IA en PAO-pkk_IIA) qPCR methoden. De resultaten van deze metingen zijn weergegeven in bijlage I en samengevat in figuur 8.



Figuur 8. Resultaten van metingen van het DNA van GAO- en PAO-bacteriën met verschillende potentieel toepasbare qPCR methoden. In A zijn de concentraties DNA kopieën per ml actief slib weergegeven en in B zijn de concentraties DNA kopieën per mg droge stof (uit het actief slib) weergegeven.

In de monsters afkomstig van onderdelen van RWZI's waarbij veel biologische verwijdering van fosfaat wordt verwacht (tabel 9: Zeist, Bunnik, Nereda Utrecht, Nereda Garmenwoldse en

B-trap Utrecht) wordt met alle onderzochte qPCR methoden hogere concentraties DNA van PAO- (*Accumulibacter*) en GAO-bacteriën (*Competibacter*) gevonden. In monsters afkomstig van onderdelen van RWZI's waar geen of weinig Bio-P wordt verwacht (tabel 9: RWZI Utrecht A-trap, Garmerwolde Sharon en Garmerwolde N-trap straat 3) worden lagere concentraties GAO- en PAO-bacteriën gevonden met alle PAO-specifieke en GAO-specifieke qPCR methoden. In het slib van de B-trap van RWZI Utrecht was de concentratie GAO- en PAO-bacteriën opvallend hoog, mogelijk treedt hier meer biologische fosfaatverwijdering op dan op voorhand was verwacht.

Deze resultaten geven een eerste indicatie dat met de toegepaste qPCR methoden een goede indruk wordt verkregen over de aanwezigheid en concentratie van PAO- en GAO-bacteriën en daarmee van de aanwezige Bio-P activiteit tijdens de zuiveringsstappen van een RWZI.

4.3.3 Sequentieanalyse van PCR-fragmenten

Om te bevestigen dat de, d.m.v. qPCR gegenereerde, DNA-fragmenten afkomstig zijn van *Candidatus Competibacter* (GAO) en *Candidatus Accumulibacter* (PAO) bacteriën zijn de DNA-sequenties van de, met alle qPCR methoden, gevormde qPCR fragmenten bepaald in twee monsters afkomstig van RWZI Zeist en RWZI Bunnik (beide van 16 juni 2014). De DNA-sequenties van de qPCR fragmenten zijn eerst gekloneerd in een plasmide en vervolgens overgebracht naar *E. coli* cellen. De sequentie van de qPCR moleculen is vervolgens bepaald d.m.v. sequentieanalyse op plasmide-DNA van individuele *E. coli* kolonies (met hierin de gekloneerde qPCR fragmenten). Met het programma "Blast" zijn de verkregen sequenties vergeleken met de sequenties van de DNA-database van Genbank via de website van NCBI (National Center for Biotechnology Information) en de sequenties met de meeste sequentieovereenkomst (homologie) zijn weergegeven in tabel 8.

qPCR Methode	Lengte fragment (bp)	Locatie	Aantal sequenties bepaald/overeenkomend	Meest verwant in database	% overeenkomst	Genbank nr
GAO-16S_KWR655	224	RWZI Zeist	12/12	<i>Candidatus Competibacter</i> (16S rRNA-gen)	97-99	o.a. JQ480426
		RWZI Bunnik	15/15	<i>Candidatus Competibacter</i> (16S rRNA-gen)	97-99	o.a. JQ480426
PAO-16S_Accl	211	RWZI Zeist	16/16	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (16S rRNA-gen)	99-100	o.a. JQ726365
		RWZI Bunnik	19/19	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (16S rRNA-gen)	99-100	o.a. JQ726365
PAO-16S_Accl	213	RWZI Zeist	14/14	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (16S rRNA-gen)	98-100	o.a. HM046420
		RWZI Bunnik	13/13	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (16S rRNA-gen)	98-99	o.a. JN679073
PAO-ppk_IA	408	RWZI Zeist	5/15	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (ppkI-gen)	100	o.a. JQ434123
			4/15	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (ppkI-gen)	100	o.a. KP737962
		1/15	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (ppkI-gen)	100	o.a. AB830340	
		2/15	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (ppkI-gen)	100	o.a. KP738039	
		3/15	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (ppkI-gen)	97	o.a. EU432904	
		RWZI Bunnik	9/17	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (ppkI-gen)	100	o.a. KP737963
			4/17	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (ppkI-gen)	100	o.a. JQ434123
		RWZI Zeist	4/17	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (ppkI-gen)	100	o.a. KP738068
			6/11	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (ppkI-gen)	100	o.a. KP737903
		PAO-ppk_IIA	105	RWZI Zeist	5/11	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (ppkI-gen)
6/11	<i>Candidatus Accumulibacter</i> (ppkI-gen)				100	o.a. KP738102
RWZI Bunnik	2/11			<i>Candidatus Accumulibacter</i> (ppkI-gen)	100	o.a. KP738044
	3/11			<i>Candidatus Accumulibacter</i> (ppkI-gen)	100	o.a. KP148210

tabel 8. Sequentie analyse qPCR-fragmenten

De samenvatting van de sequentieanalyse resultaten (tabel 8) geven aan dat met de toegepaste qPCR methoden in de monsters alleen DNA-sequenties worden geamplificeerd die afkomstig zijn van *Candidatus Competibacter* (GAO) en *Candidatus Accumulibacter* (PAO) bacteriën. Hoewel het aantal monsters beperkt is waarop deze analyse is uitgevoerd, geven deze resultaten wel een duidelijke aanwijzing dat met de toegepaste qPCR methoden alleen DNA-fragmenten van *Candidatus Competibacter* en *Candidatus Accumulibacter* bacteriën wordt gedetecteerd en dat deze qPCR methoden dus specifiek zijn voor deze bacteriegroepen.

4.4 Resultaten fosfaatgiftetesten

In het kader van dit onderzoek zijn twee exercities verricht om de fosfaatgiftte te bepalen. De eerste waarin op 16 juni bij het Hoogheemraadschap De Stichtste Rijnlanden (HDSR) en

het Waterschap Vallei en Veluwe (WVV) waarbij monsters op verschillende RWZI's zijn genomen. Deze monsters zijn op 17 juni op het laboratorium (TRC) van Royal HaskoningDHV geanalyseerd. De tweede exercitie was op 21 oktober 2014 (monstername) en 22 oktober 2014 (analyses) en betrof wederom monsters van HDSR aangevuld met monsters van Waterschap Noorderzijlvest (WNZV). Op beide analysedagen zijn monsters genomen van RWZI's waar zowel biologische als chemische fosfaatverwijderingsprocessen worden gehanteerd.

Alle activiteitstesten zijn uitgevoerd bij een temperatuur van 22°C. Alle testen zijn uitgevoerd in een thermostaatbad, om afwijkingen als gevolg van temperatuurverschillen uit te sluiten. Gedurende de testen zijn ter controle de pH, temperatuur en zuurstofconcentratie regelmatig afgelezen. De menging onder anaerobe omstandigheden is gerealiseerd met behulp van een langzaam draaiende mixer. De monstername gedurende de activiteitstesten is genomen met behulp van een monsternamespuit. Direct na de monstername zijn de monsters gefiltreerd om zo de biomassa van het water te scheiden. Alle fosfaatanalyses zijn uitgevoerd met HACH-Lange cuvettesten. Bij enkele testen is gecorrigeerd voor de pH indien deze afweek van de range 7-8, door toevoegen van enkele druppels 1 M HCL of 1 M NaOH.

In tabel 9 staan de geselecteerde RWZI's en welke onderdelen zijn bemonsterd. De A-trap van de RWZI Utrecht en de N-trap van Garmerwolde Straat 3 zijn specifiek gekozen omdat deze in theorie weinig tot geen PAO's zouden moeten bevatten. Fosfaatverwijdering in de conventionele straat 3 van de RWZI Garmerwolde, maar ook in de conventionele straat van Utrecht (B-trap) vindt middels chemicaliën plaats. Er is in deze conventionele straten overigens wel sprake van onbeluchte zones of perioden. In de overige zuiveringen wordt voor het overgrote deel biologische fosfaatverwijdering toegepast, en aanvullend chemisch gedoseerd als de effluenteisen dreigen te worden overschreden. In de Nereda's vindt geen tot zeer weinig aanvullende chemische dosering plaats.

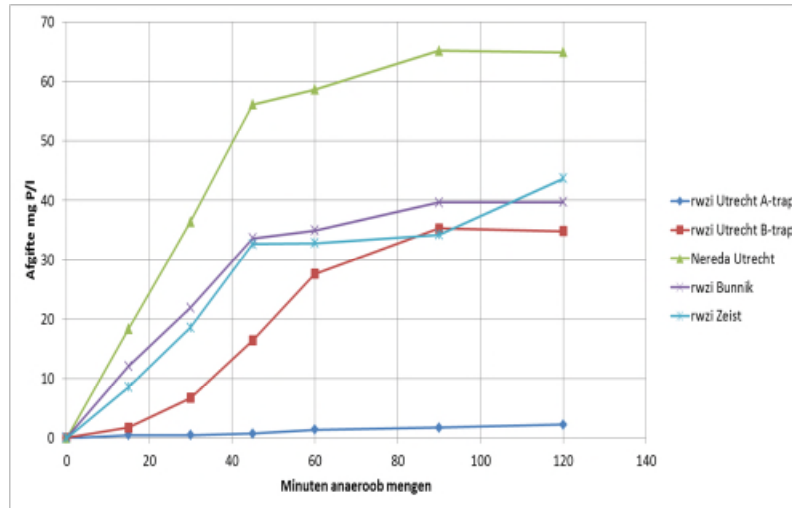
RWZI	Waterschap	16 juni 2014	21 oktober 2014	Bio-P verwacht
Utrecht A-trap	HDSR	X		nee
Utrecht B-trap	HDSR	X	X	nee / gering
Utrecht Nereda Demo	HDSR	X	X	Ja
Utrecht Sharon, deelstroom	HDSR			nee
Bunnik	HDSR	X	X	Ja
Zeist	HDSR	X	X	Ja
Amersfoort A-trap	WVV	X		Ja
Ede A-trap	WVV	X		Ja
Renkum	WVV	X		Ja
Garmerwolde N-trap Straat 3	WNZV		X	Nee
Garmerwolde Nereda	WNZV		X	Ja

Tabel 9. Bemonsterde RWZI's

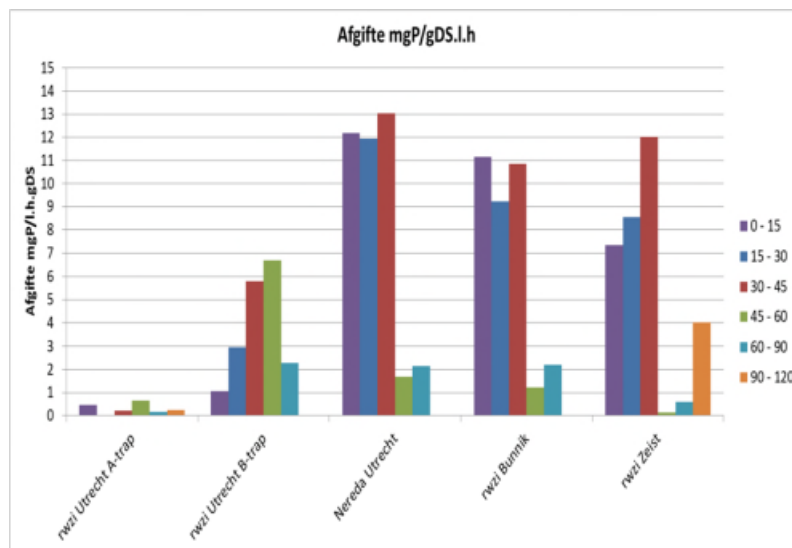
In de onderstaande figuren zijn de resultaten van de analyses en de berekeningen van het RHDHV laboratorium gepresenteerd. In figuur 9 zijn de analyses van fosfaatafgiftetesten van de vijf geselecteerde zuiveringen van HDSR weergegeven. Zoals beschreven in hoofdstuk 3 is na beluchten en toevoeging van acetaat de monsters zuurstofarm gemaakt, waarna

fosfaatafgifte kan gaan plaatsvinden. Tot circa 60 minuten vindt lineaire afgifte plaats waarna de curves vlakker gaan lopen als zijnde een indicatie dat de PAO's niet meer fosfaat kunnen afgeven.

In figuur 10 zijn de fosfaatafgiftesnelheden weergegeven per kwartier en gecorrigeerd voor de concentraties drogestof die een indicator zijn voor de hoeveelheid bacterieel materiaal



Figuur 9. Fosfaatafgiftestesten HDSR - Sessie 1 - juni 2014

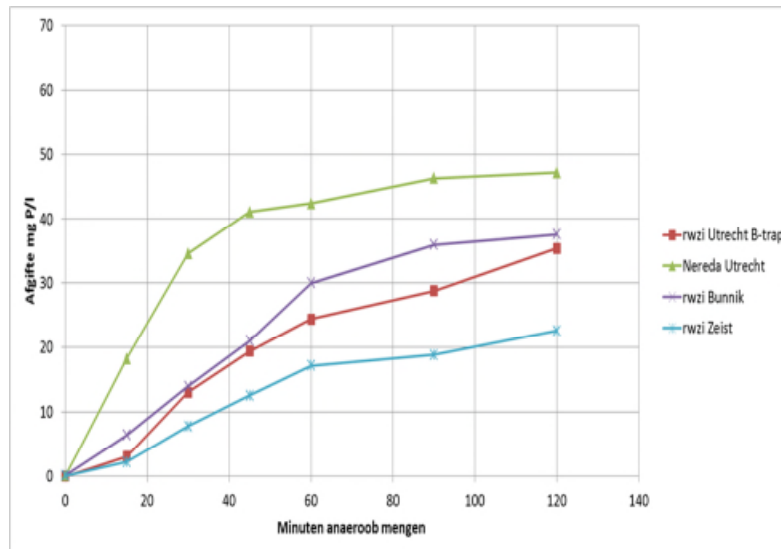


Figuur 10. Fosfaatafgiftesnelheid HDSR - Sessie 1 - juni 2014 [mgP/gDS.l.h]

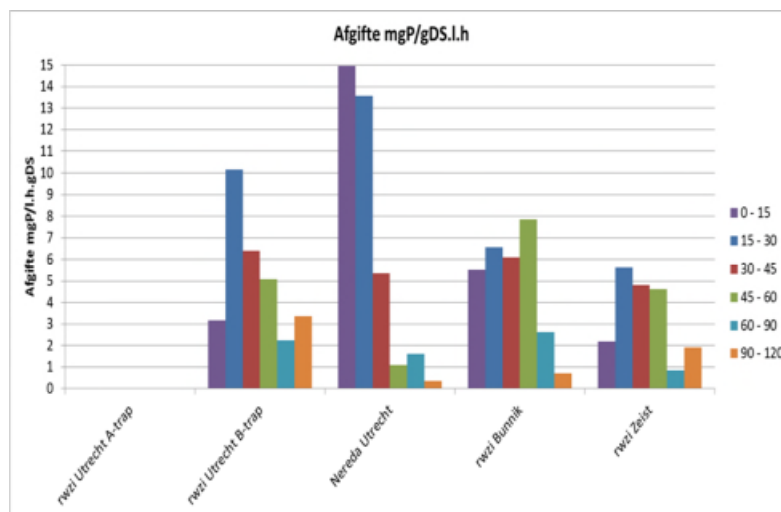
Duidelijk is dat in het A-trap slib van RWZI Utrecht, waar geen biologische fosfaatverwijdering verwacht wordt, geen P-afgifte plaatsvindt. Het slib van de andere RWZI's vertonen een duidelijk P-afgifte, waarbij het Nereda slib de hoogste afgifte vertoont. Gecorrigeerd voor drogestof laat het B-trap slib van Utrecht relatief weinig P-afgifte zien. Nereda slib en Bunnik slib laten de snelste afgifte zien.

Figuur 11 representeert dezelfde metingen als figuur 9, alleen betreffende de metingen in de tweede sessie van oktober 2014. In figuur 12 zijn de fosfaatafgiftesnelheden weergegeven betreffende de metingen op de HDSR RWZI's in oktober 2014. Deze meetsessie laat zien dat

de waargenomen P-afgifte van de RWZI Zeist en RWZI Bunnik op een lager niveau liggen dan de afgiften met het slib uit dezelfde zuiveringen in juni 2015. Het Nereda slib van RWZI Utrecht vertoont weer eenzelfde hoge afgifte niveau. Het B-trap slib uit Utrecht vertoont, niet geheel volgens de verwachting, een hogere afgifte dan in de eerdere meetsessie.



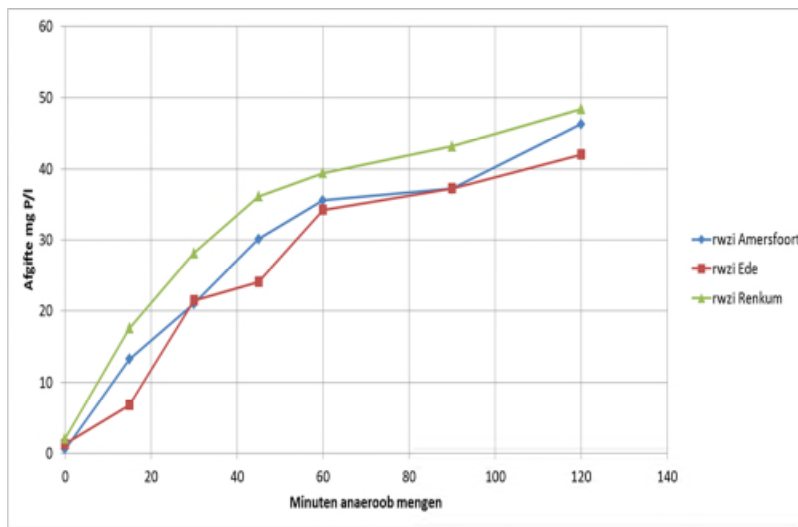
Figuur 11. Fosfaatafgiftetesten HDSR - Sessie 2 - oktober 2014



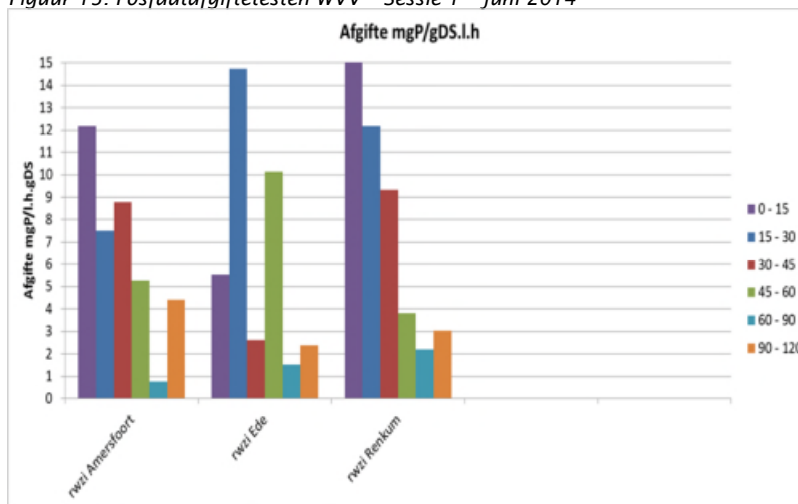
Figuur 12. Fosfaatafgiftesnelheid HDSR - Sessie 2 - oktober 2014 [mgP/gDS.l.h]

Figuur 13 representeert de metingen gedaan op de monsters van de geselecteerde RWZI's van WVV in juni 2014. In figuur 14 zijn de fosfaatafgiftesnelheden weergegeven die betrekking hebben op de fosfaatafgiftetesten in juni 2014.

Alle drie RWZI's zijn Bio-P zuiveringen met een (geringe) aanvullende chemische defosfatering. De afgiftetesten, inclusief de voor drogestof gecorrigeerde afgifteresultaten, laten dit zien.



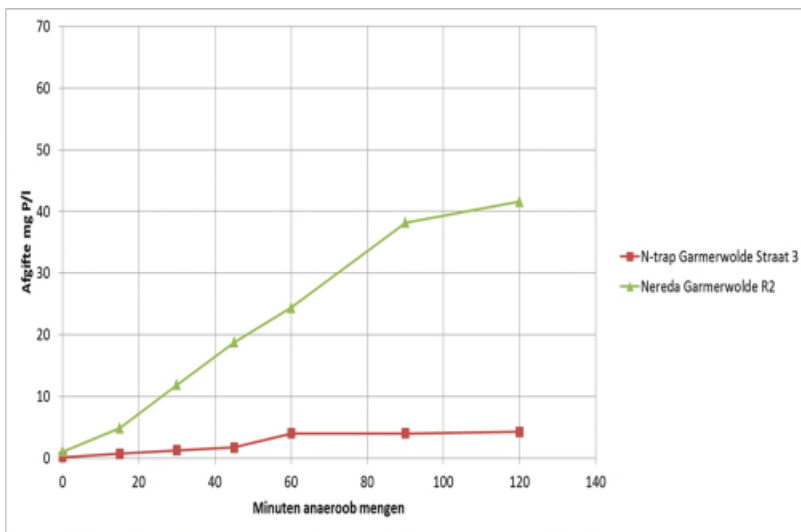
Figuur 13. Fosfaatafgiftetesten WVV - Sessie 1 - juni 2014



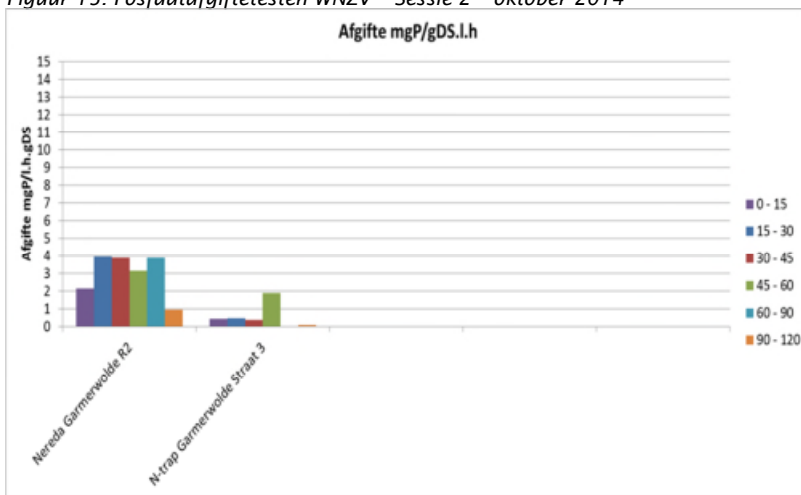
Figuur 14. Fosfaatafgiftesnelheid WVV - Sessie 1 - juni 2014 [mgP/gDS.l.h]

Figuur 15 representeert de metingen gedaan op de monsters van de geselecteerde RWZI's van WNZV in oktober 2014. In figuur 16 zijn de fosfaatafgiftesnelheden weergegeven die betrekking hebben op de fosfaatafgiftetesten in oktober 2014.

Het korrelslib van Nereda Garmerwolde laat een duidelijke afgifte zien. De afgifte, gecorrigeerd per gram droge stof is wel relatief laag en duidelijk minder dan de afgifte van het Nereda slib van Utrecht. De P-afgifte in de conventionele straat van Garmerwolde is zoals verwacht vrijwel nihil.



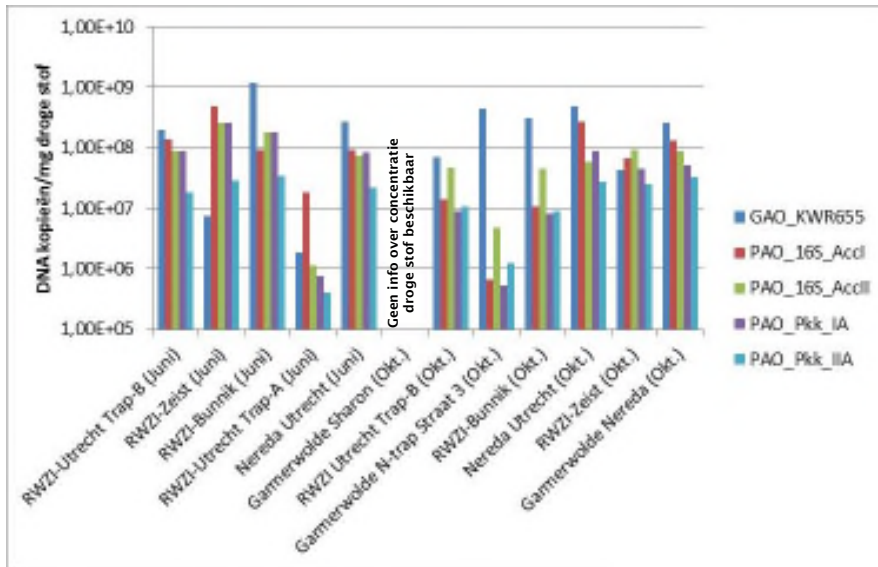
Figuur 15. Fosfaatafgiftetesten WNZV - Sessie 2 - oktober 2014



Figuur 16. Fosfaatafgiftesnelheid WNZV - Sessie 2 - oktober 2014 [mgP/gDS.l.h]

5 Analyse resultaten qPCR testen met P-afgifte testen

De resultaten van de metingen van het DNA van de GAO en PAO-bacteriën, gecorrigeerd voor de drogestof concentraties, zijn in figuur 17 weergegeven.



Figuur 17. PAO en GAO concentraties in actief slib op basis van qPCR analyses

Hieruit kan het volgende worden opgemaakt:

Slibsoorten waarbij volgens verwachting geen of weinig biologische fosfaatverwijdering zou moeten optreden (zie tabel 9) laten ook geen of vrij lage aantallen PAO's en GAO's zien. Dit betreft het A-trap slib van de RWZI Utrecht, een hoogbelast actiefslibproces dat een zeer korte slibleeftijd kent en vooral gericht is op adsorptie van organische stof en niet op nutriëntenverwijdering; het slib vanuit de Sharon deelstroombehandeling, een proces dat alleen op stikstofverwijdering is gericht een biologische opname van fosfaat kent; en het slib van de conventionele straat van de RWZI Garmerwolde dat naast stikstofverwijdering het fosfaat voornamelijk chemisch verwijdert.

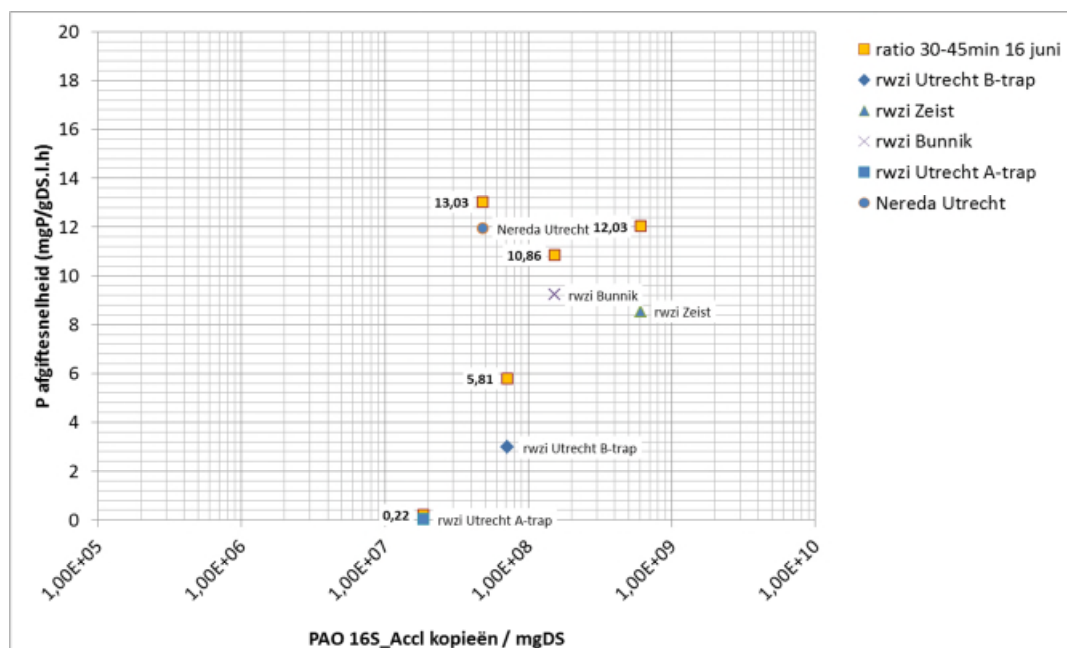
De slibsoorten van Zeist, Bunnik, Nereda Utrecht, Nereda Garmerwolde en B-Trap Utrecht laten hogere aantallen PAO's en GAO's zien. Het slib van de RWZI Zeist tijdens de eerste meetsessie bevat de meeste PAO-bacteriën (tussen de $1,0 \times 10^8$ en $1,0 \times 10^9$ / mg DS). Het slib van de RWZI Bunnik zit daar net iets onder maar heeft echter een meerderheid aan GAO-bacteriën. Al deze slibsoorten hebben volgens verwachting meer of mindere biologische fosfaatverwijdering (zie tabel 9), dat zou moeten resulteren in hogere aantallen PAO's. Opmerkelijk is dat het slib van de B-trap van RWZI Utrecht hogere aantallen laat zien dan dat op voorhand verwacht zou worden (zie tabel 9). Blijkbaar treedt daar meer Bio-P op dan op voorhand is aangenomen.

Bij de RWZI Bunnik is bekend dat er een relatief geringe hoeveelheid fosfaat in het afvalwater zit ten opzichte van de hoeveelheid organische stof (BZV of CZV). Dit als gevolg van een

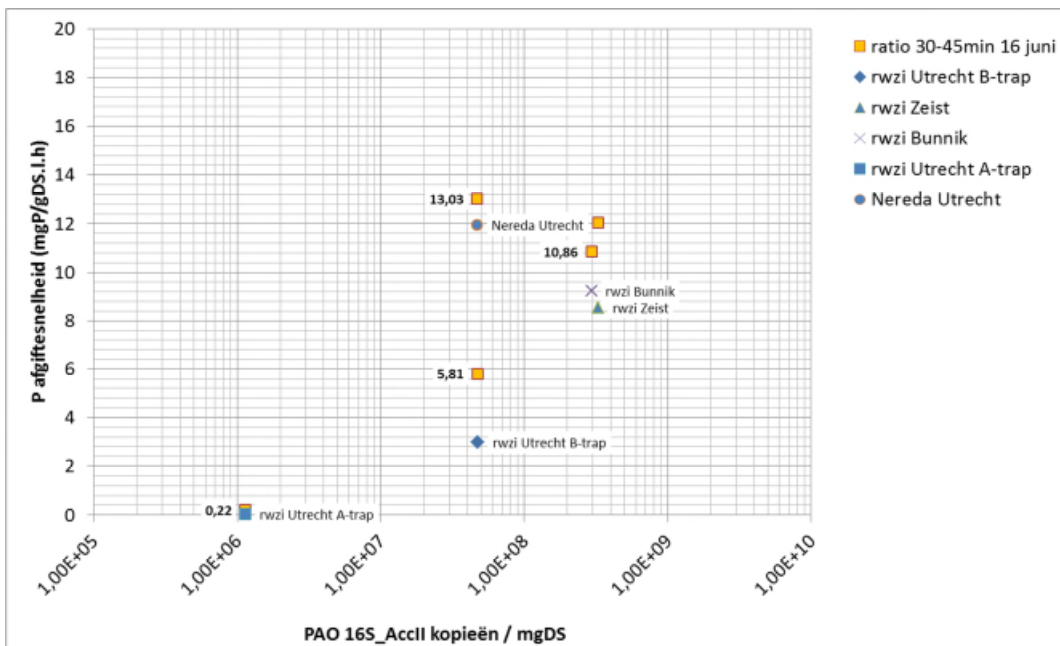
hoog aandeel industrieel afvalwater (Vrumona). Deze hoge BZV/CZV;P verhouding van het afvalwater resulteert er in dat de omstandigheden voor biologische P-verwijdering gunstig zijn, maar dat de volle P-opname capaciteit van het slib niet kan worden benut vanwege de limitatie aan P in het afvalwater. Dit verklaart de hogere aantallen GAO's ten opzichte van het aantal PAO's voor beide meet sessies met het Bunnik slib in vergelijking met de andere RWZI's.

In figuur 18 is de qPCR kwantificatie van de specifieke PAO, type 16S_Accl, uitgezet tegen de gemeten fosfaat- (P)-afgiftesnelheden. Dit is gebeurd gebruikmakend van een logaritmische schaal voor de aantallen PAO's. In figuur 19 is ditzelfde gedaan voor het PAO type 16S_AcclI. De blauwe markers zijn de gekwantificeerde bacteriën vergeleken met de afgiftesnelheden tussen de 15 en 30 minuten na het starten van het afgifte experiment. In beide figuren zijn additioneel ook de P-afgifte snelheden tussen de 30 en 45 minuten weergegeven via de gele vierkante markers.

De resultaten van de qPCR metingen gecombineerd met de resultaten van de fosfaatafgifteproeven laten zien dat de RWZI's met hoogste PAO bacterie populatie per gewichtshoeveelheid ook de hoogste fosfaatafgiftesnelheden hebben, gecorrigeerd voor het drogestofgehalte. Dit verband is bij beide specifieke PAO soorten te zien. Het slib afkomstig van de Nereda-installatie is echter afwijkend van dit verband. Dit slib kenmerkt zich door een groter aandeel slib in een granulaire vorm dan door een slib in een diffusere vlokstructuur. Bij het meer granulaire slib van de Nereda-installatie ligt de P-afgiftesnelheid per hoeveelheid PAO hoger. Ondanks het feit dat de Nereda-installaties per gram drogestof minder specifieke PAO bacteriën bevatten zijn de fosfaatafgiftesnelheden het hoogst. Mogelijk is er sprake van een groter efficiëntie van het Bio-P proces in deze bacteriepopulatie.



Figuur 18. PAO 16S_AcclI vs fosfaatafgifte snelheid (mgP/gDS.l.h)



Figuur 19. PAO 16S_AccII vs fosfaatafgifte snelheid (mgP/gDS.l.h)

6 Conclusies en aanbevelingen

6.1 Conclusies

Op grond van dit verkennend onderzoek naar de mogelijkheden voor de qPCR techniek voor toepassing binnen de afvalwaterzuivering, en in het bijzonder voor het kwantificeren van PAO en GAO in het (beheersen van) proces van biologische fosfaatverwijdering, kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- De ontwikkeling en testen en valideren van primers en probes is geslaagd voor specifieke detectie en kwantificatie met de qPCR techniek van PAO- en GAO-soorten, bacteriën die op grond van de literatuur voorkomen in zuiveringsslib met biologische fosfaatverwijdering. Via de qPCR techniek zijn deze specifieke organismen kwantitatief te detecteren in het zuiveringsslib.
- Er is een verband tussen de aantallen PAO-bacteriën gedetecteerd in zuiveringsslib met de qPCR techniek, en de gemeten fosfaatafgiftesnelheid in hetzelfde slib. Op basis van deze eerste beperkte meetcampagne lijkt het dus mogelijk om het Bio-P proces te volgen met het toepassen van de in deze studie ontwikkelde qPCR voor PAO en GAO.
- Bio-P slib met een meer granulaire structuur (Nereda slib) dan vlokkige structuur heeft, op basis van de in dit onderzoek uitgevoerde meetsessies, een afwijkende verhouding tussen de fosfaatafgifte en de hoeveelheid aanwezige PAO's.

6.2 Aanbevelingen voor vervolgonderzoek

Op basis van de resultaten van deze verkennende studie worden de volgende aanbevelingen voor verder onderzoek gedaan:

- Om de gevonden correlatie tussen aantallen PAO's en GAO's en de P-afgifte in zuiveringsslib verder te onderzoeken en statistisch te onderbouwen zullen aanvullende meetcampagnes moeten worden uitgevoerd waarbij ook meerdere slibsoorten van verschillende zuiveringen worden onderzocht.
- Het uitvoeren van metingen aan nauwkeurig gecontroleerde laboratoriumopstellingen kan ook gebruikt worden om beter inzicht te krijgen in de bruikbaarheid van de ontwikkelde qPCR methoden voor het monitoren en sturen van het Bio-P proces. Overwogen kan worden om Bio-P slibsoorten die via een constante en eenduidige koolstofbron (bijv. acetaat) zijn gevoed in laboratoriumopstellingen te onderwerpen aan meetsessies. Er is dan sprake van een meer eenduidige slibsamenstelling die gevarieerd kan worden in de hoeveelheid biologisch opgeslagen fosfaat. Door de hoeveelheid fosfaat in de voeding (= het afvalwater) te variëren ten opzichte van de hoeveelheid koolstof is het de verwachting dat meer eenduidig onderzoek kan worden gedaan naar de verdeling tussen PAO's en GAO. Een indicatie daarvoor is al binnen deze verkenning verkregen door de vergelijking van de resultaten van het slib van de RWZI Bunnik (weinig P ten opzichten van koolstof) met de andere Bio-P slibsoorten.
- In de nu uitgevoerde meetsessies naar P-afgifte en hoeveelheden PAO's en GAO's is gecorrigeerd voor de aanwezige hoeveelheid slib via een correctie op basis van

droge stof. Het anorganische deel van het slib en het organische (bacterie) deel van het slib is niet voor alle slibsoorten gelijk, onder andere door bijv. het aandeel chemisch fosfaatslib. Het is mogelijk om bij de verwerking van de resultaten een correctie naar organische fractie uit te voeren, en daarmee de analyse van het slib uit te breiden met een asrestanalyse (= maat voor het anorganische fractie). Voor de qPCR analyses is het ook mogelijk om een "algemene" 16S rRNA toe te passen om hiermee de concentratie DNA van (vrijwel) alle bacteriën in het slib te bepalen en i.c.m. met de PAO- en GAO-specifieke qPCR methoden de relatie tussen het totaal aantal bacteriën en Bio-P bacteriën te bepalen. Door deze correcties uit te voeren is het mogelijk om gestandaardiseerde metingen uit te voeren op de niet homogene afvalwatermonsters met wisselende samenstelling.

7 Literatuur

1. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410.
2. **Crocetti, G. R., J. F. Banfield, J. Keller, P. L. Bond, and L. L. Blackall.** 2002. Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology* **148**:3353-3364.
3. **Crocetti, G. R., P. Hugenholtz, P. L. Bond, A. Schuler, J. Keller, D. Jenkins, and L. L. Blackall.** 2000. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Applied and environmental microbiology* **66**:1175-1182.
4. **Eschenhagen, M., M. Schuppler, and I. Roske.** 2003. Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. *Water Res* **37**:3224-3232.
5. **Flowers, J. J., T. A. Cadkin, and K. D. McMahon.** 2013. Seasonal bacterial community dynamics in a full-scale enhanced biological phosphorus removal plant. *Water Res* **47**:7019-7031.
6. **Flowers, J. J., S. He, S. Yilmaz, D. R. Noguera, and K. D. McMahon.** 2009. Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different "Candidatus Accumulibacter" clades. *Environ Microbiol Rep* **1**:583-588.
7. **Ge, H., D. J. Batstone, and J. Keller.** 2014. Biological phosphorus removal from abattoir wastewater at very short sludge ages mediated by novel PAO clade Comamonadaceae. *Water Res* **22**:173-182.
8. **He, S., F. I. Bishop, and K. D. McMahon.** 2010. Bacterial community and "Candidatus Accumulibacter" population dynamics in laboratory-scale enhanced biological phosphorus removal reactors. *Applied and environmental microbiology* **76**:5479-5487.
9. **He, S., D. L. Gall, and K. D. McMahon.** 2007. "Candidatus Accumulibacter" population structure in enhanced biological phosphorus removal sludges as revealed by polyphosphate kinase genes. *Applied and environmental microbiology* **73**:5865-5874.
10. **He, S., and K. D. McMahon.** 2011. 'Candidatus Accumulibacter' gene expression in response to dynamic EBPR conditions. *Isme J* **5**:329-340.
11. **He, S., and K. D. McMahon.** 2011. Microbiology of 'Candidatus Accumulibacter' in activated sludge. *Microbial biotechnology* **4**:603-619.
12. **He, Z., S. Xiao, X. Xie, H. Zhong, Y. Hu, Q. Li, F. Gao, G. Li, J. Liu, and G. Qiu.** 2007. Molecular diversity of microbial community in acid mine drainages of Yunfu sulfide mine. *Extremophiles* **11**:305-314.
13. **Janssen, P. M. J., K. Meinerna, H. F. van der Roest, and M. C. M. van Loosdrecht.** 2001. Handboek biologische fosfaatverwijdering. STOWA rapport.
14. **Kim, J. M., H. J. Lee, D. S. Lee, and C. O. Jeon.** 2013. Characterization of the denitrification-associated phosphorus uptake properties of "Candidatus Accumulibacter phosphatis" clades in sludge subjected to enhanced biological phosphorus removal. *Applied and environmental microbiology* **79**:1969-1979.
15. **Kong, Y., J. L. Nielsen, and P. H. Nielsen.** 2005. Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Applied and environmental microbiology* **71**:4076-4085.
16. **Mielczarek, A. T., H. T. Nguyen, J. L. Nielsen, and P. H. Nielsen.** 2013. Population dynamics of bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal in Danish wastewater treatment plants. *Water Res* **47**:1529-1544.
17. **Oehmen, A., P. C. Lemos, G. Carvalho, Z. Yuan, J. Keller, L. L. Blackall, and M. A. Reis.** 2007. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Res* **41**:2271-2300.

18. **Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, and F. O. Glockner.** 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**:D590-596.
19. **Winkler, M., E. R. Coats, and C. K. Brinkman.** 2011. Advancing post-anoxic denitrification for biological nutrient removal. *Water Research* **45**:6119-6130.
20. **Zilles, J. L., J. Peccia, M. W. Kim, C. H. Hung, and D. R. Noguera.** 2002. Involvement of Rhodocyclus-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants. *Applied and environmental microbiology* **68**:2763-2769.

Bijlage I qPCR metingen GAO- en PAO-bacteriën

GAO-specifieke metingen met GAO-16S_KWR655

KWR Nummer	Binnenkomst monster	RWZI	Gem DNA kopieën/ml	DS mg/ml	Gemiddeld DNA kopieën/mg droge stof
Water_Slib mengsel					
M141589	16-6-2014	RWZI-Utrecht Trap-B	1,31E+09	6,70	1,95E+08
M141591	16-6-2014	RWZI-Zeist	3,54E+07	4,68	7,56E+06
M141592	16-6-2014	RWZI-Bunnik	5,12E+09	4,29	1,19E+09
M141588	16-6-2014	RWZI-Utrecht Trap-A	7,73E+06	4,20	1,84E+06
M141590	16-6-2014	Nereda Utrecht	1,61E+09	6,04	2,66E+08
M143608	21-10-2014	Garmerwolde Sharon	1,38E+07		#DIV/0!
M143609	21-10-2014	Utrecht B1	2,73E+08	3,93	6,94E+07
M143610	21-10-2014	Garmerwolde N-trap Straat 3	2,12E+09	4,80	4,42E+08
M143611	21-10-2014	Bunnik	1,40E+09	4,58	3,05E+08
M143612	21-10-2014	Nereda Utrecht	2,35E+09	4,83	4,86E+08
M143613	21-10-2014	RWZI Zeist	1,68E+08	3,96	4,24E+07
M143614	21-10-2014	Garmerwolde Nereda	1,81E+09	7,09	2,55E+08
Aparte analyses uitgevoerd op DNA uit slib- en waterfase, de gemiddelde waarde is in de tabel weergegeven Analyses uitgevoerd op DNA uit gehomogeniseerde suspensie van water en slib					

PAO-specifieke metingen met PAO-16S_Accl

KWR Nummer	Binnenkomst monster	RWZI	Gem DNA kopieën/ml	DS mg/ml	Gemiddeld DNA kopieën/mg droge stof
Water_Slib mengsel					
M141589	16-6-2014	RWZI-Utrecht Trap-B	9,09E+08	6,70	1,36E+08
M141591	16-6-2014	RWZI-Zeist	2,24E+09	4,68	4,78E+08
M141592	16-6-2014	RWZI-Bunnik	4,04E+08	4,29	9,41E+07
M141588	16-6-2014	RWZI-Utrecht Trap-A	7,78E+07	4,20	1,85E+07
M141590	16-6-2014	Nereda Utrecht	5,59E+08	6,04	9,26E+07
M143608	21-10-2014	Garmerwolde Sharon	3,97E+05		#DIV/0!
M143609	21-10-2014	Utrecht B1	5,50E+07	3,93	1,40E+07
M143610	21-10-2014	Garmerwolde N-trap Straat 3	3,14E+06	4,80	6,54E+05
M143611	21-10-2014	Bunnik	5,01E+07	4,58	1,09E+07
M143612	21-10-2014	Nereda Utrecht	1,31E+09	4,83	2,70E+08
M143613	21-10-2014	RWZI Zeist	2,68E+08	3,96	6,78E+07
M143614	21-10-2014	Garmerwolde Nereda	9,47E+08	7,09	1,33E+08
Aparte analyses uitgevoerd op DNA uit slib- en waterfase, de gemiddelde waarde is in de tabel weergegeven Analyses uitgevoerd op DNA uit gehomogeniseerde suspensie van water en slib					

PAO-specifieke metingen met PAO-16S_AcII

KWR Nummer	Binnenkomst monster	RWZI	Gem DNA kopieën/ml	DS mg/ml	Gemiddeld DNA kopieën/mg droge stof
			Water_Slib mengsel		
M141589	16-6-2014	RWZI-Utrecht Trap-B	5,99E+08	6,70	8,94E+07
M141591	16-6-2014	RWZI-Zeist	1,20E+09	4,68	2,57E+08
M141592	16-6-2014	RWZI-Bunnik	7,82E+08	4,29	1,82E+08
M141588	16-6-2014	RWZI-Utrecht Trap-A	4,75E+06	4,20	1,13E+06
M141590	16-6-2014	Nereda Utrecht	4,37E+08	6,04	7,25E+07
M143608	21-10-2014	Garmerwolde Sharon	5,20E+05		#DIV/0!
M143609	21-10-2014	Utrecht B1	1,86E+08	3,93	4,73E+07
M143610	21-10-2014	Garmerwolde N-trap Straat 3	2,29E+07	4,80	4,76E+06
M143611	21-10-2014	Bunnik	2,04E+08	4,58	4,45E+07
M143612	21-10-2014	Nereda Utrecht	2,90E+08	4,83	6,00E+07
M143613	21-10-2014	RWZI Zeist	3,63E+08	3,96	9,17E+07
M143614	21-10-2014	Garmerwolde Nereda	6,18E+08	7,09	8,71E+07
Aparte analyses uitgevoerd op DNA uit slib- en waterfase, de gemiddelde waarde is in de tabel weergegeven					
Analyses uitgevoerd op DNA uit gehomogeniseerde suspensie van water en slib					

PAO-specifieke metingen met PAO-ppk_IA

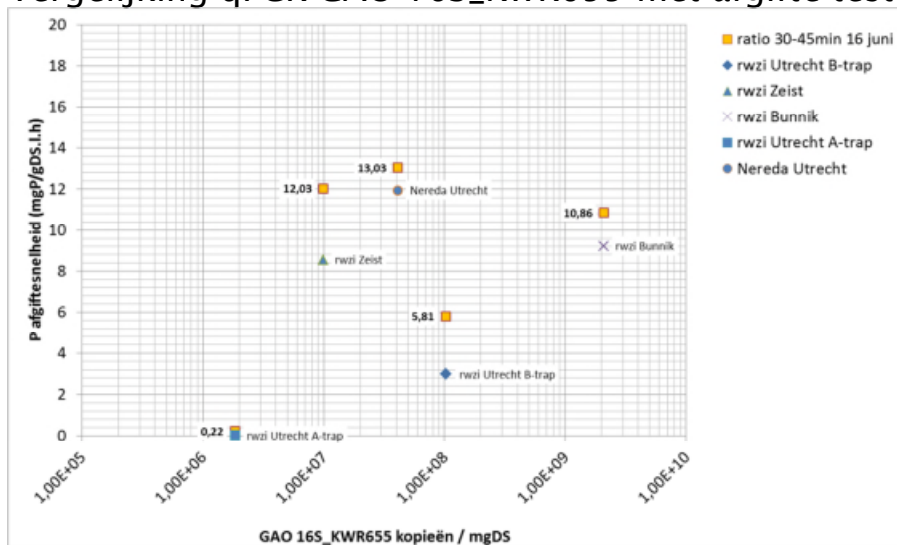
KWR Nummer	Binnenkomst monster	RWZI	Gem DNA kopieën/ml	DS mg/ml	Gemiddeld DNA kopieën/mg droge stof
			Water_Slib mengsel		
M141589	16-6-2014	RWZI-Utrecht Trap-B	5,99E+08	6,70	8,94E+07
M141591	16-6-2014	RWZI-Zeist	1,20E+09	4,68	2,57E+08
M141592	16-6-2014	RWZI-Bunnik	7,82E+08	4,29	1,82E+08
M141588	16-6-2014	RWZI-Utrecht Trap-A	3,20E+06	4,20	7,62E+05
M141590	16-6-2014	Nereda Utrecht	5,06E+08	6,04	8,38E+07
M143608	21-10-2014	Garmerwolde Sharon	2,61E+05		#DIV/0!
M143609	21-10-2014	Utrecht B1	3,52E+07	3,93	8,96E+06
M143610	21-10-2014	Garmerwolde N-trap Straat 3	2,60E+06	4,80	5,40E+05
M143611	21-10-2014	Bunnik	3,73E+07	4,58	8,13E+06
M143612	21-10-2014	Nereda Utrecht	4,28E+08	4,83	8,86E+07
M143613	21-10-2014	RWZI Zeist	1,79E+08	3,96	4,53E+07
M143614	21-10-2014	Garmerwolde Nereda	3,65E+08	7,09	5,15E+07
Aparte analyses uitgevoerd op DNA uit slib- en waterfase, de gemiddelde waarde is in de tabel weergegeven					
Analyses uitgevoerd op DNA uit gehomogeniseerde suspensie van water en slib					

PAO-specifieke metingen met PAO-ppk_IIA

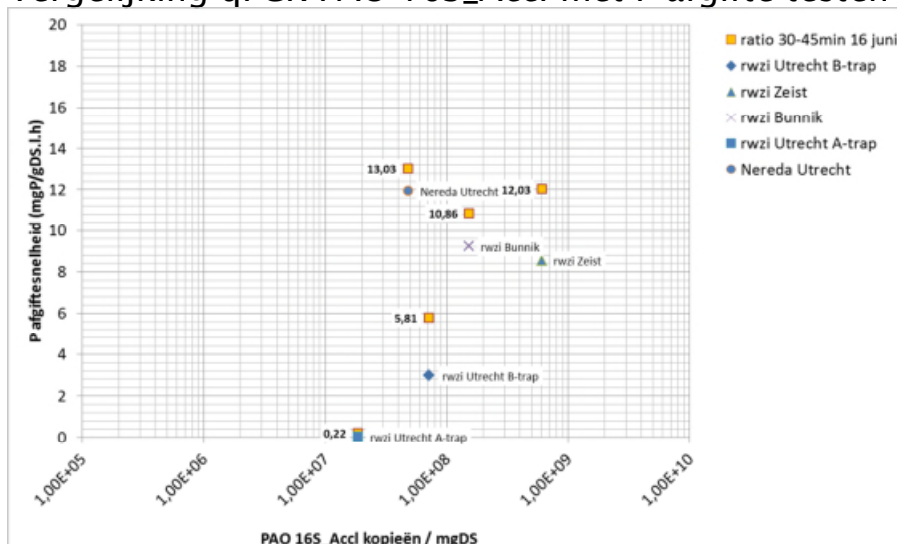
KWR	Binnenkomst	RWZI	Gem DNA	DS	Gemiddeld
Nummer	monster		kopieën/ml	mg/ml	DNA kopieën/mg droge stof
			Water	Slib	mengsel
M141589	16-6-2014	RWZI-Utrecht Trap-B	1,22E+08	6,70	1,83E+07
M141591	16-6-2014	RWZI-Zeist	1,35E+08	4,68	2,87E+07
M141592	16-6-2014	RWZI-Bunnik	1,51E+08	4,29	3,51E+07
M141588	16-6-2014	Nereda Utrecht Trap A	1,70E+06	4,20	4,04E+05
M141590	16-6-2014	Nereda Utrecht	1,34E+08	6,04	2,22E+07
M143608	21-10-2014	Garmerwolde Sharon	1,69E+05		#DIV/0!
M143609	21-10-2014	Utrecht B1	4,18E+07	3,93	1,06E+07
M143610	21-10-2014	Garmerwolde N-trap Straat 3	5,84E+06	4,80	1,22E+06
M143611	21-10-2014	Bunnik	4,14E+07	4,58	9,04E+06
M143612	21-10-2014	Nereda Utrecht	1,34E+08	4,83	2,78E+07
M143613	21-10-2014	RWZI Zeist	9,78E+07	3,96	2,47E+07
M143614	21-10-2014	Garmerwolde Nereda	2,35E+08	7,09	3,31E+07
Aparte analyses uitgevoerd op DNA uit slib- en waterfase, de gemiddelde waarde is in de tabel weergegeven					
Analyses uitgevoerd op DNA uit gehomogeniseerde suspensie van water en slib					

Bijlage II vergelijking qPCR metingen met afgiftetesten 16 juni 2014

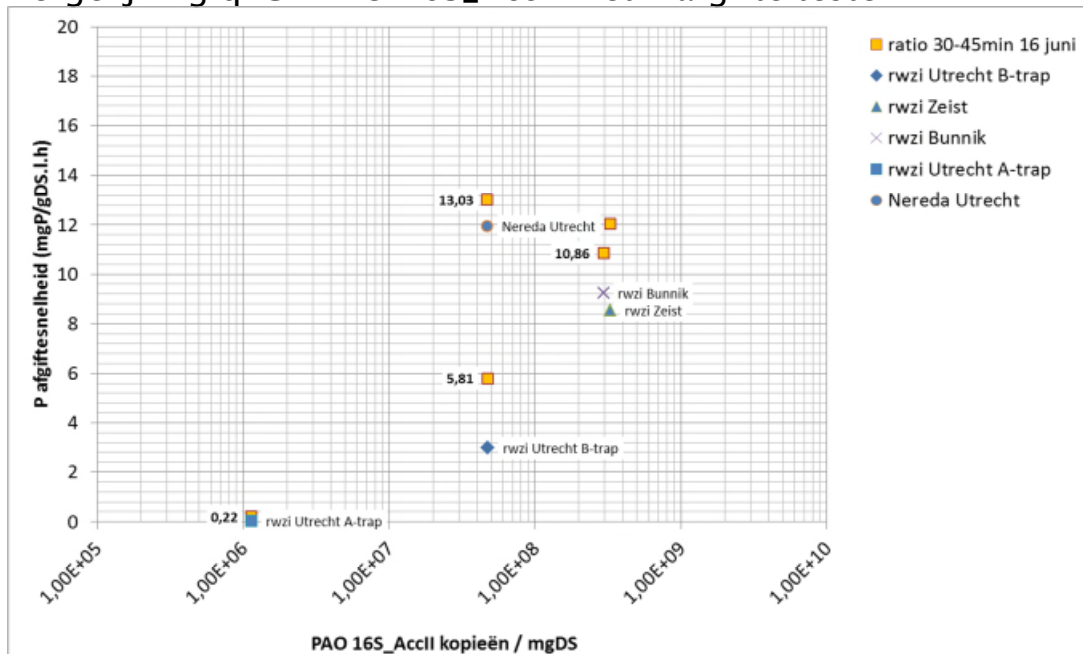
Vergelijking qPCR GAO 16S_KWR655 met afgifte testen



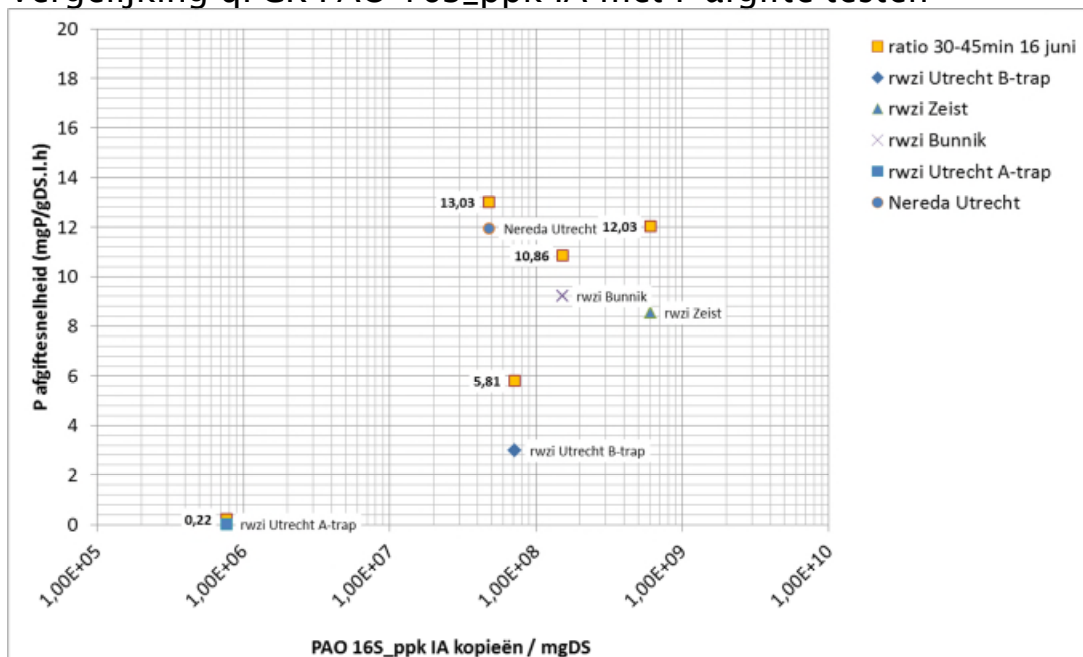
Vergelijking qPCR PAO 16S_AccI met P-afgifte testen



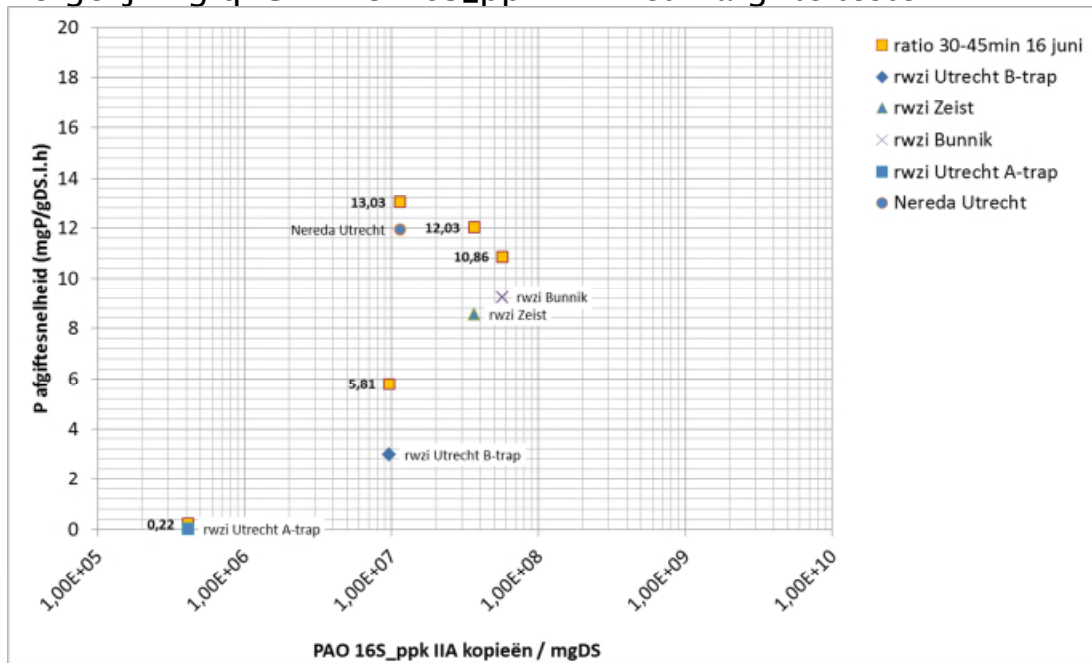
Vergelijking qPCR PAO 16S_AcII met P-afgifte testen



Vergelijking qPCR PAO 16S_ppk IA met P-afgifte testen

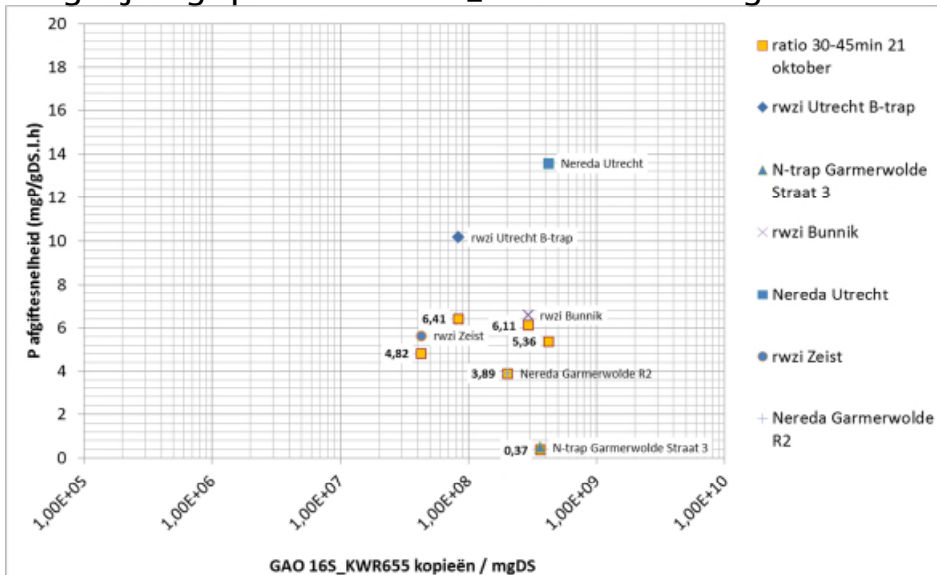


Vergelijking qPCR PAO 16S_ppk IIA met P-afgifte testen

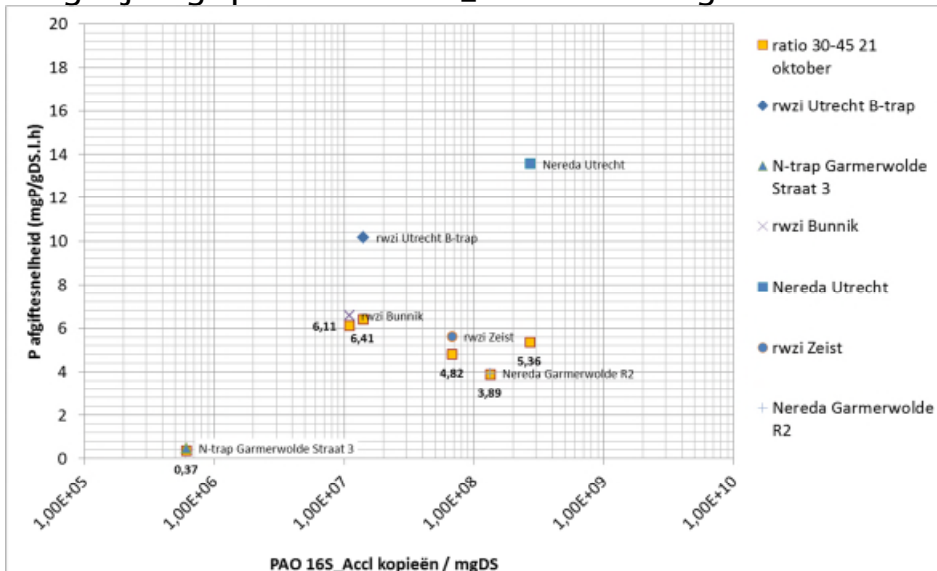


Bijlage III vergelijking qPCR metingen met afgiftetesten 21 oktober 2014

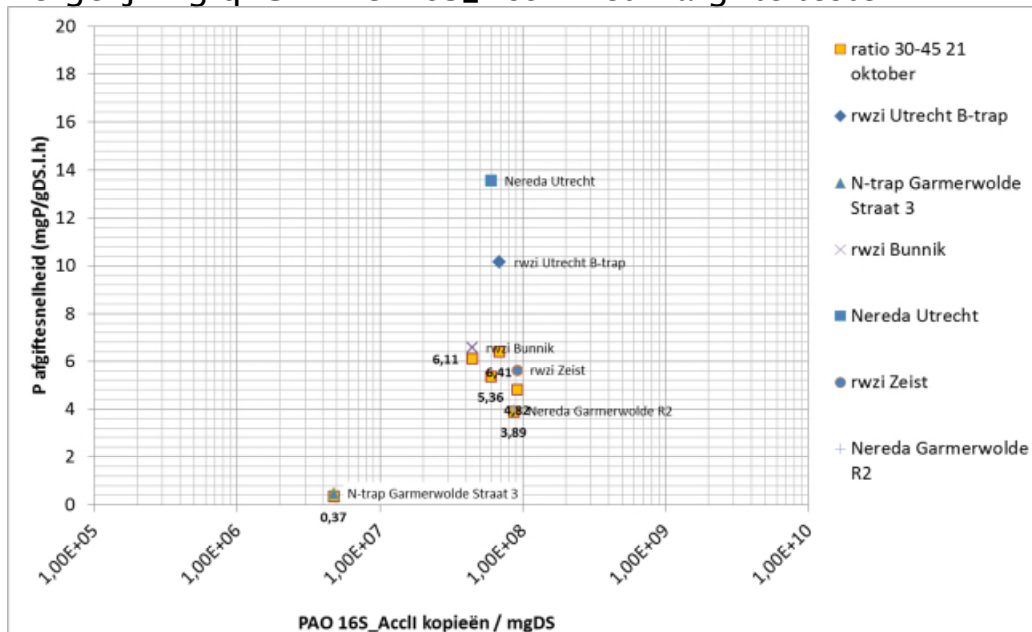
Vergelijking qPCR GAO 16S_KWR655 met afgifte testen



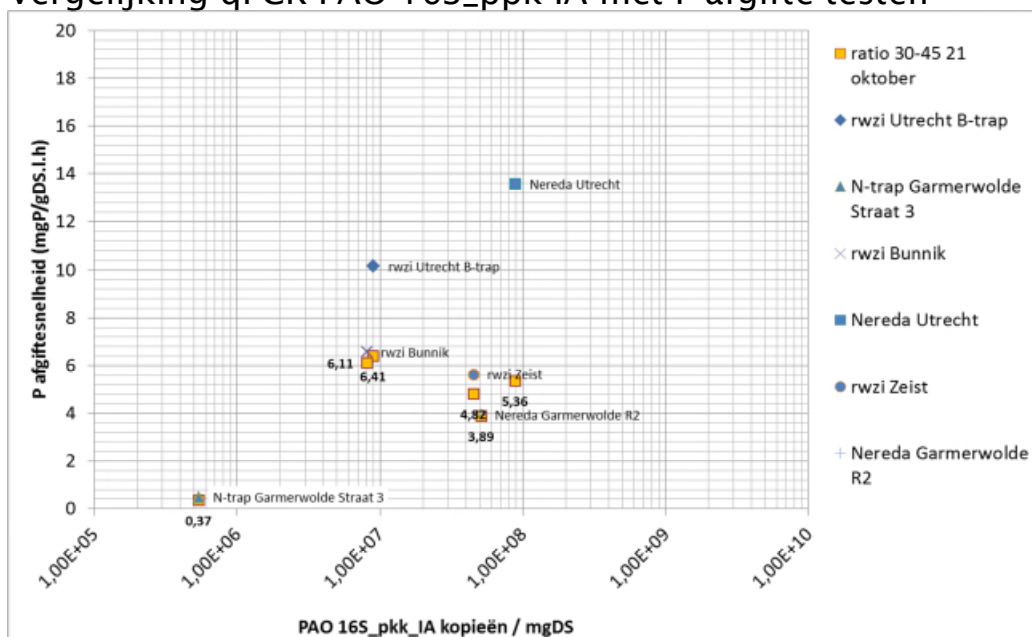
Vergelijking qPCR PAO 16S_Accl met P-afgifte testen



Vergelijking qPCR PAO 16S_AcII met P-afgifte testen



Vergelijking qPCR PAO 16S_ppk IA met P-afgifte testen



Vergelijking qPCR PAO 16S_ppk IIA met P-afgifte testen

