

Indhold

1.	Sammenfatning	3
2.	Indledning.....	4
2.1	Baggrund	4
2.2	Undersøgelse af biofilm.....	5
2.3	Formål	5
3.	Prøvelokaliteter	5
3.1	Undersøgelsesstrategi	6
4.	Metodebeskrivelse for prøvetagning af biofilm- og luftprøver	8
4.1	Prøvetagning luftprøver (kulrør).....	8
4.2	Prøvetagning luftprøver (ORSA-rør)	9
4.3	Prøvetagning af biofilm	9
4.4	Sekvensering af biofilmprøver	9
5.	Analyseresultater og diskussion af disse.....	10
5.1	Observationer under feltarbejde	10
5.2	Luftprøveresultater	12
5.3	Udvikling af prøvetagning for biofilm.....	14
5.4	Det mikrobiologiske samfund	14
6.	Konklusion	18
7.	Referencer.....	18

Bilag

Bilag 1 – Samlet bilag (Rapporter fra DNASence og samlet analyserapport, ALS)

Projektnummer: 10411759
 Modtager: Region Syddanmark
 Dato: 18-02-2025
 Udarbejdet af: Thomas Leonhardt Husted & Jette Karstoft, NIRAS A/S, Ceres Alle 3, 8000 Aarhus C
 Kontrolleret af: Jonas Frigaard
 Godkendt af: Jette Karstoft

Ansvarsfraskrivelse:

Region Syddanmark vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporten, som er finansieret med puljemidler fra "Den Syddanske Udviklingspulje for rent vand og jord". Det skal bemærkes, at offentliggørelse af rapporten ikke nødvendigvis betyder, at Region Syddanmark er enig i rapportens indhold og konklusioner, men udelukkende er med henblik på at dele viden om teknologiudviklingen på jordforureningsområdet.

1. Sammenfatning

Projektets formål er at blive klogere på den biofilm, der er til stede på de udvalgte lokaliteter. Biofilmene undersøges for tilstedeværelse af bakterier inden for *Dehalococcoides*-slægten, der er kendt for at kunne nedbryde PCE og TCE til vinylklorid. Derudover blev teknikker til prøvetagning afprøvet for at sikre en stabil prøvetagningsmetode.

I dette projekt er 6 lokaliteter blevet udvalgt til feltarbejde i kloakinstallationer – dels ved udtagning af luftprøver og dels ved udtagning af biofilmprøver.

Det lykkedes at udvikle en prøveudtagningsmetode til biofilm på bagsiden af vandlåse uden at fortage destruktive indgreb på rørsystemet. Duplikater af biofilm gav i alle tilfælde meget ens resultater, hvilket indikerer, at prøvetagning kunne replikeres.

Det mikrobiologiske samfund fra ens prøvetagningssteder var i større grad beslægtet med hinanden, herunder specielt samlebrønde og køkkenvaske. Prøvetagningsstederne internt på lokaliteterne viste i mindre grad sammenhæng mellem de mikrobiologiske samfund. Den højeste mikrobiologiske diversitet blev målt i samlebrøndsprøver, mens køkkenvaskprøver viste den laveste diversitet. Derved er den største artsrigdom og relative forekomst fundet i samlebrønde.

Gennem sekvenseringsanalyserne af de indsamlede prøver blev slægten *Dehalococcoides* ikke direkte fundet. Til gengæld blev klassen *Dehalococcoidia* fundet på lokalitet 2. Det har gjort os nysgerrige på, om bakterierne til stede i denne biofilm kan bidrage til, at der måles vinylkloridkoncentrationer over detektionsgrænsen på lokaliteten.

Resultaterne fra denne rapport giver ikke et klart billede af, om de rigtige bakterier er til stede for omsætning af PCE og TCE til vinylklorid, men der er forhold, der er værd at se nærmere på. Derfor er der indsendt en ansøgning til Den Syddanske Uddannelsespulje for at undersøge nærmere i hvilket omfang biofilmen bidrager til produktion af vinylklorid i kloakker. Ansøgningen er indsendt i samarbejde med Aalborg Universitet, som vil udføre forsøg i laboratorie. Projektet har fået bevilget penge /4/.

2. Indledning

2.1 Baggrund

Igennem årene er der kommet mere og mere fokus på, at kloaksystemet kan fungere som spredningsvej for forureningskomponenter ind i indeluften på boligejendomme. Der er desuden kommet fokus på, at der på flere og flere lokaliteter registreres et betydeligt indhold af vinylklorid bag vandlåse og i samlebrønde.

Vinylklorid (VC) er det stof, af de klorerede opløsningsmidler, som er mest sundhedsskadeligt og har derfor også det laveste afdampningskriterium, hvilket gør, at stoffet ofte bliver det risikobærende stof i en risikovurdering.

Der foreligger ikke stor viden på området og det er uvist, om vinylklorid konstateres, fordi det trænger ind i kloaksystemet som forurenede grundvand og/eller forurenede poreluft, eller om årsagen er, at vinylklorid (VC) dannes i kloaksystemet som biprodukt af nedbrydning af tetrachlorethylen (PCE) eller trichloroethylen (TCE), eller måske en kombination. Der kan også være tale om evt. afsmittning fra de materialer, som kloakken er lavet af.

Det kan konstateres, ved regionernes forureningsundersøgelser, at vinylklorid i kloaksystemet derudover konstateres i en stor radius fra de forurenede lokaliteter og dermed kan skabe indeluftproblemer i flere af de omkringliggende boliger, som ikke er kortlagte og hvor vinylklorid dermed kan udgøre en potentiel sundhedsrisiko, som ingen kender til.

Som et fælles projekt mellem Region Midtjylland og Region Syddanmark, har regionerne besluttet at undersøge problematikken med vinylklorid i kloakker nærmere, for at kunne vurdere, om der kan opnås større viden forud for en risikovurdering overfor boliger. Formålet med det samlede projektet er nærmere at undersøge:

- Mulig dannelse af vinylklorid i kloaksystemet
- Potentiel afsmittning fra plastmaterialer, som kloakken kan være udført i
- Afdækning af metoder til måling for vinylklorid i ind- og udland
- Opbygning af en database, hvor forureningsager med påvist vinylklorid kan sammenstilles, og tendenser kan undersøges nærmere

Dette projekt ønsker at belyse hvorvidt, der er de rette bakterier til stede i kloaksystemer der kan nedbryde en eventuel forurening med PCE og TCE til vinylklorid (og dermed undersøge punktet "sker der dannelse af vinylklorid i kloaksystemet").

Som en indledende øvelse, er der udført en litteraturgennemgang (udført af NIRAS for Region Syddanmark) i 2021 som har afdækket, at der kan ske en omdannelse af PCE til vinylklorid i sediment fra spildevandssystemer, da der foregår en biologisk aktivitet i den biofilm og det sediment, der forekommer i spildevandssystemer /3/. Denne omsætning er tilskrevet slægten *Dehalococcoides*. Derudover (i samme fælles projekt) er der gennemført et projekt omkring potentiel afsmittning fra plastmaterialer, afdækning af metoder til måling af vinylklorid i ind- og udland. Opbygningen af en database, der indeholder data fra sager, hvor der er påvist vinylklorid i kloak, er påbegyndt.

Der er tidligere arbejdet med, at projektet skulle udføres med Sheffield Universitet som samarbejdspartner, men på grund af manglende ressourcer, har det ikke været muligt for universitet at fortsætte i projektet, hvorfor projektet er tilrettet ifølge aftale med Region Syddanmark. Indledningsvis er der således arbejdet videre med at undersøge tilstedeværelsen af bakterier med mulighed for at omsætte klorholdige molekyler i kloakker på udvalgte lokaliteter, som dette notat vil beskrive.

Det skal her bemærkes, at der på nuværende tidspunkt er indgået aftale med Aalborg Universitet om at lave yderligere forsøg omkring "I hvilket omfang biofilm bidrager til produktion af vinylchlorid i kloakker". Der er tildelt midler til dette projekt igennem Region Syddanmarks uddannelsespulje med opstart 2025 /2/.

2.2 Undersøgelse af biofilm

Biofilm er notorisk kendt for at være svære at karakterisere ved brug af traditionelle dyrkningsmetoder. Dette er især tilfældet, hvor der ledes efter specifikke bakterier, da en biofilm er et stort samfund af mange forskelligartede bakterier. For at kunne bestemme tilstedeværelsen og koncentrationen af *Dehalococcoides* bakterien med dyrkningsmetoder, ville det være nødvendigt med et artsspecifikt medie, hvor kun denne type bakterie ville kunne vokse. Et sådant medie findes ikke for *Dehalococcoides*, og derfor kan bakterien i dag ikke bestemmes med dyrkning.

Derfor gøres der i dette studie brug af sekvensering af biofilmprøver fra udvalgte lokaliteter.

Se- er en molekylærbiologisk metode, som kan bruges til at kortlægge det mikrobiologiske samfund vha. små variationer i deres DNA, som er ekstraheret fra f.eks. biofilm. Sekvensen af disse stykker af DNA sammenlignes med databaser, der indeholder DNA-sekvenser fra titusindvis af genomer (arvemateriale) fra bakterier. På Sekvensering den måde kan det bestemmes, om specifikke sekvenser fra bakterier er til stede i en prøve. Metoden gør brug af 16S rRNA genet. Når dette gen bruges kan der analyseres ned på slægtsniveau (ikke artsniveau). Genet er universelt og kan findes i alle bakterier, men med små variationer. I samme ombæring kan der også udregnes en estimeret koncentration af bakterier i biofilmen på baggrund af antal gange en specifik sekvens er blevet registreret i en given biofilmprøve. Ud fra dette kan der vurderes, om der er steder i kloaksystemet, hvor der er en højere koncentration af *Dehalococcoides* til stede, sammenlignet med andre steder.

Fejlkilder på metoden

Der gøres opmærksom på, at metoden har begrænsninger og ikke fortæller noget om aktiviteten af de enkelte bakterier, da både levende og dødt biologisk materiale vil blive registreret. Derudover vides det ikke, om levende registrerede bakterier af slægten *Dehalococcoides* kan overleve af andre næringsstoffer i dette miljø, og derved blive fundet selvom de ikke omsætter TCE eller PCE på den givende lokalitet.

2.3 Formål

Projektets formål er at blive klogere på den biofilm der er til stede på de udvalgte lokaliteter. Biofilmene undersøges om, bakterier inden for *Dehalococcoides* slægten, der kan nedbryde PCE og TCE til vinylchlorid, er til stede i spildevandssystemet, samt i hvilket omfang de relativt er til stede. En evt. tilstedeværelse vil blive sammenlignet med aktuelle vinylchloridkoncentrationer på bagsiden af vandlåsene fra tilsvarende prøvetagningssted.

3. Prøvelokaliteter

I relation til projektet er udvalgt 6 lokaliteter. I rapporten er lokaliteterne beskrevet som lokalitet 1-6 og lokaliteterne er således anonymiseret i rapporten. Lokalitet 1 er en ejendom, hvor der ikke tidligere er taget, prøver fra eller mistanke omkring forhøjede vinylchloridkoncentrationer. Denne lokalitet er brugt som reference (negativ kontrol). Lokalitet 2-5 er alle lokaliteter, hvor der er konstateret vinylchlorid i kloakken. Lokalitet 6 er udvalgt, da der ikke er konstateret vinylchlorid hverken i kloaksystemet, grundvandet eller poreluften, men derimod PCE og TCE. Formålet er at se, om biofilmen fra denne lokalitet udskiller sig fra de andre.

3.1 Undersøgelsesstrategi

På baggrund af litteraturgennemgangen i /3/, viden og erfaringer, er nedenstående undersøgelsesprogram sammensat i relation til at undersøge biofilm i kloaksystemer. Da der er tale om et udviklingsprojekt, og der er usikkerheder omkring, hvad der kan forventes af prøverne, er forsøgene udført ad to omgange, således at metoden afprøves indledningsvist i en fase 1, og efter en vurdering af metoden, er fase 2 udført. Prøvetagningsstrategien har således været:

- 1) Fase 1:
 - a. Lokalitet 1: Forventet negativt indhold af vinylklorid.
 - b. Lokalitet 2: Forventet positivt indhold af vinylklorid.
- 2) Vurdering af prøvetagningsmetode
- 3) Fase 2:
 - a. Lokalitet 1: Forventet negativt indhold af vinylklorid.
 - b. Lokalitet 3-5: Forventet positivt indhold af vinylklorid.
 - c. Lokalitet 6: Forventet negativt indhold af vinylklorid, men positivt indhold af PCE og TCE.

I relation til at finde egnede lokaliteter har Region Syddanmark og NIRAS gennemgået lokaliteter, hvor der er konstateret vinylklorid i kloak samt lokaliseret en lokalitet, hvor der ikke er konstateret vinylklorid i kloak. Region Midtjylland har bidraget med en lokalitet, hvor der, bemærkelsesværdigt, blev konstateret mere vinylklorid i nogle afløb end i andre (se figur 5.1). Lokaliteterne er således udvalgt på baggrund af en granskning. Desuden er der lavet en konkret vurdering på hver lokalitet, hvor det var mest interessant at udtage prøverne (bag hvilken vandlås og hvilken etage). Der er således både prøver fra bag vandlås på toiletter, køkkenvaske, gulvafløb og på forskellige etager. I nedenstående tabel 3.1 fremgår en oversigt over tidligere konstaterede observationer af PCE, TCE og vinylklorid i poreluft, grundvand og kloaksystemer.

Tabel 3.1: Lokaliteter udvalgt til undersøgelsen og om der er påvist indhold af hhv. PCE, TCE og vinylklorid i poreluft, grundvand og i kloak forud for nærværende undersøgelse.

Lokalitet	Poreluft			Grundvand			Kloak		
Nr.	PCE	TCE	VC	PCE	TCE	VC	PCE	TCE	VC
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-	+	-	+
3	+	+	-	-	-	-	+	+	+
4	+	+	-	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	-	+	-	-	+	+	-

I projektet er der taget 17 biofilmprøver fra kendte lokaliteter med forhøjede vinylkloridkoncentrationer bag vandlås i bygningerne, 6 biofilmprøver fra referencegrunden og 4 biofilmprøver fra lokaliteten, hvor der ikke er påvist vinylklorid på lokaliteten.

Der er bag alle vandlås, hvor der er udtaget en biofilmprøve, ligeledes udtaget en kulrørsprøve og i 3 samlebrønde er der udført en ORSA-rørs-måling. I forhold til metoden for udtagning af prøver, se afsnit 4.

I tabel 3.2 ses hvilke prøver, der er taget, og hvor i bygningen, de er taget. I tabellen fremgår desuden, om der er udtaget kulrør og ORSA-rørs-prøver. Der er udtaget duplikatprøver fra nogle af prøvetagningsstederne.

Tabel 3.2: Prøvetagningssteder for biofilm- og luftprøver. Hver linje i tabellen repræsenterer et sted på en lokalitet, hvor der er taget biofilm- og luftprøver. Felter med (-) er prøver, der ikke er blevet taget. ÷ = negativ, + = positiv for stoffet. ORSA-rørs-måling er en 13 dages måling. **Hvis ikke angivet etage, så er prøven udtaget i stueplan.

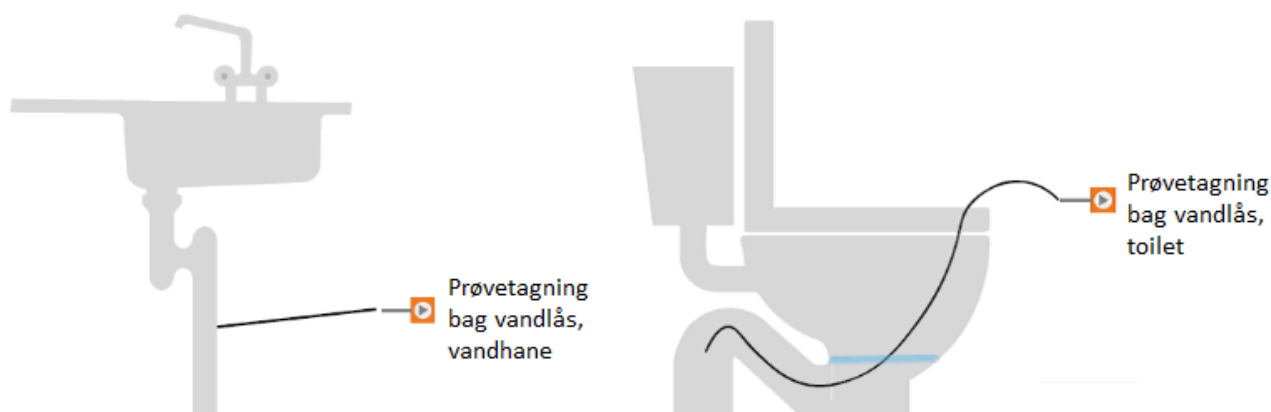
Lokalitet	Forventet indhold	Prøvetagnings-sted**	Kulrør	ORSA-rør	DNA	DNA-duplikat	Dato for prøvetagning
1	÷ vinylklorid	Køkkenvask (KK)	LS101	-	KK101-BIO	-	30-10-2023
		Toilet (WC), 1. sal	LS102	-	WC102-BIO	-	30-10-2023
		Samlebrønd (SB)	LS103	-	SB103-BIO	-	30-10-2023
		Køkkenvask (KK)	LS101	-	KK101-BIO	-	06-12-2023
		Toilet (WC), 1. sal	LS102	-	WC102-BIO	-	06-12-2023
		Samlebrønd (SB)	LS103	-	SB103-BIO	-	06-12-2023
2	+ vinylklorid	Toilet (WC), 1. sal	LS201	-	WC201-BIO-A	WC201-BIO-B	31-10-2023
		Køkkenvask (KK)	LS301	-	KK301-BIO-A	KK301-BIO-B	31-10-2023
		Håndvask (HV), 1. sal	LS302	-	HV302-BIO	-	31-10-2023
		Gulvafløb (GA), 1. sal	LS303	-	GA303-BIO	-	31-10-2023
3	+ vinylklorid	Toilet (WC)	LS101	-	WC101-BIO	-	12-12-2023
		Toilet (WC), 1. sal	LS102	-	WC102-BIO-12-12	-	12-12-2023
		Køkkenvask (KK), 2. sal	LS103	-	KK103-BIO	-	12-12-2023
		Toilet (WC), 2. sal	LS105	-	WC105-BIO-A	WC105-BIO	12-12-2023
		Samlebrønd (SB)	-	LS104-SB-1	SB104-1-BIO	-	12-12-2023
4	+ vinylklorid	Køkkenvask (KK), 1. sal	IL-KK-1sal	-	KK1SAL-BIO	-	12-12-2023
		Toilet (WC), 1. sal	IL-WC-1sal	-	WC1SAL-BIO	-	12-12-2023
		Toilet (WC)	IL-WC-stue	-	WC-stue-BIO	-	12-12-2023
		Samlebrønd (SB)	-	LS421-SB	SB421-BIO	-	12-12-2023
5	+ vinylklorid	Faldstamme (FA)	LS311	-	FA311-BIO	-	05-12-2023
		Toilet (WC)	LS314	-	WC314-BIO	-	05-12-2023
		Køkkenvask (KK), 1. sal	LS316	-	KK316-BIO-A	KK316-BIO-B	05-12-2023
		Samlebrønd (SB)	-	LS178-SB	SB178-BIO	-	05-12-2023
6	÷ vinylklorid, + for PCE og TCE	Toilet (WC)	LS122	-	WC122-BIO	-	21-12-2023
		Toilet (WC), 1. sal	LS123	-	WC123-BIO	-	21-12-2023
		Køkkenvask (KK), 1. sal	LS201	-	KK201-BIO	-	21-12-2023
		Samlebrønd (SB)	-	-	SB202-BIO	-	21-12-2023

4. Metodebeskrivelse for prøvetagning af biofilm- og luftprøver

4.1 Prøvetagning luftprøver (kulrør)

Til at tage luftprøver på bagsiden af vandlås i toiletter, håndvaske og gulvafløb samt samlebrønde og faldstammer, blev kulrør metoden anvendt.

En ny og ren PEH-slange (8x6,8mm) blev ført igennem vandlåsen til bagsiden af vandspejlet. Der blev injiceret luft i slangen for at fjerne eventuelt ophobet vand fra vandlåsen. Kulrør blev forberedt efter analyselaboratoriets forskrifter og efterfølgende monteret på slangen i lodret orientering. En pumpe blev indstillet til at trække 0,1 l/min. luft igennem kulrøret i 100 minutter svarende til 10 l prøvolumen. Kulrørene blev efterfølgende sendt til analyselaboratoriet til analyse for klorerede opløsningsmidler og nedbrydningsprodukter heraf.



På faldstammen på en af lokaliteter var der etableret et t-stykke med en gennemboring, herfra er udtaget en luftprøve.



På lokalitet 1 er der desuden udtaget en kulrørsprøve fra en samlebrønd.

4.2 Prøvetagning luftprøver (ORSA-rør)

På lokalitet 3-5 er ligeledes ophængt et ORSA-rør i en samlebrønd i ca. 14 dage, da der forventelig er en stor luftudskiftning i brønden. Dermed fås en prøve, der repræsenterer et større luftvolumen, end hvis der udtages en aktiv kulrørsprøve på 100 minutter. ORSA-røret er hængt ca. 1 meter ned i brønden. Dækslet er åbent ved ophængning og nedtagning.

4.3 Prøvetagning af biofilm

Der blev til formålet udviklet en metode til prøvetagning af biofilm bag vandlåse uden at skade installationen. Prøverne er taget ad flere omgange og er sendt til analyse ad 2 omgange.

4.3.1 Biofilmprøve udtaget bag vandlås på vask

Afløbet blev adskilt ved vandlåsen, hvorefter en vatpind blev anvendt til at skrabe biofilm fra kloakrørets indre vægge. Vatpinden blev derefter pakket i overensstemmelse med producentens anvisninger, og afløbet blev samlet igen. For at minimere påvirkningen af den biologiske masse blev prøverne sendt ekspres til analyseselskabet.

4.3.2 Biofilmprøve udtaget bag vandlås på toilet og gulvafløb

Vandet i vandlåsen blev fjernet vha. en batteridrevet væsepumpe på batteri eller en vakuum-luftpumpe med en væskefælde monteret før pumpen til opsamling af overskudsvand. En vatpind placeret for enden af et inspektionskamera eller et hårdt plastrør blev ført igennem den tomme vandlås. Vatpinden blev gnedet mod væggen af kloakrøret for at opsamle biofilm. Vatpinden blev efterfølgende emballeret ifølge anvisningerne fra producenten og vandlåsen blev fyldt igen. Prøverne blev sendt med ekspres til analyseselskab for at undgå påvirkning af den biologisk masse.

4.3.3 Biofilmprøve udtaget i faldstamme og samlebrønde

I tilfælde af prøvetagning af faldstamme og samlebrønde var det muligt at åbne op ind til kloakrøret. Her blev en vatpind gnedet mod væggene og overflader for at opsamle biofilm. Vatpinden blev emballeret efterfølgende ifølge anvisningerne fra producenten og afløbet samlet igen. Prøverne blev sendt med ekspres til analyseselskab for at undgå påvirkning af den biologisk masse.

4.4 Sekvensering af biofilmprøver

De indsamlede biofilmprøver blev analyseret og databehandlet af analyseselskabet DNAsense. Dette blev gjort i 4 trin.

- 1) DNA blev ekstraheret fra biofilmprøver ved brug af DNeasy PowerWater Kit
- 2) Det ekstraherede DNA blev forberedt til gen-amplikon-sekvensering målrettet 16S rRNA genet
- 3) De forberedte gensekvenser fra biofilmprøverne blev kørt igennem en flowcelle og efterfølgende sekvenseret vha. software for at læse nukleotidernes rækkefølge
- 4) Gensekvenserne blev efterfølgende behandlet med bioinformatiske redskaber for at trimme sekvenserne på baggrund af længde, kvalitet og sammenligning med referencedatabase. De databehandlede gensekvenser blev brugt til at producere visualiseringer af data, herunder PCA plot, heatmap, samt statistiske analyser.

En mere dybdegående beskrivelse af metoden for sekvenseringsprøverne er beskrevet i DNAsenses rapporter (bilag 1A og 1B).

5. Analyseresultater og diskussion af disse

5.1 Observationer under feltarbejde

Der er udført feltarbejde på 6 forskellige lokaliteter. Der er udarbejdet et feltskema, taget foto og udtaget en videofrekvens fra hvert afløb. Essensen af disse er beskrevet i nedenstående. Feltskemaer kan rekvireres ved NIRAS, såfremt det ønskes.

I forbindelse med registreringen er der noteret materiale på afløb (hvor synligt), hvilken type vandlås (S-vandlås, P-vandlås, pungvandlås), der er tale om, samt tilstanden på afløbet.

5.1.1 Biofilm

Der er taget billeder og video fra de forskellige lokaliteter. Biofilmene, der blev observeret, havde stor variation i tykkelse, farver og udbredelse. Specielt rør, der gik horisontalt, havde større belægninger, hvorimod prøve FA311-BIO, taget fra en vertikal faldstamme, havde mindre belægning (figur 5.1). NIRAS har tidligere observeret ved tilsyn på andre lokaliteter, at belægninger i rørinstallationer efter køkkenvaske ofte er tykkere end i andre afløb. Dette blev også observeret ved udtagning af disse prøver.



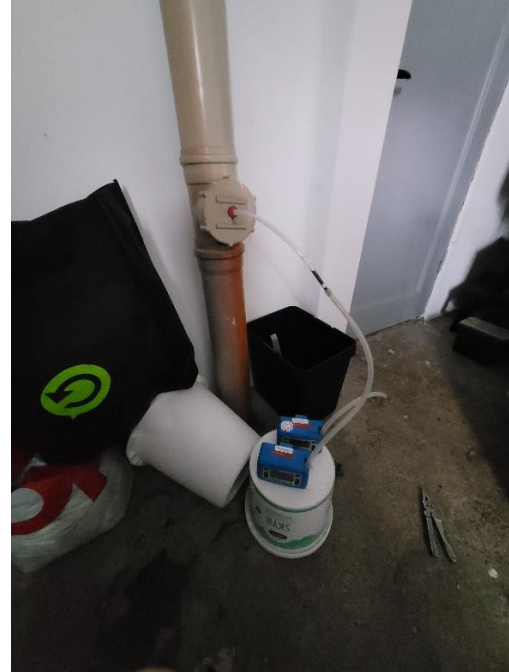
Figur 5.1: Biofilm/belægning af rørsystemer – venstre billede fra køkkenvask, midterste billede fra faldstamme og højre billede fra toilet.

5.1.2 Rørtyper og vandlåstyper

Der konstateres flest PP-rør under håndvaske (figur 5.2). Vandlåsen er en S-vandlås. På lokalitet 5 ses en synlig faldstamme i PVC-rør (figur 5.2). På lokalitet 2 ses ligeledes en synlig faldstamme, der formodes, pga. tykkelsen og alder, at være i PVC-rør, men da den er malet hvid, er det vanskeligt at vurdere om dette er korrekt.



Køkkenafløb i PP-rør



Faldstamme i PVC-rør



Samlebrønd i PVC-rør (gul ring indikerer prøvetagningsstreng)



Samlebrønd i beton

Figur 5.2: Fotos af forskellige rørmaterialer registreret.

Det skal bemærkes, at der i /3/ er beskrevet, at der fra PVC-rør kan ske en afsmittning af vinylklorid, hvilket der efterfølgende er lavet et studie på /4/, hvor det på baggrund af en mindre undersøgelse vurderes, at der kan være risiko for, at der sker afsmittning af vinylklorid til luften i kloakrørene. Dog kun i lave koncentrationsniveauer /4/.

Der er konstateret betonsamlebrønd på lokalitet 4 og en PVC samlebrønd på lokalitet 1 og 6 (figur 5.2).

5.2 Luftprøveresultater

Luftprøverne er analyseret for klorerede opløsningsmidler og nedbrydningsprodukter og sendt til analyse hos ALS Denmark.

Resultaterne fremgår af bilag 1C og indholdene af PCE, TCE og vinylklorid fremgår af nedenstående Tabel 5.1: Udvalgte analyseresultater (PCE, TCE og VC). Markering viser indhold over analysemetodens detektionsgrænse. Øvrige indhold af klorerede opløsningsmidler og nedbrydningsprodukter i prøverne fremgår af tabel i bilag 1C. Vurderingerne, der er beskrevet, baseres på viden fra tidligere undersøgelser udført på lokaliteterne.

Tabel 5.1: Udvalgte analyseresultater (PCE, TCE og VC). Markering viser indhold over analysemetodens detektionsgrænse. Øvrige indhold af klorerede opløsningsmidler og nedbrydningsprodukter i prøverne fremgår af tabel i bilag 1C.

Prøvemrk.	Placering	Etage	Modtaget	Prøvested	Rør	Trichlorethylen (TCE)	Tetrachlorethylen (PCE)	Vinylklorid (VC)
					-	µg/m ³	µg/m ³	µg/m ³
LS101	Køkkenvask	Stueplan	03-11-2023	Lokalitet 1	Kulrør	<2,5	<2,5	<0,40
LS102	Toilet	1. sal	03-11-2023	Lokalitet 1	Kulrør	<2,5	<2,5	<0,40
LS103	Samlebrønd	Terræn	03-11-2023	Lokalitet 1	Kulrør	<2,5	<2,5	<0,40
LS101	Køkkenvask	Stueplan	08-12-2023	Lokalitet 1	Kulrør	<2,5	<2,5	<0,40
LS102	Toilet	1. sal	08-12-2023	Lokalitet 1	Kulrør	<2,5	<2,5	<0,40
LS103	Samlebrønd	Terræn	08-12-2023	Lokalitet 1	Kulrør	<2,5	<2,5	<0,40

LS301	Køkkenvask	Stueplan	01-11-2023	Lokalitet 2	Kulrør	<2,5	<2,5	19
LS302	Håndvask	1. sal	01-11-2023	Lokalitet 2	Kulrør	<2,5	4,1	1,7
LS201	Toilet	1. sal	01-11-2023	Lokalitet 2	Kulrør	<2,5	<2,5	2,4
LS303	Gulvafløb	1. sal	01-11-2023	Lokalitet 2	Kulrør	<2,5	<2,5	0,93

LS104-SB-1	Samlebrønd	Terræn	15-12-2023	Lokalitet 3	ORSA	<0,16	<0,16	<0,040
LS101	Toilet	Stueplan	15-12-2023	Lokalitet 3	Kulrør	<2,5	<2,5	<0,40
LS102	Toilet	1. sal	15-12-2023	Lokalitet 3	Kulrør	<2,5	<2,5	<0,40
LS103	Køkkenvask	2. sal	15-12-2023	Lokalitet 3	Kulrør	<2,5	<2,5	<0,40
LS105	Toilet	2. sal	15-12-2023	Lokalitet 3	Kulrør	<2,5	<2,5	<0,40

IL-WC-stue	Toilet	Stueplan	15-12-2023	Lokalitet 4	Kulrør	8	23	73
IL-WC-1 sal	Toilet	1. sal	15-12-2023	Lokalitet 4	Kulrør	<2,5	6,7	5,3
IL-KK-1 sal	Køkkenvask	1. sal	15-12-2023	Lokalitet 4	Kulrør	<2,5	<2,5	<0,40
LS412-SB	Samlebrønd	Terræn	15-12-2023	Lokalitet 4	ORSA	0,6	2,4	1,1

LS311	Faldstamme	Stueplan	08-12-2023	Lokalitet 5	Kulrør	<2,5	<2,5	2,1
LS314	Toilet	Stueplan	08-12-2023	Lokalitet 5	Kulrør	<2,5	<2,5	1,5
LS316	Køkkenvask	1. sal	08-12-2023	Lokalitet 5	Kulrør	<2,5	<2,5	36
LS178-SB	Samlebrønd	Terræn	23-11-2023	Lokalitet 5	ORSA	1,1	65	<0,040

LS122	Toilet	Stueplan	28-12-2023	Lokalitet 6	Kulrør	<2,5	<2,5	<0,40
LS123	Toilet	1. sal	28-12-2023	Lokalitet 6	Kulrør	<2,5	<2,5	<0,40
LS201	Køkkenvask	1. sal	28-12-2023	Lokalitet 6	Kulrør	<2,5	4,3	<0,40

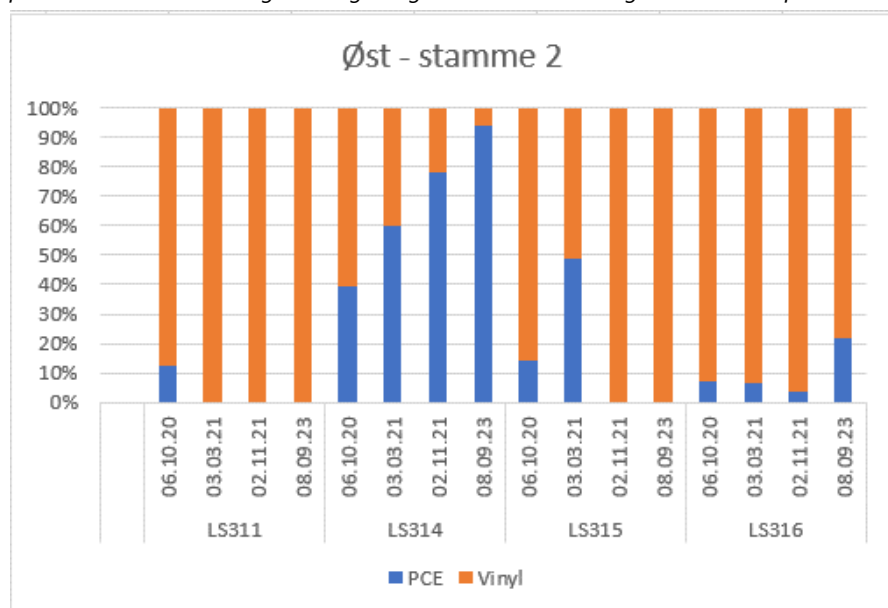
Som forventet konstateres ikke klorerede opløsningsmidler eller nedbrydningsprodukter på referencegrunden, lokalitet 1. På lokalitet 2, 4 og 5 konstateres vinylklorid bag vandlåse, hvorimod der, mod forventning, ikke konstateres vinylklorid bag vandlåsene på lokalitet 3. Her er kun konstateret mindre indhold af tetrachlormethan (se tabel i bilag 1C).

Det kan desuden konstateres, at det ikke er bag alle vandlåse, at der observeres PCE og TCE sammen med vinylklorid, så muligvis bliver PCE og TCE omsat til vinylklorid her.

På lokalitet 5 konstateres PCE og TCE i samlebrønden og ingen vinylklorid, hvorimod der bag vandlåse ingen PCE eller TCE konstateres, kun vinylklorid. Det skal dog bemærkes, at målingen i samlebrønden er udtaget på ORSA-rør, hvor der kan være risiko for underestimering af vinylklorid. Der konstateres cis-1,2-DCA i brønden (se tabel i bilag 1C), så det tyder på, at der er en underestimering af indholdet af vinylklorid.

I relation til lokalitet 5 var det fordelingen mellem PCE og vinylklorid, som vist i figur 5.3, det var ønsket at undersøge nærmere. I prøve LS311 konstateres udelukkende vinylklorid siden 2021, i LS314 konstateres en højere fordeling af PCE fremfor vinylklorid, og i LS316 både PCE og TCE – dog med en overvægt af vinylklorid. Ved denne prøvetagningsrunde er der, som vist i tabel 5.1, ikke genfundet indholdet af PCE i de udtagne prøver fra LS311 og LS316. I afsnit 5.4 beskrives, om der kan ses forskel i biologien fra de forskellige biofilm.

Figur 5.3: Fordeling mellem indhold af PCE og vinylklorid i udvalgte prøver fra lokalitet 5. Ved nærværende undersøgelse er prøverne LS311, LS315 og LS316 gentaget. Prøverne er udtaget som kulrørprøver.



På lokalitet 6 konstateres udelukkende PCE og som forventet ingen vinylklorid. Selvom der tidligere er konstateret PCE og TCE bag vandlåse på toiletter på denne lokalitet, konstateres ikke indhold af PCE og TCE over detektionsgrænsen ved denne målerunde.

Fra tidligere sager er det kendt viden, at der ses store variationer af indhold af de chlorerede opløsningsmidler og nedbrydningsprodukter over tid og på de udvalgte lokaliteter er der tidligere konstateret indhold i alle de udvalgte målepunkter.

5.3 Udvikling af prøvetagning for biofilm

Effektiviteten af prøvetagningen af biofilm bag vandlåse blev evalueret ved at udtage duplikatprøver fra flere lokaliteter og prøvetagningssteder. Resultaterne, repræsenteret i PCA plot (figur 5.4 og 5.5), viser, at alle duplikatprøver ligger tæt på hinanden, hvilket indikerer en høj grad af ensartethed i de mikrobielle samfund på samme prøvetagningssted. Hvis punkterne havde været spredt, ville det have indikeret varierende resultater fra samme sted, hvilket ville have rejst spørgsmål om metoden. Disse fund bestyrker tesen om, at den anvendte prøveudtagningsmetode effektivt kan udtage repræsentative biofilmprøver bag vandlåse uden behov for destruktive indgreb.

5.4 Det mikrobiologiske samfund

5.4.1 Den mikrobiologiske forskellighed i prøvetagningssteder

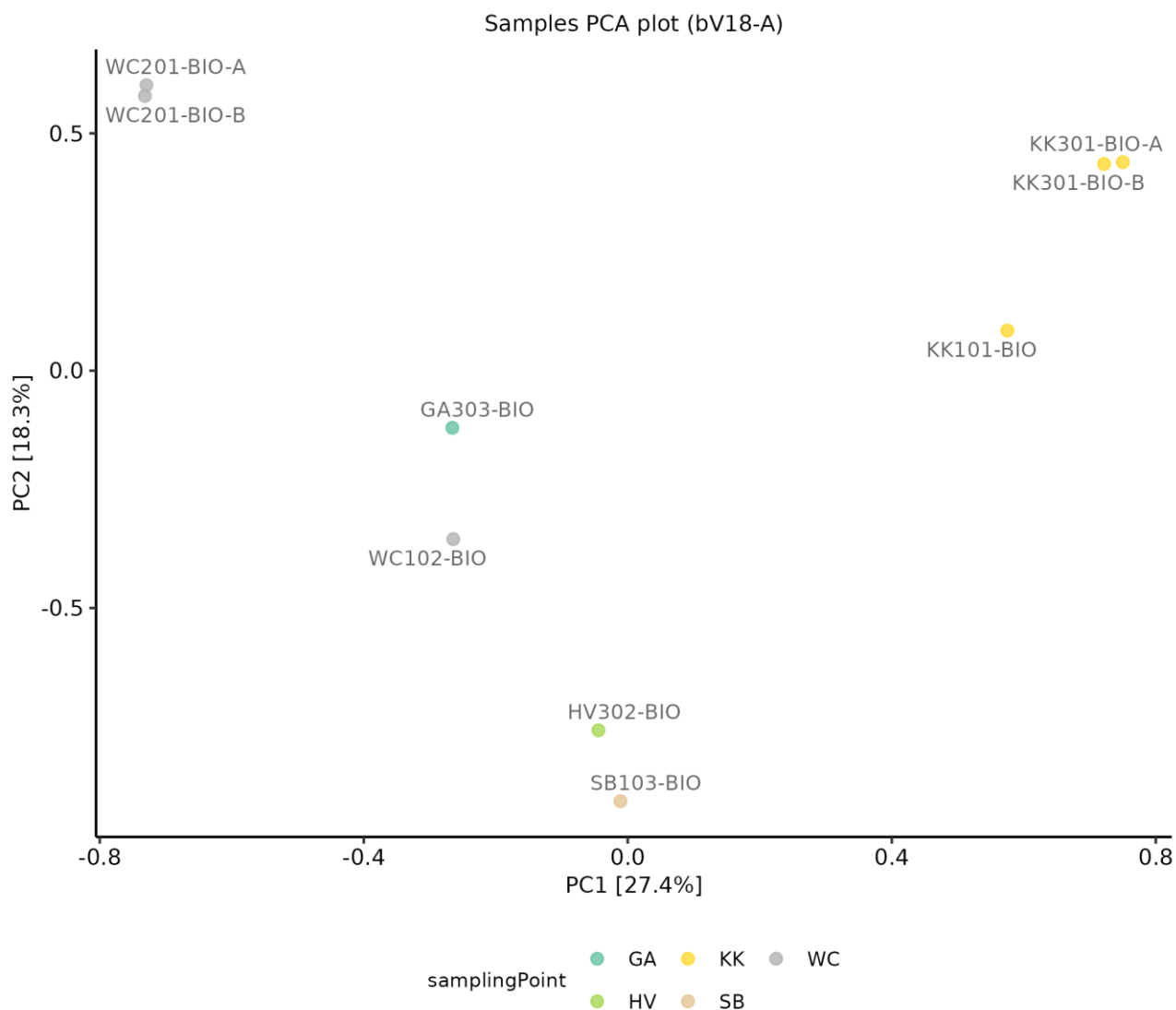
Under fase 1 af prøvetagning blev der udtaget prøver fra lokalitet 1 og 2. Dataene viser ingen tydelige grupperinger af mikrobielle samfund, da prøverne er spredt i hele PCA-plottet (figur 5.4). For en beskrivelse af PCA-plottets funktion henvises til afsnit 5.4.1.1. Prøver fra forskellige prøvetagningssteder på samme lokalitet viser heller ikke en tæt beslægtethed. Det tyder på, at bakteriernes tilstedeværelse og koncentration afhænger mere af forholdene i vandlåse og samlebrønde end af mikrobiologien, tilstede på lokaliteten. Dette kan ses i de mikrobielle samfund i køkkenvaskene, som er tættere beslægtet med hinanden end med de øvrige biofilmprøver, selvom de er taget fra forskellige lokaliteter. Duplikatprøverne WC201-BIO-A og B samt KK301-BIO-A og B viser stor lighed (figur 5.4).

Under fase 2 blev der taget prøver fra lokalitet 1, 3, 4, 5 og 6. Dataene viser klarere grupperinger, især blandt køkkenvask- (KK) og samlebrøndsprøverne (SB), som ligger samlet i plottet (figur 5.5). Toiletprøverne (WC) havde, ligesom i fase 1, en markant anderledes mikrobiologisk sammensætning end køkkenvaskprøverne. Samtidigt er toiletprøverne indbyrdes spredt fra hinanden. Samlebrøndsprøver, Faldstammepróven (FA) og en gruppe af toiletprøverne ligger markant tættere i fase 2 end i fase 1. Dette kan skyldes en stor variation på sekvenseringsdata, og derfor har antallet af prøver haft en stor betydning for at kunne se sammenhænge mellem de mikrobielle samfund fra prøvetagningssteder. Det observeres, at den mikrobielle sammensætning i faldstammen og samlebrønden i stor grad er påvirket af mikrobiologien i toilettet, formentligt fordi disse prøvetagningssteder er sammenkoblet igennem afløbssystemet.

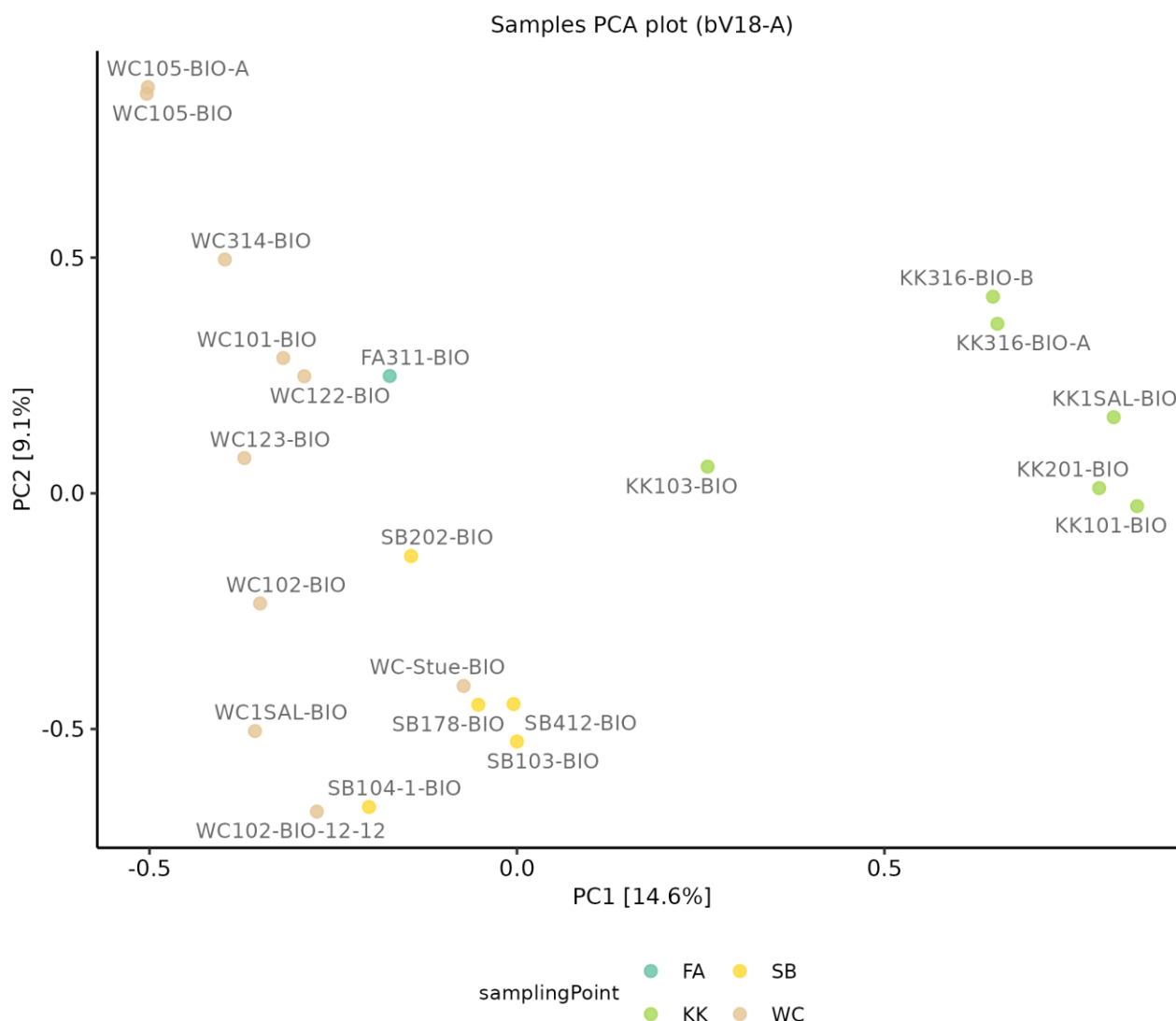
Den negative reference for både samlebrønd, køkkenvask og toilet indikerer, at tilstedeværelsen af vinylklorid, PCE og TCE ikke væsentligt påvirker den mikrobielle sammensætning. Dette ses, da prøverne i PCA-plottet for den negative reference ligger tæt sammen med de andre prøvelokationer. Det betyder ikke, at bakterier med evnen til at omsætte PCE og TCE ikke er til stede, men de er ikke en dominerende faktor for, hvordan den mikrobiologiske sammensætning er skruet sammen. Duplikatprøverne WC105-BIO og BIO-A samt KK316-BIO-A og B viste stor lighed (figur 5.5).

5.4.1.1 Hvad er et PCA-plot og hvad kan det bruges til?

Et PCA-plot (Principal Component Analysis) er en statistisk metode, der bruges til at reducere kompleksiteten af data ved at transformere dem til et mindre antal variabler kaldet principal components (PC). Dette gør det muligt at visualisere og fortolke data med høj dimensionalitet på en mere overskuelig måde. I konteksten af mikrobiologiske sekvenseringsprøver viser PCA-plot, hvordan forskellige biofilmprøver relaterer til hinanden baseret på deres genetiske profiler. Plottet hjælper med at identificere mønstre og grupperinger, der indikerer genetisk ensartethed eller forskellighed mellem disse prøver. Akserne på plottet viser de PC, der forklarer den største varians i dataene, med x-aksen som repræsenterer den mest betydningsfulde varians og y-aksen repræsenterer den næst mest betydningsfulde varians.



Figur 5.4: Principal component analysis (PCA). Prøvetagning af fase 1. Identifikation af prøver med lignende mikrobielle samfund ved hjælp af multivariat statistik. Hvert punkt repræsenterer det mikrobielle samfund i en specifik biofilmprøve. Afstanden mellem punkterne angiver ligheden; jo tættere prøverne er, jo mere ensartet er deres mikrobielle sammensætning. Hellingerttransformation blev brugt til PCA (tekst taget fra DNA-sense rapport). Gulv afløb (GA), køkkenvask (KK), toilet (WC), håndvask (HV) og samlebrønd (SB).



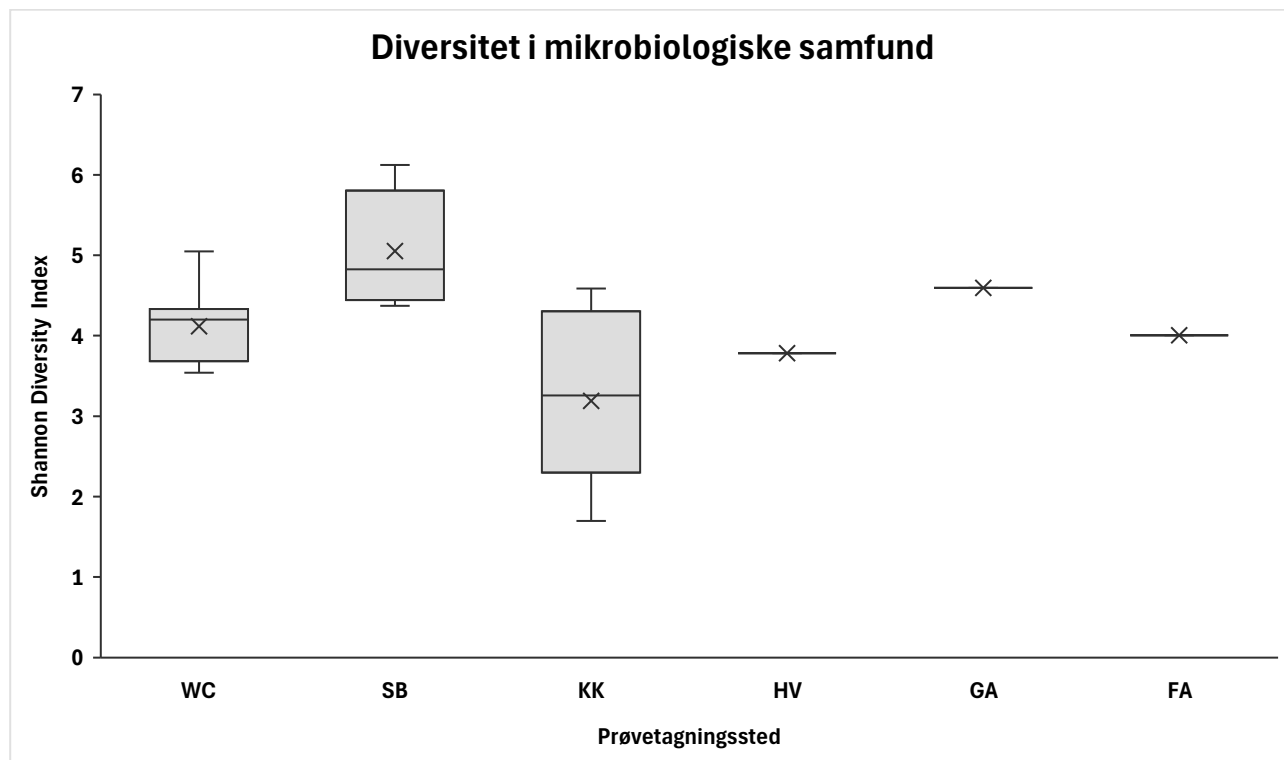
Figur 5.5: Principal component analysis (PCA). Prøvetagning af fase 2. Identifikation af prøver med lignende mikrobielle samfund ved hjælp af multivariat statistik. Hvert punkt repræsenterer det mikrobielle samfund i en specifik biofilmprøve. Afstanden mellem punkterne angiver ligheden; jo tættere prøverne er, jo mere ensartet er deres mikrobielle sammensætning. Hellingstransformation blev brugt til PCA (tekst taget fra DNA-sense rapport). Faldstamme (FA), samlebrønd (SB), køkkenvask (KK) og toilet (WC).

5.4.2 Den mikrobielle diversitet i prøvetagningsstederne

Den højeste diversitet af mikroorganismer blev målt i samlebrøndsprøverne (SB-prøverne) med et gennemsnit på 5,05 (figur 5.6), hvor der også blev registreret flest forskellige slægter i form af Operational Taxonomic Units (OTU) (bilag 1A og 1B). Køkkenvaskprøverne (KK-prøverne) viste den laveste diversitet med et gennemsnit på 3,19, mens toiletprøverne (WC-prøverne) lå midt imellem med et gennemsnit på 4,12. For de øvrige prøvetagningssteder blev der kun udtaget én prøve, hvilket gør det vanskeligere at vurdere diversiteten, men de ligger inden for det forventede spænd. Til sammenligning er diversiteten på et rensningsanlæg fundet til at være mellem 5,17 og 5,37 /5/, og i havbunden mellem 3 og 5 /6/. Resultaterne viser en relativt høj diversitet i disse prøver, særligt i SB-prøverne, hvorfor der også er størst sandsynlighed for at finde bakterierne, der kan nedbryde PCE og TCE her. De højeste koncentrationer af vinylklorid blev dog ikke fundet her (tabel 5.1), hvilket indikerer en modstridende tendens.

5.4.2.1 Hvad er et Shannon Diversitet Index og hvad kan det bruges til?

Shannon Diversitets Index kvantificerer diversiteten i en prøve ved at måle både antallet af slægter og deres relative forekomster. Indekset bruges i mikrobiologien til at afsløre variation og kompleksitet i mikrobielle samfund. En høj Shannon-værdi indikerer stor genetisk diversitet, hvilket kan hjælpe med at vurdere stabiliteten og funktionaliteten af det undersøgte system. Dette indeks kan sammenligne diversiteten mellem prøvetagningssteder eller over tid for at måle påvirkning af miljømæssige ændringer.



Figur 5.6: Shannon Diversity Index. Boksplottet illustrerer den mikrobiologiske diversitet i biofilmprøverne. X-aksen repræsenterer prøvetagningsstederne, mens y-aksen viser Shannon diversiteten. En højere værdi på y-aksen indikerer større genetisk diversitet i prøverne. Figuren indeholder fejlbarer, medianen (streg over boks) og gennemsnittet (X) for prøvetagningsstederne. Kun én prøve er taget af HV, GA og FA, derfor er der ingen fejlbarer markeret.

5.4.3 Tilstedeværelsen af *Dehalococcoides*

Der blev ikke fundet definitive resultater, der viser, at slægten *Dehalococcoides* var til stede i nogen af de indsamlede prøver. *Dehalococcoides* hører under rækken Chloroflexota som hører under klassen Dehalococcoidia. Denne klasse blev fundet i lav koncentration på lokalitet 2, men kunne ikke identificeres på slægtsniveau ved sammenligning med databasen. Dette kan skyldes fundet af en slægt, der ikke er tidligere beskrevet, eller skadede sekvenser under DNA-ekstraktionen. Da der kun er få slægter inden for denne klasse, og klassen er kendt for at kunne dehalogenere klorerede molekyler, kan der på denne lokalitet være bakterier til stede, der teoretisk kan omsætte PCE og TCE til vinylklorid. Derudover blev flere sekvenser fra Chloroflexota fundet i mange forskellige prøver. Disse kunne igen ikke klassificeres ned til en specifik slægt grundet samme omstændigheder som beskrevet ovenfor. Bakterierne fra denne række har mange metaboliske muligheder, og kan i de fleste tilfælde ikke dehalogenere klorerede molekyler. De findes dog i væsentligt højere koncentrationer, og er til stede på lokalitet 1, 2, 3 og 5. Det er derfor en mulighed at nogle af disse har egenskaben. En lav koncentration af uidentificerbare Chloroflexota blev fundet på lokalitet 1.

Vinylklorid blev fundet på alle prøvetagningssteder ved lokalitet 2 (tabel 5.1), men kilden er stadig ukendt. Det er muligt, at vinylkloriden stammer fra de fundne bakterier, men dette kræver mere undersøgelse. Specifikt mangler der viden om, hvorvidt bakterierne i biofilmen omsætter PCE og TCE, og derudover om ikke beskrevne arter kunne have denne egenskab. Dette skal undersøges nærmere i et projekt, i samarbejde mellem NIRAS og Aalborg Universitet, der starter i 2025 /4/.

6. Konklusion

Det lykkedes at udvikle en prøveudtagningsmetode til biofilm på bagsiden af vandlåse uden at fortage destruktive indgreb på rørsystemet. Duplikater af biofilm gav i alle tilfælde meget ens resultater, hvilket indikerede, at prøvetagning kunne replikeres.

Gennem sekvenseringsanalyserne af de indsamlede prøver blev slægten *Dehalococcoides* ikke direkte fundet. Til gengæld blev klassen *Dehalococcoidia* fundet på lokalitet 2 samt *Chloroflexota* på lokaliteterne 1, 2, 3 og 5. Selvom disse fund ikke kunne bestemmes til slægtsniveau, gør det os nysgerrige på, om bakterierne tilstede i biofilm kan bidrage til, at der måles vinylkloridkoncentrationer over detektionsgrænsen på flere lokaliteter.

Den højeste mikrobiologiske diversitet blev målt i SB-prøverne, mens KK-prøverne viste den laveste diversitet. Derved er den største artsrigdom og relative forekomst fundet i samlebrønde.

Det mikrobiologiske samfund, fra ens prøvetagningssteder spredte på forskellige lokaliteter, var i større grad beslægtet med hinanden, herunder specielt samlebrønde og køkkenvaske. Prøvetagningsstederne på samme lokalitet viste i mindre grad sammenhæng mellem de mikrobiologiske samfund.

Referencegrundens (lokalitet 1) biofilmprøver viste ingen forskelle i mikrobiologisk sammensætning fra de andre lokaliteter.

På baggrund af denne undersøgelse er der indsendt en ansøgning til Den Syddanske Uddannelsespulje for at undersøge nærmere i hvilket omfang biofilmen bidrager til produktion af vinylklorid i kloaker. Ansøgningen er indsendt i samarbejde med Aalborg Universitet, som vil udføre forsøg i laboratorie. Projektet har fået bevilget penge /4/.

Det videre projekt vil således se nærmere på de faktorer og forhold, der påvirker omsætnings- og fjernelsesraterne for vinylklorid med fokus på biologiske forhold. Projektet forventer at bidrage med nye indsigter i dannelsen af vinylklorid i kloaker/faldstammer, identificere kritiske faktorer for omdannelsesraten samt udvikle forsøgsopstillinger, hvor biologisk omsætning af klorerede forbindelser og vinylproduktion kan måles.

Formålet med projektet er desuden at undersøge, om dannelsen af vinylklorid i kloaksystemer sker igennem mikrobiologisk aktivitet, herunder tilstedeværelse af slægten *Dehalococcoides* eller andre mikroorganismer, der har potentiale for at nedbryde PCE, TCE og/eller andre organohalider til vinylklorid. Herunder kortlægges det mikrobiologiske samfund nærmere fra lokalitet 1-6, end det har været gjort i nærværende projekt. De involverede mikroorganismer og potentielle indikatororganismer vil gennem denne kortlægning blive identificeret.

7. Referencer

- /1/ Obduktionsprojektet, Ørstedsgade 26, 5900 Rudkøbing. Region Syddanmark. November 2017. Udarbejdet af Cowi.

- /2/ Projektbeskrivelse. I hvilket omfang biofilm bidrager til produktion af vinylklorid i kloakker? Udarbejdet af NIRAS og Aalborg Universitet. November 2024.
- /3/ Litteraturstudie om forekomst af vinylklorid i kloakker. Udarbejdet af NIRAS for Region Syddanmark. November 2021.
- /4/ Vinylklorid i kloakker – udviklingsprojekt – Notat – Kan kloakrør afgive vinylklorid? Udarbejdet af NIRAS for Region Syddanmark og Region Midtjylland. November 2022.
- /5/ Zhi-Bin Wang, Ming-Sheng Miao, Qiang Kong, Shou-Qing Ni. Evaluation of microbial diversity of activated sludge in a municipal wastewater treatment plant of northern China by high-throughput sequencing technology. *Desalination and Water Treatment*. Volume 57, Issue 50; 2016. Pages 23516-23521. ISSN 1944-3986; <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1137232>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1944398624033496>).
- /6/ Jochum LM, Chen X, Lever MA, Loy A, Jørgensen BB, Schramm A, Kjeldsen KU. Depth Distribution and Assembly of Sulfate-Reducing Microbial Communities in Marine Sediments of Aarhus Bay. *Appl Environ Microbiol*. 2017 Nov 16;83(23):e01547-17. doi: 10.1128/AEM.01547-17. PMID: 28939599; PMCID: PMC5691419.

Bilag 1

Samlet bilag

Bilag 1.A

Fase 1 DNASense Rapport

Microbial community analysis

CP1237

NIRAS

DNASense ApS

17-11-2023, Aalborg, Denmark

Contents

1	Project scope	2
1.1	DNASense microbial community analysis	2
2	Results	4
2.1	Data availability	4
2.2	DNA extraction, library preparation and sequencing	4
2.3	Microbial community composition	6
3	Materials and methods	8
3.1	Sample DNA extraction	8
3.2	Bacteria 16S rRNA gene variable regions 1-8 (bV18-A) sequencing	8
	References	10

1 Project scope

This project concerns the analysis of microbial communities in WWTP sludge. DNASense received a total of 9 samples from Thomas Leonhardt Husted at NIRAS and these were analysed using gene amplicon sequencing targeting the bacteria 16S rRNA gene variable regions 1-8 (bV18-A) in combination with taxonomic classification against the SILVA 138.1 99 % NR database.

1.1 DNASense microbial community analysis

The general microbial community analysis workflow from raw sample to the final report is outlined in figure 1. First, incoming samples are registered in the laboratory and DNA is extracted from all organisms in the sample. Afterwards, the extracted microbial community DNA is processed and sequencing libraries prepared for DNA sequencing on state-of-the-art equipment in DNASense's laboratory. DNA from each microbe in the community contains specific taxonomic marker genes (also called fingerprint genes) that can be used for organism identification and abundance estimation. Examples of marker genes are the *16S ribosomal RNA (16S rRNA)* gene for bacteria and archaea, and the *internal transcribed spacer (ITS)* for fungi. DNA sequencing is used to count the number of marker gene copies from each microbe in a sample, and that count is in turn used as an estimate of the relative abundance of the microbe in the sample community. Around 10000 marker gene copies are DNA sequenced from each sample to provide a high resolution of the community structure. The taxonomic marker genes can be matched with a reference database for identification of the microbes in the community.

Sample preparation and DNA sequencing for the taxonomic marker genes were conducted in agreement with the latest research standards. The organism abundances - presented in the analysis - represent the count of each taxonomic marker gene in the sample. Hence these abundances are influenced by DNA extraction, gene copy number and primer biases and does not necessarily represent the absolute *in situ* organism abundances.

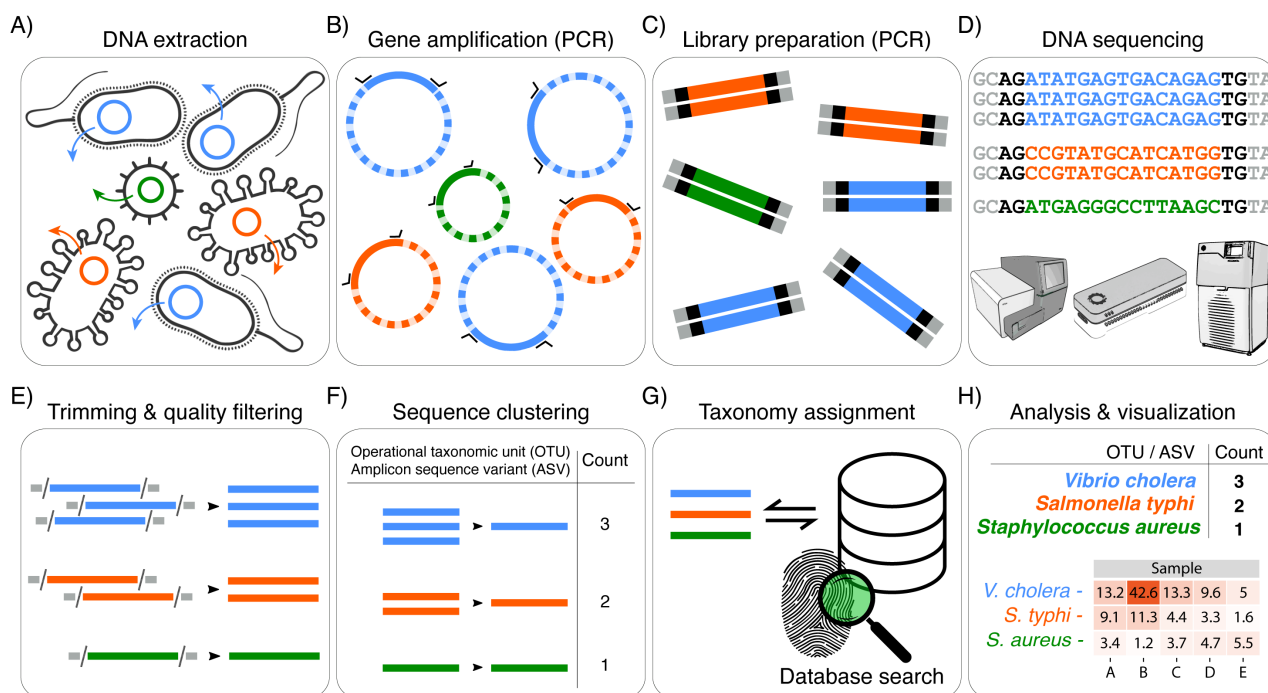


Figure 1: Overview of the general workflow from sample to microbial community profile. **A)** Total community DNA is extracted and **B)** DNA amplicons are prepared using PCR with specific primers (black) targeting e.g. the 16S rRNA gene variable regions for bacterial taxonomic marker genes. **C)** A second processing step adds sequencing adapters. **D)** Resulting amplicon libraries are DNA sequenced and then basecalled. **E)** Basecalled sequences are adapter trimmed and quality filtered. **F)** DNA reads are partitioned into clusters (either OTUs or ASVs) providing the read abundance of each cluster. **G)** Read sequence taxonomy is assigned by searching against a reference database. **H)** OTU/ASV tables correlating taxonomy and abundance are generated for further results analysis.

2 Results

2.1 Data availability

The project data is available from the dropbox folder [/CP1237](#) with the password **worthy74sugar**. The file **shiny/rawData.zip** contains the raw unprocessed sequencing data, and the folder **/figures** includes project figures in print friendly format for general use.

The file **shiny/OTUtable.txt** contains the different OTUs that were identified in all samples, their abundances and taxonomic assignment. Each OTU has a unique identifier and the DNA sequence for the specific OTU mapped to can be found in the file **shiny/OTUs.fa**. Data can also be explored, filtered and visualized in heatmaps and ordination plots, such as PCA, in the DNASense app using the link <https://dnasense.shinyapps.io/dnasense/> with the username CP1237 and the same password as above. Furthermore, summary data tables are provided in the file **summary_tables.xlsx** including a sequencing overview table, output of OTU count tables including their corresponding DNA sequence, and OTU count tables rarefied to 14501 reads; the latter for direct comparison between samples or sample groups.

2.2 DNA extraction, library preparation and sequencing

DNA extraction and sequencing library preparation was successful for 9 / 9 sample analyses (100 %), and yielded between 14501 and 90142 DNA reads after QC and bioinformatic processing (table 1). Failed samples were those yielding significantly less mapped DNA reads (mappedReads) than 10000; here mappedReads < 8000. Low-read samples were disregarded in all subsequent analyses. For this project no samples failed and all were therefore included in analyses. Table 1 provides an overview of the sequencing outcome, and much more extensive data details are given in the sequencing overview table in summary_tables.xlsx.

Table 1: Sequencing statistics. *seqID* is the name of the sequencing data file ID, *sampleName* is the customer-provided sample label, *rawReads* is the total number of DNA reads from sequencing, *filtReads* is the number of DNA reads after filtering for quality and length range, *mappedReads* is the final number of DNA reads mapped to reference database after filtering for mapping quality, *mappedRatio* is the ratio of mappedReads to filtReads. *OTUs* is the total number of OTUs observed in the sample, and *Shannon* is a commonly used alpha-diversity index for comparing sample diversities and essentially quantifies the number of typical OTUs observed in a given sample.

seqID	sampleName	rawReads	filtReads	mappedReads	mappedRatio	OTUs	Shannon
barcode40	WC201-BIO-A	19670	15991	14501	0.91	333	3.76
barcode41	WC201-BIO-B	149120	100000	85878	0.86	443	4.05
barcode42	WC102-BIO	212601	100000	83555	0.84	367	3.68
barcode43	KK101-BIO	79406	67078	59239	0.88	283	2.30
barcode44	KK301-BIO-A	199875	100000	90142	0.90	445	4.02
barcode45	KK301-BIO-B	118258	98660	81576	0.83	552	4.59
barcode46	GA303-BIO	30875	26135	23312	0.89	487	4.59
barcode47	HV302-BIO	70013	58977	53385	0.91	336	3.78
barcode48	SB103-BIO	211510	100000	66171	0.66	792	4.89

Sample sequencing rarefaction curves for evaluation of the obtained sequencing depth relative to sample complexity, here represented as unique OTUs (figure 2). Shown below are curves for all samples.

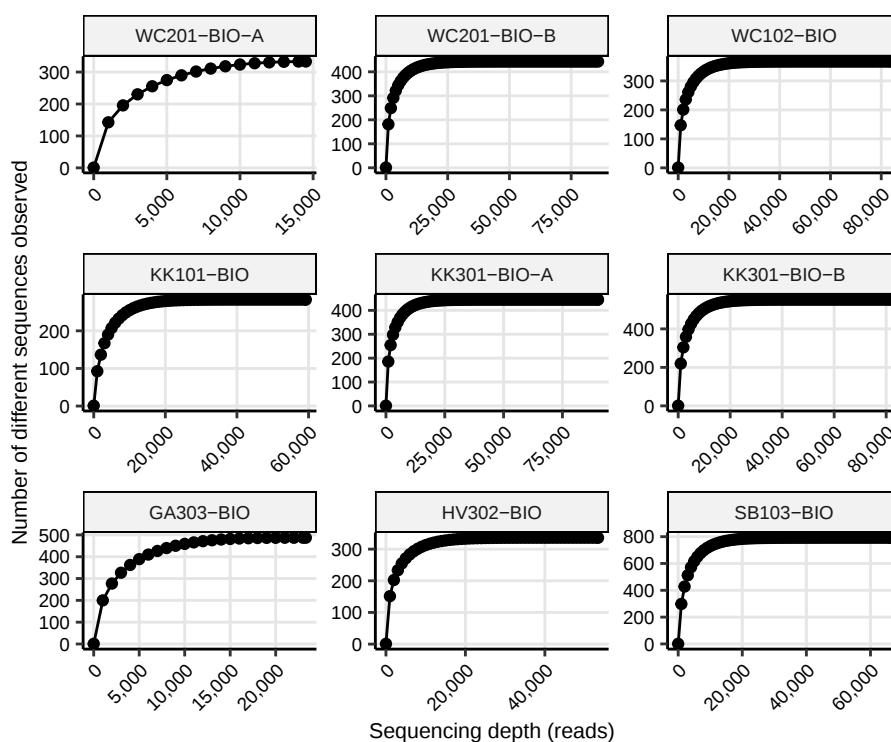


Figure 2: Rarefaction curves for sequencing of samples. The x-axis represents the number of sequences sampled whereas the y-axis depicts the number of observed OTUs.

2.3 Microbial community composition

Figure 3 gives an overview of the 25 most abundant genera across all samples or sample groups and arranged by samplingPoint.



Figure 3: Heatmap of the 25 most abundant genera. The most abundant genera in all samples arranged by sampling-Point. Where available the OTU's phylum classification is provided along with genus, and if no genus level classification could be obtained, the OTU identification of the sequence mapped to in the database, is given. Values are shown as normalised fraction of total sequences (%).

Figure 4 shows comparison of overall microbial compositions using multivariate statistics (PCA) for all samples.

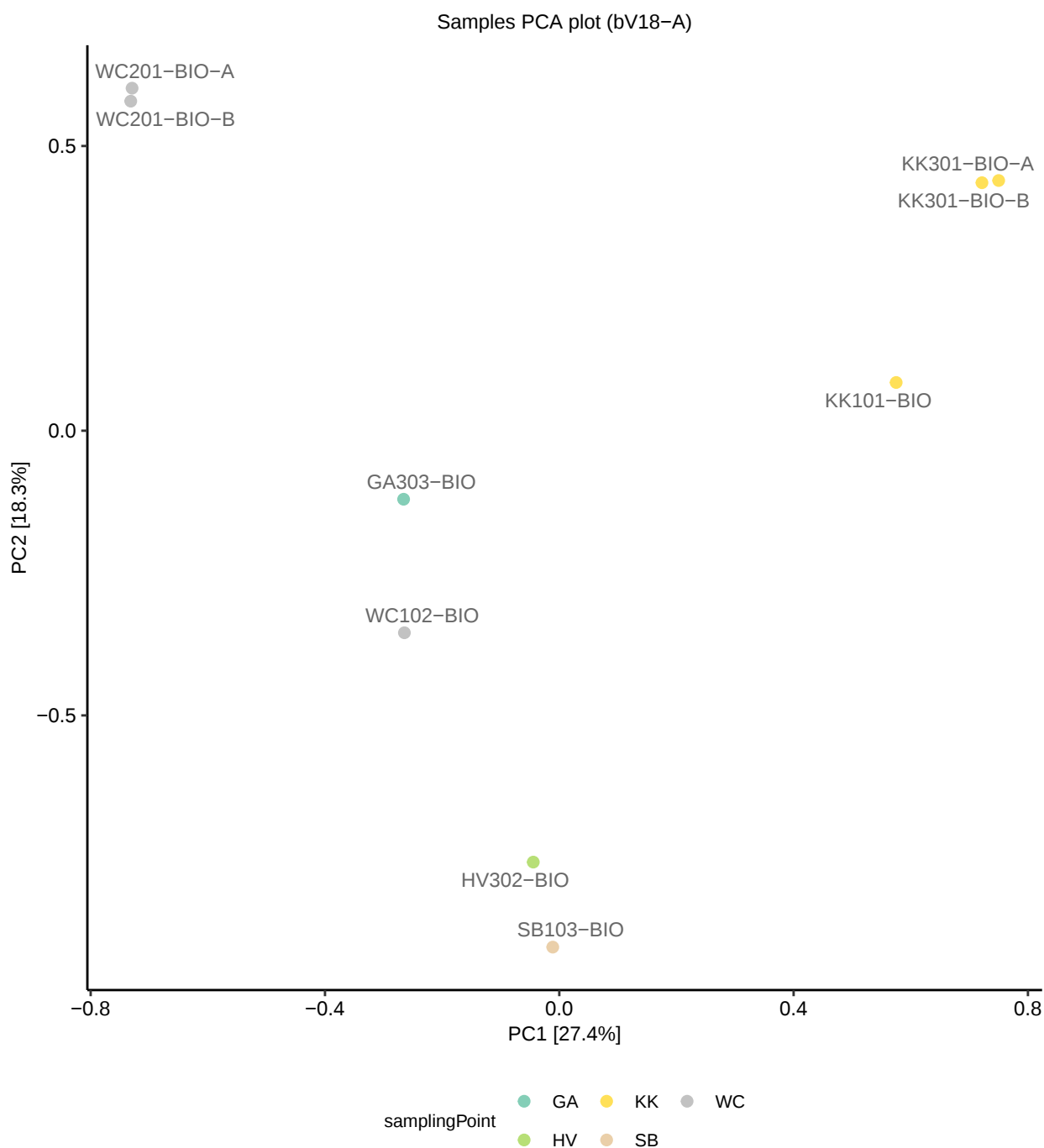


Figure 4: Principal component analysis (PCA). Identification of samples with similar microbial communities using multivariate statistics. Each point represents the microbial community in a specific sample. Distance between the sample dots signifies similarity; the closer the samples are, the more similar microbial composition they have. Hellinger transformation was used for PCA.

3 Materials and methods

The project data analysis and reporting was done using DNASense's custom bioinformatic workflow (version *MCA_ONT_DS230723*).

3.1 Sample DNA extraction

3.1.1 DNeasy PowerWater Kit

Extraction of DNA from the swaps was performed using a slightly modified version of the standard protocol for DNeasy PowerWater Kit (Qiagen, Germany). Gel electrophoresis using Tapestation 2200 and Genomic DNA screentapes (Agilent, USA) was used to validate product size and purity of a subset of DNA extracts. DNA concentration was measured using Qubit dsDNA HS/BR Assay kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.2 Bacteria 16S rRNA gene variable regions 1-8 (bV18-A) sequencing

3.2.1 Sequencing library preparation

Amplicon libraries for the bacteria 16S rRNA gene variable regions 1-8 (bV18-A) were prepared using a custom protocol. Up to 25 ng of extracted DNA was used as template for PCR amplification, and each PCR reaction (50 μ L) contained 0.2 mM dNTP mix, 0.01 units of Platinum SuperFi DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), and 500 nM of each forward and reverse primer in the supplied SuperFi Buffer. PCR was done with the following program: Initial denaturation at 98 °C for 3 min, 25 cycles of amplification (98 °C for 30 s, 62 °C for 20 s, 72 °C for 2 min) and a final elongation at 72 °C for 5 min. The forward and reverse primers used include custom 24 nt barcode sequences followed by the sequences targeting bV18-A: [8F] AGRGTTYGATYMTGGCTCAG and [1391R] GACGGGCGGTGWGTRCA [1–4].

The resulting amplicon libraries were purified using the standard protocol for CleanNGS SPRI beads (CleanNA, NL) with a bead to sample ratio of 3:5. DNA was eluted in 25 μ L of nuclease free water (Qiagen, Germany). Sequencing libraries were prepared from the purified amplicon libraries using the SQK-LSK114 kit (Oxford Nanopore Technologies, UK) according to manufacturer protocol with the following modifications: 500 ng total DNA was used as input, and CleanNGS SPRI beads for library clean-up steps. DNA concentration was measured using Qubit dsDNA HS Assay kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Gel electrophoresis using Tapestation 2200 and D1000/High sensitivity D1000 screentapes (Agilent, USA) was used to validate product size and purity of a subset of amplicon libraries.

3.2.2 DNA sequencing

The resulting sequencing library was loaded onto a MinION R10.4.1 flowcell and sequenced using the MinKNOW 23.04.6 software (Oxford Nanopore Technologies, UK). Reads were basecalled and demultiplexed with MinkNOW guppy g6.5.7 using the super accurate basecalling algorithm (config r10.4.1_400bps_sup.cfg) and custom barcodes.

3.2.3 Bioinformatic processing

The sequencing reads in the demultiplexed and basecalled fastq files were filtered for length (320 - 2000 bp) and quality (phred score > 15) using a local implementation of [filtlong](#) v0.2.1 with the settings **–min_length 320 –max_length 2000 –min_mean_q 97**. The SILVA 16S/18S rRNA 138 SSURef NR99 full-length database in

RESCRIPt format was downloaded from the [QIIME](#) on 29 september 2022 [5–7]. Potential generic place holders and dead-end taxonomic entries were cleared from the taxonomy flat file, i.e. entries containing *uncultured*, *metagenome* or *unassigned*, were replaced with a blank entry. The filtered reads were mapped to the SILVA 138.1 99 % NR database with minimap2 v2.24-r1122 using the **-ax map-ont** command [8] and downstream processing using samtools v1.14 [9]. Mapping results were filtered such that query sequence length relative to alignment length deviated < 5 %. **Noteworthy**, low-abundant OTUs making up < 0.01 % of the total mapped reads within each sample were disregarded as a data denoising step. Further bioinformatic processing was done via RStudio IDE (2023.3.0.386) running R version 4.3.1 (2023-06-16) and using the R packages: ampvis2 (2.8) [10], tidyverse (2.0.0), seqinr (4.2.30), ShortRead (1.58.0) and iNEXT (3.0.0) [11,12].

References

- 1 Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ & Noller HF (1978) [Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from escherichia coli](#). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 4801–4805.
- 2 Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Bandela AM, Cardenas E, Garrity GM & Tiedje JM (2007) [The ribosomal database project \(RDP-II\): Introducing myRDP space and quality controlled public data](#). *Nucleic Acids Research* **35**, D169.
- 3 Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M & Glöckner FO (2013) [Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies](#). *Nucleic Acids Research* **41**, 1–11.
- 4 Karst SM, Ziels RM, Kirkegaard RH, Sørensen EA, McDonald D, Zhu Q, Knight R & Albertsen M (2021) [High-accuracy long-read amplicon sequences using unique molecular identifiers with nanopore or PacBio sequencing](#). *Nature Methods* 2021 18:2 **18**, 165–169.
- 5 Robeson MS, O'Rourke DR, Kaehler BD, Ziemski M, Dillon MR, Foster JT & Bokulich NA (2020) [RE-SCRIPT: Reproducible sequence taxonomy reference database management for the masses](#). *bioRxiv*, 2020.10.05.326504.
- 6 Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J & Glöckner FO (2013) [The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools](#). *Nucleic Acids Research* **41**, 590–596.
- 7 Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, Schweer T, Peplies J, Ludwig W & Glöckner FO (2014) [The SILVA and “all-species living tree project \(LTP\)” taxonomic frameworks](#). *Nucleic Acids Research* **42**, D643–D648.
- 8 Li H (2018) [Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences](#). *Bioinformatics* **34**, 3094–3100.
- 9 Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, Whitwham A, Keane T, McCarthy SA, Davies RM & Li H (2021) [Twelve years of SAMtools and BCFtools](#). *GigaScience* **10**, 1–4.
- 10 Albertsen M, Karst SM, Ziegler AS, Kirkegaard RH & Nielsen PH (2015) [Back to basics – the influence of DNA extraction and primer choice on phylogenetic analysis of activated sludge communities](#). *PLOS ONE* **10**, e0132783.
- 11 Hsieh TC, Ma KH & Chao A (2016) [iNEXT: An R package for rarefaction and extrapolation of species diversity \(hill numbers\)](#). *Methods in Ecology and Evolution* **7**, 1451–1456.
- 12 Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sander EL, Ma KH, Colwell RK & Ellison AM (2014) [Rarefaction and extrapolation with hill numbers: A framework for sampling and estimation in species diversity studies](#). *Ecological Monographs* **84**, 45–67.

Bilag 1.B

Fase 2 DNASense Rapport

Microbial marker gene analysis

CP1317

NIRAS

DNASense ApS

23-01-2024, Aalborg, Denmark

Contents

1	Project scope	2
1.1	DNASense microbial marker gene analysis	2
2	Results	4
2.1	Data availability	4
2.2	DNA extraction, library preparation and sequencing	4
2.3	Microbial community composition	7
3	Materials and methods	9
3.1	Sample DNA extraction	9
3.2	Bacteria 16S rRNA gene variable regions 1-8 (bV18-A) sequencing	9
	References	11

1 Project scope

This project concerns the analysis of microbial communities (microbiomes) in WWTP sludge. DNASense received a total of 22 samples from Thomas Leonhardt Husted at NIRAS and these were analysed using gene amplicon sequencing targeting the bacteria 16S rRNA gene variable regions 1-8 (bV18-A) in combination with taxonomic classification against the SILVA 138.1 99 % NR database.

1.1 DNASense microbial marker gene analysis

The general microbial community analysis workflow from raw sample to the final report is outlined in figure 1. First, incoming samples are registered in the laboratory and DNA is extracted from all organisms in the sample. Afterwards, the extracted microbial DNA is processed and sequencing libraries prepared for DNA sequencing on state-of-the-art equipment in DNASense's laboratory. DNA from each microbe in the microbiome contains specific taxonomic marker genes (also called fingerprint genes) that can be used for organism identification and abundance estimation. Examples of marker genes are the *16S ribosomal RNA (16S rRNA)* gene for bacteria and archaea, and the *internal transcribed spacer (ITS)* for fungi. DNA sequencing is used to count the number of marker gene copies observed from each microbe in a sample, and that count is in turn used as an estimate of the relative abundance of the microbe in the sample microbiome. Thousands of marker gene copies are DNA sequenced from each sample to provide a high resolution of the community structure. The taxonomic marker genes are matched with a reference database for identification of the microbes in the community.

Sample preparation and DNA sequencing for the taxonomic marker genes were conducted in agreement with the latest research standards. The organism abundances - presented in the analysis - represent the count of each taxonomic marker gene in the sample. Hence these abundances are influenced by DNA extraction, gene copy number and primer biases and does not necessarily represent the absolute *in situ* organism abundances.

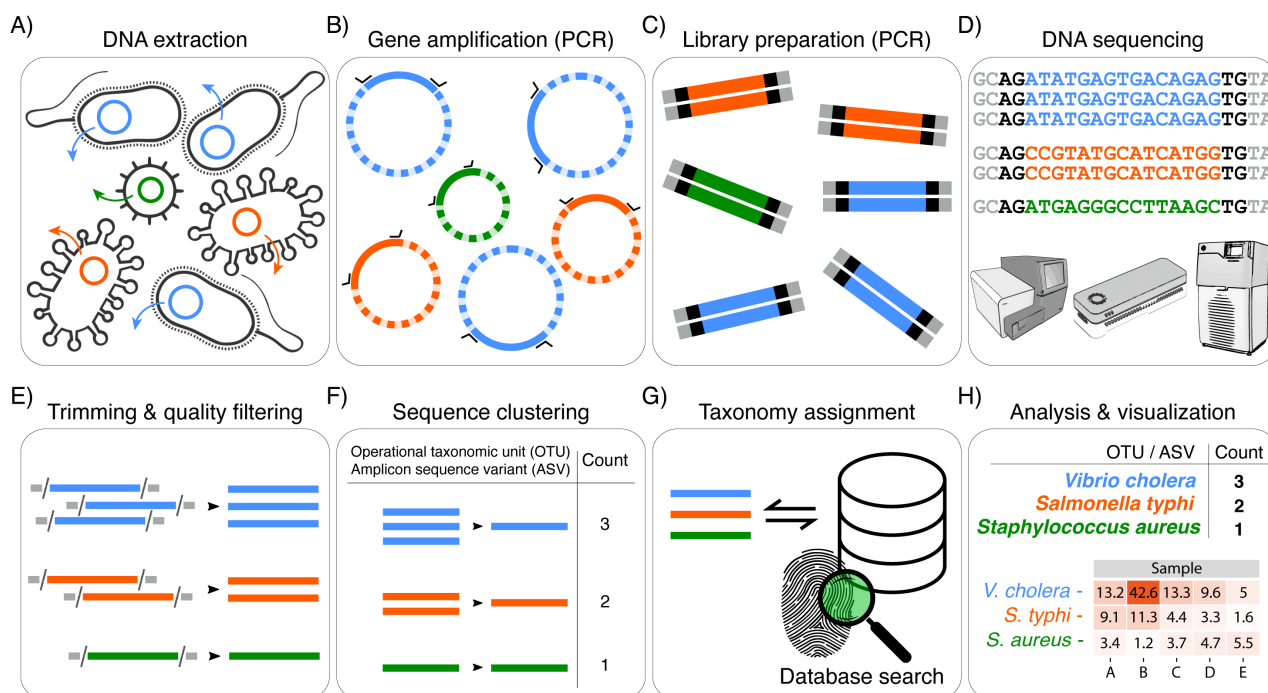


Figure 1: Overview of the general workflow from sample to microbial community profile. **A)** Total sample DNA is extracted and **B)** DNA amplicons are prepared using PCR with specific primers (black) targeting e.g. the 16S rRNA gene variable regions for bacterial taxonomic marker genes. **C)** A second processing step adds sequencing adapters. **D)** Resulting amplicon libraries are DNA sequenced and then basecalled. **E)** Basecalled sequences are adapter trimmed and quality filtered. **F)** DNA reads are partitioned into clusters (either so-called OTUs or assigned sequence variants ASVs) providing the read abundance of each cluster. **G)** Read sequence taxonomy is assigned by searching against a reference database. **H)** OTU/ASV tables correlating taxonomy and abundance are generated for further results analysis.

2 Results

2.1 Data availability

The project data is available from the dropbox folder [/CP1317](#) with the password **calendar45homes**. The file **shiny/rawData.zip** contains the raw unprocessed sequencing data, and the folder **/figures** includes project figures in print friendly format for general use.

The file **shiny/OTUtable.txt** contains the different OTUs that were identified in all samples, their abundances and taxonomic assignment. Each OTU has a unique identifier and the DNA sequence for the specific OTU mapped to can be found in the file **shiny/OTUs.fa**. Data can also be explored, filtered and visualized in heatmaps and ordination plots, such as PCA, in the DNASense app using the link <https://dnasense.shinyapps.io/dnasense/> with the username CP1317 and the same password as above. Furthermore, summary data tables are provided in the file **summary_tables.xlsx** including a sequencing overview table, output of OTU count tables including their corresponding DNA sequence, and OTU count tables rarefied to 31666 reads; the latter for direct comparison between samples or sample groups.

2.2 DNA extraction, library preparation and sequencing

DNA extraction and sequencing library preparation was successful for 22 / 22 sample analyses (100 %), and yielded between 31666 and 93803 DNA reads after QC and bioinformatic processing (table 1). Failed samples were those yielding significantly less mapped DNA reads (mappedReads) than 10000; here mappedReads < 8000. Low-read samples were disregarded in all subsequent analyses. For this project no samples failed and all were therefore included in analyses. Table 1 provides an overview of the sequencing outcome, and much more extensive data details are given in the sequencing overview table in summary_tables.xlsx.

Table 1: Sequencing statistics. **seqID** is the name of the sequencing data file ID, **sampleName** is the customer-provided sample label, and **libType** indicates the marker gene region targeted via the designation of the primer set used. **rawReads** is the total number of DNA reads from sequencing, **filtReads** is the number of DNA reads after filtering for quality and length range, **mappedReads** is the final number of DNA reads mapped to reference database after filtering for mapping quality, **mappedRatio** is the ratio of mappedReads to filtReads. **OTUs** is the total number of OTUs observed in the sample, and **Shannon** is a commonly used alpha-diversity index for comparing sample diversities and essentially quantifies the number of typical OTUs observed in a given sample.

seqID	sampleName	libType	rawReads	filtReads	mappedReads	mappedRatio	OTUs	Shannon
barcode73	WC1SAL-BIO	bV18-A	128000	100000	80048	0.80	380	4.28
barcode74	KK103-BIO	bV18-A	77122	65166	54677	0.84	439	4.59
barcode75	WC-Stue-BIO	bV18-A	128000	100000	88417	0.88	404	3.90
barcode76	KK1SAL-BIO	bV18-A	125250	100000	87917	0.88	302	3.26
barcode77	SB412-BIO	bV18-A	128000	100000	87164	0.87	390	4.47
barcode78	SB104-1-BIO	bV18-A	128000	100000	64342	0.64	1180	6.12
barcode79	WC101-BIO	bV18-A	45665	39710	31666	0.80	673	5.05
barcode80	WC102-BIO-12-12	bV18-A	128000	100000	83321	0.83	416	3.68
barcode81	WC105-BIO	bV18-A	128000	100000	79818	0.80	332	3.57
barcode82	WC105-BIO-A	bV18-A	92234	81319	71829	0.88	302	3.52
barcode83	WC102-BIO	bV18-A	128000	100000	76092	0.76	500	4.33
barcode84	FA311-BIO	bV18-A	128000	100000	83962	0.84	426	4.01
barcode85	KK101-BIO	bV18-A	128000	100000	90092	0.90	77	1.70
barcode86	WC314-BIO	bV18-A	125382	100000	84612	0.85	455	4.20
barcode87	KK316-BIO-B	bV18-A	128000	100000	81495	0.81	425	4.08
barcode88	KK316-BIO-A	bV18-A	82598	71113	59898	0.84	310	3.68
barcode89	SB103-BIO	bV18-A	128000	100000	69976	0.70	523	4.37
barcode90	SB178-BIO	bV18-A	97829	84852	60937	0.72	823	4.77
barcode91	WC123-BIO	bV18-A	125430	100000	93126	0.93	371	4.33
barcode92	SB202-BIO	bV18-A	71627	55930	34308	0.61	1154	5.70
barcode93	WC122-BIO	bV18-A	128000	100000	83636	0.84	453	4.38
barcode94	KK201-BIO	bV18-A	127329	100000	93803	0.94	240	2.31

Sample sequencing rarefaction curves for evaluation of the obtained sequencing depth relative to sample complexity, here represented as unique OTU sequences observed (figure 2). Shown below are curves for the first samples from the bV18-A data set, please see the */figures* folder for additional plots.

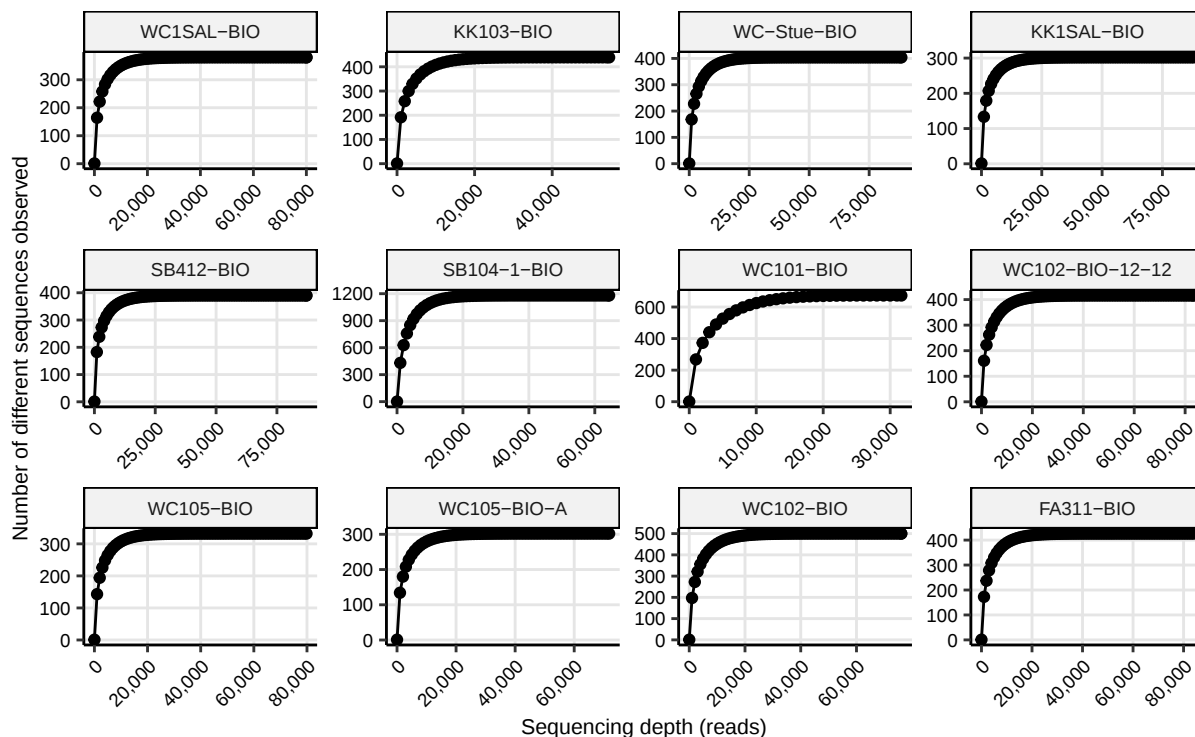


Figure 2: Rarefaction curves for sequencing of samples. The x-axis represents the number of sequences sampled whereas the y-axis depicts the number of observed OTUs.

2.3 Microbial community composition

Figure 3 gives an overview of the 20 most abundant genera across all samples.



Figure 3: Heatmap of the 20 most abundant genera. The most abundant genera in all samples. Where available the OTU's phylum classification is provided along with genus, and if no genus level classification could be obtained, the OTU identification of the sequence mapped to in the database, is given. Values are shown as normalised fraction of total sequences (%).

Figure 4 shows comparison of overall microbial compositions using multivariate statistics (PCA) for all samples.

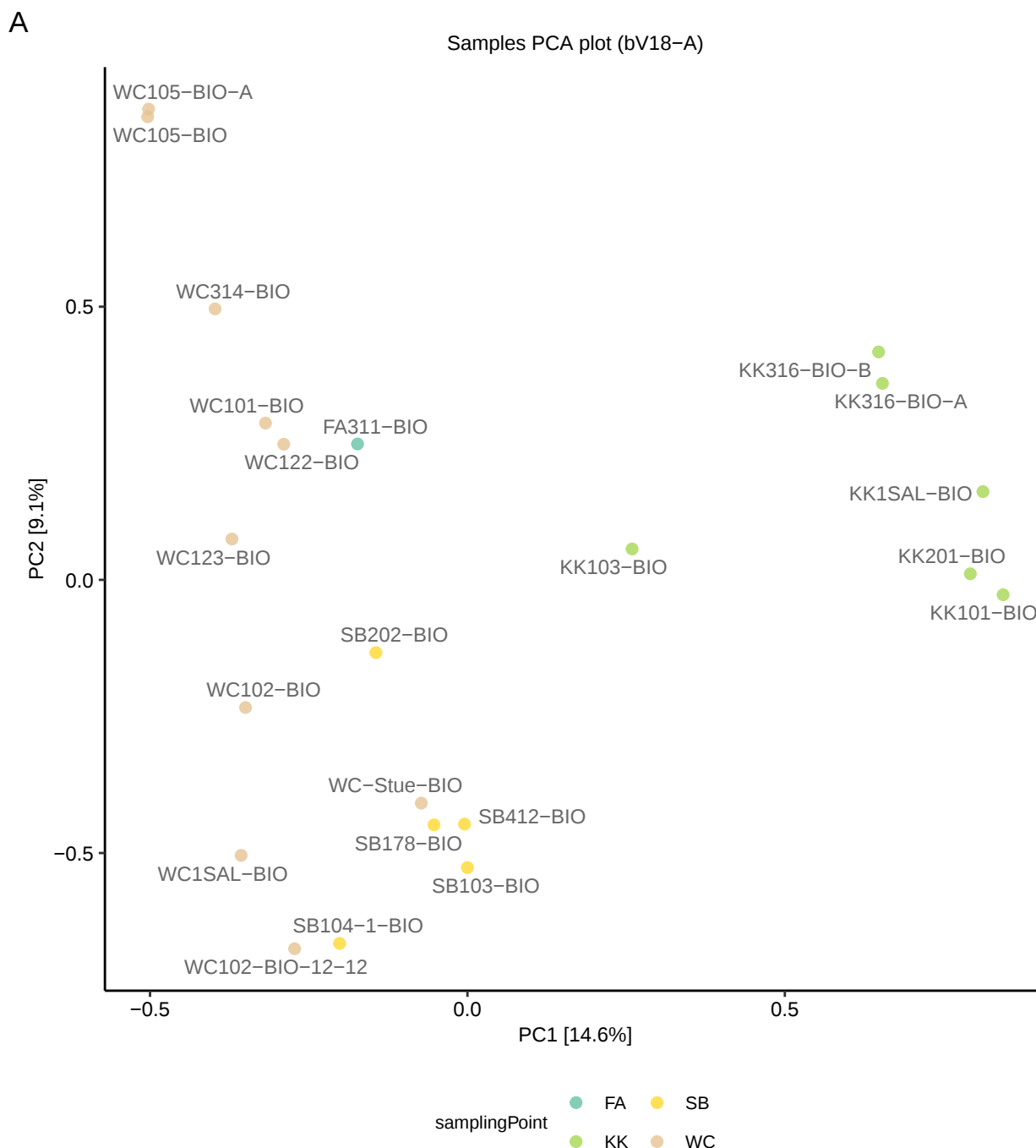


Figure 4: Principal component analysis (PCA). Identification of samples with similar microbial communities using multivariate statistics. Each point represents the microbial community in a specific sample. Distance between the sample dots signifies similarity; the closer the samples are, the more similar microbial composition they have. Hellinger transformation was used for PCA.

3 Materials and methods

The project data analysis and reporting was done using DNASense's custom bioinformatic workflow (version *MGA_ONT_DS240107*).

3.1 Sample DNA extraction

3.1.1 DNeasy PowerWater Kit

Extraction of DNA from the swaps was performed using a slightly modified version of the standard protocol for DNeasy PowerWater Kit (Qiagen, Germany). Gel electrophoresis using Tapestation 2200 and Genomic DNA screentapes (Agilent, USA) was used to validate product size and purity of a subset of DNA extracts. DNA concentration was measured using Qubit dsDNA HS/BR Assay kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.2 Bacteria 16S rRNA gene variable regions 1-8 (bV18-A) sequencing

3.2.1 Sequencing library preparation

Amplicon libraries for the bacteria 16S rRNA gene variable regions 1-8 (bV18-A) were prepared using a custom protocol. Up to 25 ng of extracted DNA was used as template for PCR amplification, and each PCR reaction (50 μ L) contained 0.2 mM dNTP mix, 0.01 units of Platinum SuperFi DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), and 500 nM of each forward and reverse primer in the supplied SuperFi Buffer. PCR was done with the following program: Initial denaturation at 98 °C for 3 min, 25 cycles of amplification (98 °C for 30 s, 62 °C for 20 s, 72 °C for 2 min) and a final elongation at 72 °C for 5 min. The forward and reverse primers used include custom 24 nt barcode sequences followed by the sequences targeting bV18-A: [8F] AGRGTTYGATYMTGGCTCAG and [1391R] GACGGGCGGTGWGTRCA [1–4].

The resulting amplicon libraries were purified using the standard protocol for CleanNGS SPRI beads (CleanNA, NL) with a bead to sample ratio of 3:5. DNA was eluted in 25 μ L of nuclease free water (Qiagen, Germany). Sequencing libraries were prepared from the purified amplicon libraries using the SQK-LSK114 kit (Oxford Nanopore Technologies, UK) according to manufacturer protocol with the following modifications: 500 ng total DNA was used as input, and CleanNGS SPRI beads for library clean-up steps. DNA concentration was measured using Qubit dsDNA HS Assay kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Gel electrophoresis using Tapestation 2200 and D1000/High sensitivity D1000 screentapes (Agilent, USA) was used to validate product size and purity of a subset of amplicon libraries.

3.2.2 DNA sequencing

The resulting sequencing library was loaded onto a MinION R10.4.1 flowcell and sequenced using the MinKNOW 23.11.4 software (Oxford Nanopore Technologies, UK). Reads were basecalled and demultiplexed with MinKNOW Dorado 7.2.13 using the super accurate basecalling algorithm (config *r10.4.1_400bps_sup.cfg*) and custom barcodes.

3.2.3 Bioinformatic processing

The sequencing reads in the demultiplexed and basecalled fastq files were filtered for length (320 - 2000 bp) and quality (phred score > 15) using a local implementation of [filtlong](#) v0.2.1 with the settings **–min_length 320 –max_length 2000 –min_mean_q 97**. The SILVA 16S/18S rRNA 138 SSURef NR99 full-length database in

RESCRIPt format was downloaded from the [QIIME](#) on 29 september 2022 [5–7]. Potential generic place holders and dead-end taxonomic entries were cleared from the taxonomy flat file, i.e. entries containing *uncultured*, *metagenome* or *unassigned*, were replaced with a blank entry. The filtered reads were mapped to the SILVA 138.1 99 % NR database with minimap2 v2.24-r1122 using the **-ax map-ont** command [8] and downstream processing using samtools v1.14 [9]. Mapping results were filtered such that query sequence length relative to alignment length deviated < 5 %. **Noteworthy**, low-abundant OTUs making up < 0.01 % of the total mapped reads within each sample were disregarded as a data denoising step. Further bioinformatic processing was done via RStudio IDE (2023.3.0.386) running R version 4.3.2 (2023-10-31) and using the R packages: ampvis2 (2.8) [10], tidyverse (2.0.0), seqinr (4.2.30), ShortRead (1.58.0) and iNEXT (3.0.0) [11,12].

References

- 1 Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ & Noller HF (1978) [Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from escherichia coli](#). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 4801–4805.
- 2 Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Bandela AM, Cardenas E, Garrity GM & Tiedje JM (2007) [The ribosomal database project \(RDP-II\): Introducing myRDP space and quality controlled public data](#). *Nucleic Acids Research* **35**, D169.
- 3 Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M & Glöckner FO (2013) [Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies](#). *Nucleic Acids Research* **41**, 1–11.
- 4 Karst SM, Ziels RM, Kirkegaard RH, Sørensen EA, McDonald D, Zhu Q, Knight R & Albertsen M (2021) [High-accuracy long-read amplicon sequences using unique molecular identifiers with nanopore or PacBio sequencing](#). *Nature Methods* 2021 18:2 **18**, 165–169.
- 5 Robeson MS, O'Rourke DR, Kaehler BD, Ziemski M, Dillon MR, Foster JT & Bokulich NA (2020) [RE-SCRIPT: Reproducible sequence taxonomy reference database management for the masses](#). *bioRxiv*, 2020.10.05.326504.
- 6 Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J & Glöckner FO (2013) [The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools](#). *Nucleic Acids Research* **41**, 590–596.
- 7 Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, Schweer T, Peplies J, Ludwig W & Glöckner FO (2014) [The SILVA and “all-species living tree project \(LTP\)” taxonomic frameworks](#). *Nucleic Acids Research* **42**, D643–D648.
- 8 Li H (2018) [Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences](#). *Bioinformatics* **34**, 3094–3100.
- 9 Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, Whitwham A, Keane T, McCarthy SA, Davies RM & Li H (2021) [Twelve years of SAMtools and BCFtools](#). *GigaScience* **10**, 1–4.
- 10 Albertsen M, Karst SM, Ziegler AS, Kirkegaard RH & Nielsen PH (2015) [Back to basics – the influence of DNA extraction and primer choice on phylogenetic analysis of activated sludge communities](#). *PLOS ONE* **10**, e0132783.
- 11 Hsieh TC, Ma KH & Chao A (2016) [iNEXT: An R package for rarefaction and extrapolation of species diversity \(hill numbers\)](#). *Methods in Ecology and Evolution* **7**, 1451–1456.
- 12 Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sander EL, Ma KH, Colwell RK & Ellison AM (2014) [Rarefaction and extrapolation with hill numbers: A framework for sampling and estimation in species diversity studies](#). *Ecological Monographs* **84**, 45–67.

Bilag 1.C

Samlet analyserapport

Prøvenr.	Prøvemrk.	Placering	Etage	Modtaget	Prøvested	Rør	Flow	Prøvevolumen	Chloroform	1,1,1-trichlorethan	Tetrachlormethan	Trichlorethylen	Tetrachlorethylen	Vinylchlorid	1,1-dichlorethylen	trans-1,2-dichlorethylen	cis-1,2-dichlorethylen	1,2-dichlorethan	1,1-dichlorethan
						-	l/min	l	µg/m3	µg/m3	µg/m3	µg/m3	µg/m3	µg/m3	µg/m3	µg/m3	µg/m3	µg/m3	µg/m3
257729	LS101	Køkkenvask	Stueplan	03-11-2023	Lokalitet 1	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<0,40	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
257730	LS102	Toilet	1. sal	03-11-2023	Lokalitet 1	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<0,40	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
257731	LS103	Samlebrønd	Terræn	03-11-2023	Lokalitet 1	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<0,40	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
288881	LS101	Køkkenvask	Stueplan	08-12-2023	Lokalitet 1	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<0,40	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
288882	LS102	Toilet	1. sal	08-12-2023	Lokalitet 1	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<0,40	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
288883	LS103	Samlebrønd	Terræn	08-12-2023	Lokalitet 1	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<0,40	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
255443	LS301	Køkkenvask	Stueplan	01-11-2023	Lokalitet 2	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	19	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
255444	LS302	Håndvask	1. sal	01-11-2023	Lokalitet 2	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	4,1	1,7	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
255445	LS201	Toilet	1. sal	01-11-2023	Lokalitet 2	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	2,4	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
255446	LS303	Gulv afløb	1. sal	01-11-2023	Lokalitet 2	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	0,93	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
294997	LS104-SB-1	Samlebrønd	Terræn	15-12-2023	Lokalitet 3	ORSA			<0,15	<0,16	0,22	<0,16	<0,16	<0,040	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
295006	LS101	Toilet	Stueplan	15-12-2023	Lokalitet 3	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<0,40	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
295007	LS102	Toilet	1. sal	15-12-2023	Lokalitet 3	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<0,40	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
295008	LS103	Køkkenvask	2. sal	15-12-2023	Lokalitet 3	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<0,40	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
295009	LS105	Toilet	2. sal	15-12-2023	Lokalitet 3	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<0,40	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
294798	IL-WC-stue	Toilet	Stueplan	15-12-2023	Lokalitet 4	Kulrør	0,1	10	7	<2,5	<2,5	<2,5	8	23	2,8	<1,0	<1,0	30	<1,0
294799	IL-WC-1 sal	Toilet	1. sal	15-12-2023	Lokalitet 4	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	6,7	5,3	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
294800	IL-KK-1 sal	Køkkenvask	1. sal	15-12-2023	Lokalitet 4	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<0,40	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
295326	LS412-SB	Samlebrønd	Terræn	15-12-2023	Lokalitet 4	ORSA			<0,15	<0,16	0,33	0,6	2,4	1,1	<0,10	<0,10	7,6	<0,10	<0,10
288870	LS311	Faldstamme	Stueplan	08-12-2023	Lokalitet 5	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	2,1	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
288871	LS314	Toilet	Stueplan	08-12-2023	Lokalitet 5	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	1,5	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
288872	LS316	Køkkenvask	1. sal	08-12-2023	Lokalitet 5	Kulrør	0,1	10	<2,5	5,9	<2,5	<2,5	<2,5	36	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
274917	LS178-SB	Samlebrønd	Terræn	23-11-2023	Lokalitet 5	ORSA			<0,19	<0,21	0,26	1,1	65	<0,040	<0,10	<0,10	0,17	<0,10	<0,10
302544	LS122	Toilet	Stueplan	28-12-2023	Lokalitet 6	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<0,40	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
302545	LS123	Toilet	1. sal	28-12-2023	Lokalitet 6	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<0,40	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
302546	LS201	Køkkenvask	1. sal	28-12-2023	Lokalitet 6	Kulrør	0,1	10	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	4,3	<0,40	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0

Markering viser, hvor der er påvist indhold over detektionsgrænsen