

BTO 2017.089 | Januari 2018

## **BTO** rapport

ATP en flowcytometrie  
voor bepalen van de  
biomassa in water



# BTO

## ATP en flowcytometrie voor bepalen van de biomassa in water

BTO 2017.089 | Januari 2018

### Opdrachtnummer

400554-196

### Projectmanager

Michiel Hootsmans

### Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische activiteit

### Kwaliteitsborger

Paul van der Wielen

### Auteurs

Kimberly Learbuch, Nikki van Bel

### Verzonden aan

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

**Jaar van publicatie**  
2018

**Meer informatie**  
dr. Nikki van Bel  
T 030-6069516  
E [Nikki.van.Bel@kwrwater.nl](mailto:Nikki.van.Bel@kwrwater.nl)

**Keywords**  
Flow cytometrie, ATP, biomassa, directe celtelling

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](mailto:info@kwrwater.nl)  
I [www.kwrwater.nl](http://www.kwrwater.nl)

**KWR** Watercycle  
Research  
Institute

BTO 2017.089 | Januari 2018 © KWR

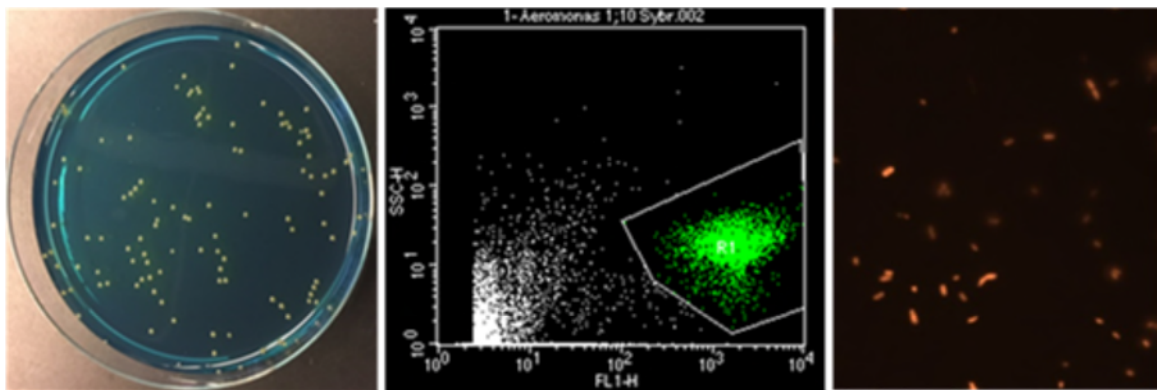
Alle rechten voorbehouden.  
Niets uit deze uitgave mag worden vervoelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke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

## BTO Managementsamenvatting

### *ATP en flowcytometrie zijn geschikte testmethoden om biomassa of microben in drinkwatermonsters te bepalen*

**Auteurs** dr. ir. Nikki van Bel, Kimberly Learbuch MSc, dr. Paul van der Wielen

Uit een vergelijking van zes methoden om de biomassa of aantal microben in een drinkwatermonster te bepalen, komen ATP-gehalte en flowcytometrie als meest geschikt naar voren. De ATP-bepaling, uitgevoerd volgens twee methoden, detecteert ATP van alle onderzochte organismen: bacteriën, filamenteuze schimmels, gisten en protozoa. Flowcytometrie is geschikt voor tellingen van aantallen bacteriën en gisten in water. Schimmels worden hier niet betrouwbaar meegeteld; detectie van protozoa is mogelijk, mits de instellingen worden aangepast. De kweek- en directe celmethode zijn geschikt voor alle micro-organismen, behalve respectievelijk protozoa en filamenteuze schimmels. Vanwege onvoldoende gevoeligheid is de bepaling van het totaal organisch koolstofgehalte (TOC) ongeschikt. Binnen de drinkwaterbedrijven bestond nog onduidelijkheid omtrent de betekenis van de gegevens van de verschillende biomassabepalingen. Dit leidde tot discussies over de toepassing en interpretatie ervan. Betrouwbare analysemethoden voor bepalingen van de hoeveelheid biomassa in water en biofilm zijn nodig om kwaliteitsproblemen door nagroei in het drinkwater tijdens transport in het distributiesysteem en drinkwaterinstallaties te beheersen.



*V.l.n.r.: kweekplaat, flowcytometrie en directe celtelling van de bacterie Aeromonas hydrophila*

#### **Belang: betrouwbaarheid en interpretatie van biomassamethoden**

Voor de Nederlandse drinkwatervoorziening is distributie van drinkwater zonder restgehalte van een desinfectiemiddel een belangrijke eigenschap. Voor een goede beheersbaarheid van waterkwaliteitsproblemen door nagroei zijn betrouwbare analysemethoden nodig die de hoeveelheid biomassa in water en biofilm tijdens transport in het distributiesysteem en drinkwaterinstallaties bepalen. Goede biomassabepalingen maken opsporing van nagroei mogelijk, evenals de beoordeling van de

effectiviteit van maatregelen om deze problemen aan te pakken.

Momenteel wordt door waterbedrijven gebruikgemaakt van verschillende methoden: 1) ATP, 2) celtellingen met flowcytometrie, microscopie of kweek, en 3) bepalingen van totaal organisch koolstof. Over de betekenis van de gegevens bestaan nog een aantal onduidelijkheden, wat leidt tot discussies over de toepassing en interpretatie ervan binnen de bedrijfstak. In dit onderzoek worden de volgende vragen behandeld om hierin meer inzicht te verschaffen:

- In hoeverre wordt het ATP-gehalte van protozoën, schimmels en gisten bepaald met het huidige ATP-protocol?
- In welke mate draagt het ATP van protozoën, schimmels en gisten bij aan de gemeten ATP-concentratie van het water?
- In hoeverre worden protozoën, schimmels en gisten meegeteld in het huidige flowcytometrie (FCM)-protocol?

#### Aanpak: vergelijken methoden met verschillende micro-organismen

Van zes methoden (ATP-bepaling volgens twee methoden, kweek, flowcytometrie, directe celtelling met microscopie, koolhydraatgehalte in water en in droge stof) is getest of deze verschillende soorten micro-organismen in drinkwater kunnen detecteren. Het gaat hierbij om drie soorten bacteriën die als indicator dienen voor mycobacteriën, gram-negatieve en gram-positieve bacteriën, één filamenteuze schimmelsoort, één gistsoort en twee protozoasoorten.

#### Resultaten: meeste micro-organismen zijn meetbaar met geteste methoden

Met beide ATP-methoden wordt ATP van alle micro-organismen gemeten. De ATP-bepaling volgens de standaardmethode van KWR – met lysisbuffer van Celsis – geeft een lagere uitkomst dan bij gebruik van de lysisbuffer van LuminUltra. De kweekmethode is geschikt voor alle micro-organismen, behalve voor protozoa. Flowcytometrie volgens het standaard KWR-protocol geeft betrouwbare tellingen van aantallen bacteriën en gisten in drinkwater, niet van de aantallen

filamenteuze schimmels. Protozoa worden alleen gedetecteerd als de instellingen worden aangepast. De directe celtelmethode is geschikt voor alle micro-organismen behalve filamenteuze schimmels. Bepaling van het TOC-gehalte van micro-organismen in water of als droge-stof is ongeschikt vanwege onvoldoende gevoeligheid van deze methode.

#### Implementatie: ATP en flowcytometrie geschikt voor bepaling biomassagehalte of microben in drinkwater

Het ATP-gehalte en het aantal cellen (flowcytometrie) in een drinkwatermonster wordt voornamelijk bepaald door bacteriën. Voor bepaling van de actieve biomassa in een drinkwatermonster is ATP geschikt, terwijl flowcytometrie geschikt is om aantal microben te bepalen. Met de standaard ATP-methode worden ook gisten, filamenteuze schimmels en protozoa aangetoond. Gisten zijn eveneens aantoonbaar met de standaard flowcytometrie, maar filamenteuze schimmels en protozoa blijven hiermee buiten beeld.

Doordat het ATP-gehalte per cel en tussen bacteriesoorten kan verschillen is flowcytometrie een minder geschikte methode dan de ATP-methode om de concentratie (actieve) biomassa in drinkwater te bepalen.

#### Rapport

Dit onderzoek is beschreven in rapport *ATP en flowcytometrie voor bepalen van de biomassa in water* (BTO 2017.089).

# Samenvatting

Distributie van drinkwater zonder een restgehalte van een desinfectiemiddel is een belangrijke eigenschap van de drinkwatervoorziening in Nederland. Om kwaliteitsproblemen door nagroei in het drinkwater tijdens transport in het distributiesysteem en drinkwaterinstallaties te beheersen, zijn betrouwbare analysemethoden nodig om de hoeveelheid biomassa in water en biofilm te kunnen bepalen.

Er zijn verschillende soorten biomassamethoden: 1) het ATP-gehalte bepalen als maat voor de actieve biomassa, 2). Cellen tellen met flowcytometrie, microscopie of kweek, en 3). Totaal organisch koolstof (TOC) gehalte van micro-organismen bepalen. Binnen drinkwatermonitoring worden de biomassametingen met ATP en celaantallen veelvuldig gedaan op water- en/of biofilmmonsters uit (drink)watersystemen. Over de betekenis van de gegevens die met deze technieken worden verzameld, bestaan nog een aantal onduidelijkheden die de toepassing en interpretatie van de gegevens belemmeren en leiden tot discussies binnen de bedrijfstak. De onderzoeksvragen zijn:

- In hoeverre wordt het ATP-gehalte van protozoën, schimmels en gisten bepaald met het huidige ATP-protocol?
- Wat is de bijdrage van ATP van protozoën, schimmels en gisten aan de gemeten ATP concentratie van het water?
- In hoeverre worden protozoën, schimmels en gisten mee geteld bij het nu gebruikte FCM-protocol?

Zes biomassamethoden (ATP-bepaling volgens twee methoden, kweek, flowcytometrie, directe celtelling, TOC-gehalte in water en in droge stof) zijn getest op verschillende soorten micro-organismen: drie soorten bacteriën (gram-negatief, gram-positief en mycobacteriën die een sterke en dikke celwand hebben), één filamenteuze schimmel, één gist en twee protozoasoorten die voor kunnen komen in het distributienet.

Met beide ATP-methoden wordt ATP van alle micro-organismen gemeten. De ATP bepaling volgens de standaard methode van KWR (Celsis-methode) geeft een lager ATP-gehalte dan wanneer de lysisbuffer van LuminUltra (LuminUltra-methode) wordt gebruikt. De kweekmethode is geschikt voor alle micro-organismen, behalve de protozoa welke niet op een agarplaat kunnen groeien. Flowcytometrie, volgens het standaard KWR-protocol, kan gebruikt worden om aantallen bacteriën en gisten in water te tellen. Filamenteuze schimmels worden niet betrouwbaar geteld met FCT door de aanwezigheid van hyphen die meerdere sporen bevatten. Protozoa worden niet gedetecteerd met de standaardinstellingen van de flowcytometer, maar wel als de instellingen worden aangepast. Directe celtelling met de fluorescentiemicroscopie is geschikt voor alle micro-organismen behalve filamenteuze schimmels. Het totaal organisch koolstofgehalte (TOC) van micro-organismen (in water alsook droge stof) kan niet betrouwbaar gemeten worden, omdat de methode niet gevoelig genoeg is.

Uit de resultaten wordt geconcludeerd dat met het huidige ATP-protocol dat door KWR wordt toegepast om ATP in drinkwater en biofilms te meten (Celsis-methode) ATP van bacteriën, schimmels en protozoa wordt bepaald. Daarnaast laten berekeningen zien dat meer dan 98% van het ATP dat in drinkwater wordt gemeten, afkomstig is van bacteriën, terwijl schimmels en protozoa minder dan 1% bijdragen aan deze ATP-concentratie. Flowcytometrie is niet of

minder gemakkelijk in staat om filamenteuze schimmels en protozoa te tellen. Deze twee groepen van micro-organismen maken echter minder dan 1% van de micro-organismen in drinkwater uit, waardoor flowcytometrie een betrouwbaar beeld van het aantal cellen in drinkwater geeft. Doordat de ATP-concentratie per cel kan verschillen tussen bacteriesoorten, zijn celtaantallen niet altijd een betrouwbaardere maat voor de hoeveelheid biomassa in drinkwater.

# Inhoud

<b>Samenvatting</b>	<b>2</b>
<b>Inhoud</b>	<b>4</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>6</b>
1.1 Aanleiding	6
1.2 Onderzoeksvragen	6
<b>2 Literatuuronderzoek</b>	<b>7</b>
2.1 ATP	7
2.2 Flowcytometrie	11
2.3 Biomassa-koolstof bepaling	14
<b>3 Experimenteel onderzoek - Materiaal en methoden</b>	<b>16</b>
3.1 Inleiding	16
3.2 Materiaal en Methoden	16
<b>4 Experimenteel onderzoek - Resultaten</b>	<b>23</b>
4.1 Vergelijking ATP analysemethoden	23
4.2 Vergelijking biomassa analysemethoden op hoge aantallen micro-organismen	23
<b>5 Discussie</b>	<b>27</b>
5.1 Toepassing van analysemethoden op micro-organismen	27
5.2 Celsis vs LuminUltra	29
5.3 ATP-gehalte per cel	30
5.4 Bijdrage van micro-organismen aan het ATP gehalte van drinkwatermonsters	31
5.5 Toepasbaarheid van ATP en flowcytometrie om de biomassa van drinkwater te bepalen	32
<b>6 Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>34</b>
6.1 Conclusies	34
6.2 Aanbevelingen	34
<b>7 Referenties</b>	<b>36</b>
<b>Bijlage I Foto's van directe celtelling</b>	<b>41</b>
<b>Bijlage II Resultaten experimenten</b>	<b>44</b>
<b>Bijlage III Media recepten</b>	<b>45</b>



**Bijlage IV Flowcytometrie instellingen voor protozoa**

**47**

# 1 Inleiding

## 1.1 Aanleiding

Distributie van drinkwater zonder een restgehalte van een desinfectiemiddel is een belangrijke eigenschap van de drinkwatervoorziening in Nederland. Om kwaliteitsproblemen door nagroei in het drinkwater tijdens transport in het distributiesysteem en drinkwaterinstallaties te beheersen, zijn betrouwbare analysemethoden nodig om de hoeveelheid biomassa in water en biofilm te kunnen bepalen. Met goede biomassabepalingen kan nagroei worden opgespoord en maatregelen, die zijn genomen om nagroei te verlagen, worden beoordeeld.

Biomassametingen worden gedaan op (i) water- en biofilmmonsters uit (drink)watersystemen en (ii) als onderdeel van bioassay methoden om de microbiologische groei- (BPP) en biofilmvorming van water en materialen te bepalen. Om biomassa in water en biofilm aan de leidingwand en in het sediment kwantitatief te kunnen meten, zijn verschillende analysetechnieken geïntroduceerd en toegepast zoals (i) een biochemische methode om het gehalte ATP te meten, (ii) fysische technieken om het aantal cellen te tellen (microscopisch of met flowcytometrie), (iii) chemische methoden waarbij organische stof of specifieke bestanddelen hiervan (bijvoorbeeld koolhydraten, eiwitten) worden bepaald en (iv) kweekmethode om het aantal levende en kweekbare cellen te bepalen. Over de betekenis van de gegevens die met deze technieken worden verzameld, bestaan nog een aantal onduidelijkheden die de toepassing en interpretatie van de gegevens belemmeren en leiden tot discussies binnen de bedrijfstak.

Bij de ATP analyse bestaan er onzekerheden over de mogelijke bijdrage van ATP uit protozoën, schimmels en gisten. Bij celtellingen met de flowcytometer (FCM) bestaan er onzekerheden over de betrouwbaarheid als maat voor biomassa: (i) wat is de invloed van verschillende groottes van de getelde cellen op de biomassaconcentratie en (ii) kunnen deeltjes in watermonsters een storend effect hebben op de meting. Het gaat dan met name om deeltjesgebonden cellen, protozoën, schimmels en gisten.

## 1.2 Onderzoeksvragen

De onderzoeksvragen die hieruit voortkomen zijn als volgt:

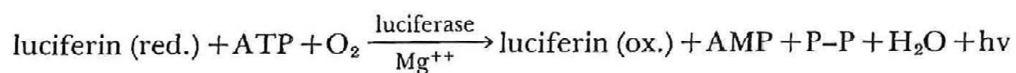
- In hoeverre wordt het ATP-gehalte van protozoën, schimmels en gisten bepaald met het huidige ATP-protocol van KWR met de ATP-kit van Celsis? Wat is de bijdrage van ATP van protozoën, schimmels en gisten aan de gemeten ATP concentratie van het water?
- In hoeverre worden protozoën, schimmels en gisten mee geteld bij het nu gebruikte flowcytometrie-protocol?

## 2 Literatuuronderzoek

### 2.1 ATP

#### 2.1.1 ATP bepaling

In de methode om het ATP-gehalte van een watermonster te bepalen wordt een substraat (luciferin) en enzym (luciferase) toegevoegd aan het watermonster. Het in het monster aanwezige ATP zet met behulp van het enzym het substraat om in licht en een aantal bijproducten volgens de reactie zoals gegeven in Figuur 1. In de eerste stap van de methode wordt een lysisbuffer toegevoegd waardoor de micro-organismen worden opengebrouwen zodat het intracellulaire ATP vrij komt. In deze lysisbuffer is ook het substraat luciferin aanwezig. Door de toevoeging van het enzym luciferase wordt vervolgens het substraat omgezet en wordt na korte tijd de hoeveelheid licht gemeten als maat voor de totale ATP-concentratie die in het monster aanwezig is.



FIGUUR 1. OMZETTING VAN HET SUBSTRAAT LUCIFERIN DOOR HET ENZYM LUCIFERASE IN ONDER ANDERE LICHT. HET ATP DAT IN HET MONSTER AANWEZIG IS, LEVERT DE ENERGIE DIE NODIG IS VOOR DEZE REACTIE.

De lysisbuffer is bij deze methode belangrijk en door de sterkte van deze lysisbuffer goed te kiezen, kan volgens de verschillende fabrikanten specifiek naar bacteriën (zwakke lysisbuffer) of andere cellen zoals gisten, algen, schimmels en zoogdiercellen (sterke lysisbuffer) worden gekeken. Een te zwakke lysisbuffer leidt dus tot incomplete lysis van de cellen waardoor het ATP in deze cellen niet wordt gemeten tijdens de enzymatische reactie. Een te sterke lysisbuffer remt echter de enzymatische omzetting van luciferin en de productie van licht, waardoor een onderschatting van het ATP gehalte wordt verkregen. Een belangrijk bestanddeel van de lysisbuffer is trichloroazijnzuur (TCA), dit breekt celmembranen af en inactieveert aanwezige enzymen, andere eiwitten en nucleïnezuren zoals DNA en RNA. Over het algemeen wordt 0,5 - 2,5% TCA toegevoegd om ATP uit cellen te isoleren. Bij micro-organismen als gisten, schimmels en algen kan echter een concentratie 5% TCA nodig zijn om het ATP vrij te maken (Karl et al., 1980; Stanley et al., 1986).

#### 2.1.2 ATP kits

Er zijn veel verschillende kits op de markt waarmee het ATP gehalte in verschillende soorten matrices kan worden bepaald. Bij KWR wordt gebruik gemaakt van de reagentia van Celsis. Deze kit is specifiek voor bacteriën in water en zou weinig ATP afkomstig uit andere micro-organismen moeten detecteren.

De meeste ATP kits richten zich specifiek op het meten van bacteriën of zoogdiercellen. De samenstelling van de lysisbuffer wordt echter in de meeste gevallen niet door de fabrikanten geleverd. In Tabel 1 is een (niet compleet) overzicht gegeven van een aantal ATP kits die op

de markt zijn. Aangegeven is wat, volgens de fabrikant, de detectielimiet is en welke soorten cellen en/of micro-organismen het zou moeten kunnen detecteren.

Duidelijk is dat de meeste kits zich richten op of het meten van ATP in bacteriën of ATP in eukaryote cellen. Hierbij is mogelijk per microbengroep optimalisatie vereist. Bij de BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay van Promega is aangegeven dat deze ook geschikt is voor een aantal schimmels en gisten, mits de incubatietijd van de lysisbuffer wordt verlengd. De Differential Quench-Gone Aqueous kit van LuminUltra is de enige kit waarbij specifiek wordt aangegeven dat deze ATP van schimmels, protozoa en algen meet. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een filtratiestap over een 0.22 µm filter, waarbij bacteriën en grotere micro-organismen op het filter achterblijven en daar vervolgens gelyseerd worden. Dit proces wordt niet geautomatiseerd aangeboden, maar moet grotendeels handmatig worden uitgevoerd. Omdat dit de enige kit is die aangeeft ATP van schimmels en protozoa te meten, geen tot weinig optimalisatie nodig is, en omdat het meten van ATP afkomstig van andere micro-organismen dan bacteriën niet de standaard zal worden, is er voor gekozen om deze kit, naast de standaard Celsismethode, voor de experimenten te gebruiken.

TABEL 1. OVERZICHT VAN ATP KITS OP DE MARKT. AANGEGEVEN IS WAT DE DETECTIELIMIET IS EN WELK SOORT CELLEN OF MICRO-ORGANISMEN HET ZOU MOET KUNNEN DETECTEREN. DE HIER GETOONDE INFORMATIE IS AFKOMSTIG VAN DE FABRIKANT.

Naam kit	Fabrikant	Detectiegrens	Bacteriën	Schimmels	Gist	Protozoa	Eukaryote cellen
Celsis, LuminEX	Charles River	1 pg/ml	X				
Quench-Gone Aqueous	LuminUltra	0,1 pg/ml	X				
Differential Quench-Gone Aqueous	LuminUltra	0,1 pg/ml		X	X	X	X
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega	10 cellen			X		X
BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay	Promega	10 <sup>-18</sup> mol	X	X	X		
ATP Bioluminescence Assay Kit	Sigma	2x10 <sup>-12</sup> mol/liter					X
ATP Determination Kit	Molecular Probes	10 <sup>-13</sup> mol	X				
Microbial ATP Kit	Isogen Life Science	10 <sup>-17</sup> mol	X				
Luminescent ATP Detection Kit	Abcam						X
Cellular ATP kit HTS	Isogen Life Science	10 <sup>-15</sup> mol					X
Intracellular ATP Kit	Isogen Life Science	10 <sup>-17</sup> mol	X				

### 2.1.3 Hoeveelheid ATP per cel

Het ATP gehalte verschilt per cel en wordt beïnvloed door een aantal factoren: i) soort micro-organisme, ii) fysiologische omstandigheden waarin het micro-organisme is opgegroeid (b.v. opgekweekt in rijk of arm medium, afkomstig uit een drinkwatermilieu), iii) de groeifase (exponentieel vs. stationaire fase en 4) het volume of de biomassa van de cel

(Karl, 1980; Eydal et al., 2007). Een vergelijking van resultaten van ATP bepalingen uit meerdere onderzoeken laat bijvoorbeeld zien dat de ATP-concentratie in bacteriën die uit natuurlijk water worden geïsoleerd 1-2 log lager ligt dan in bacteriën die in een rijk medium in het laboratorium zijn opgekweekt (Tabel 2).

TABEL 2. ATP CONCENTRATIE VAN BACTERIËN IN VERSCHILLENDE WATERMATRICES

Watertype	ATP concentratie		Referentie
	mol/bacterie	fg/bacterie	
Grondwater	4,3 - 10,2×10 <sup>-19</sup>	0,22 - 0,52	Eydal en Pedersen, 2007
Drinkwater biofilters	1,3 - 4,5×10 <sup>-19</sup>	0,066 - 0,23	Velten, 2007
Drinkwater biofilters	4,1×10 <sup>-20</sup>	0,21	Magic-Knezev en van der Kooij, 2004
Grondwater	0,4 - 7,9×10 <sup>-19</sup>	0,02 - 0,40	Jensen, 1989
Natuurlijk watermilieu	4,4×10 <sup>-20</sup> - 5,2×10 <sup>-19</sup>	0,022 - 0,26	Wilson, 1981
Diverse watermilieus	1,0×10 <sup>-19</sup>	0,051	Hammes, 2010
Salt marsh creek	0,05 - 5,7 ×10 <sup>-19</sup>	0,003 - 0,29	Hammes, 2010
Laboratorium in rijk medium	2,0×10 <sup>-18</sup>	1,01	Stanley, 1989
Laboratorium in rijk medium	1,8×10 <sup>-18</sup>	0,91	Crombrugge en Waes, 1991
Laboratorium in rijk medium	2,7×10 <sup>-18</sup>	1,37	Wilson, 1981
Drinkwater	3,4×10 <sup>-20</sup>	0,017	Van der Wielen, 2010

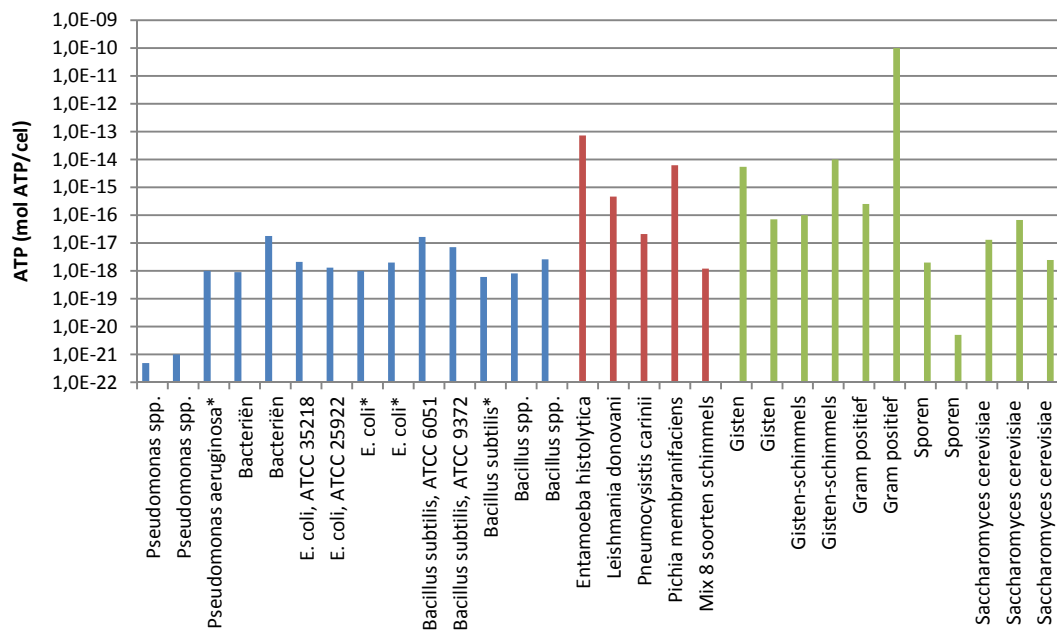
Sinds het ontstaan van de ATP bepaling is van een groot aantal bacteriën, schimmels en algen het ATP gehalte per cel bepaald. Een niet volledig overzicht hiervan is gegeven in Tabel 3. Een groot aantal onderzoeken geeft de ATP concentratie alleen weer in het aantal RLU (Relative Light Units), waarbij deze waarden niet naar gram of mol ATP zijn omgerekend, wat vergelijking tussen studies en/of micro-organismen moeilijk maakt. Ter illustratie is van een aantal soorten schimmels, gisten en bacteriën het ATP gehalte gegeven Tabel 3 en Figuur 2. Dit overzicht laat zien dat de ATP concentratie kan variëren tussen individuele bacteriën van één soort, tussen verschillende bacteriesoorten en tussen verschillende micro-organismen (Yaginuma et al., 2014; Pridmore et al., 1984; Fairbanks et al., 1984; Schneider and Gourse, 2004; Eydal et al, 2007).

Algemeen wordt aangenomen dat de gemiddelde ATP concentratie per *E. coli* bacterie, wanneer deze wordt opgekweekt in het lab, 1 femtogram (10<sup>-15</sup> gram) is. Dit staat gelijk aan 1,8×10<sup>-18</sup> mol ATP (Crombrugge en Waes, 1991). Ter vergelijking, een aantal eukaryote cellen, waaronder gisten, schimmels en protozoa bevatten duidelijk hogere ATP-concentraties per cel (minimaal 10<sup>-15</sup> mol ATP; Tabel 3).

TABEL 3. ATP CONCENTRATIE VAN VERSCHILLENDE SOORT MICRO-ORGANISMEN. OM DE ATP GEHALTES IN MOL/CEL EN FG/CEL OM TE REKENEN IS GEBRUIK GEMAAKT VAN HET MOLECULAIR GEWICHT VAN ATP (507,18 GRAM/MOL) EN EEN DROOGGEWICHT VAN 2,8×10<sup>-13</sup> GRAM/CEL (NEIDHARDT ET AL., 1996).

Bacteriën	ATP gehalte		Referentie
	mol ATP/cel	fg ATP/cel	
<i>Pseudomonas spp.</i>	0,5 - 1,0×10 <sup>-21</sup>	0,000254 - 0,000507	Hamilton, 1967
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	1,0×10 <sup>-18</sup>	0,507	Karl, 1980
<i>Pseudomonas fluorescens P17</i>	3,65×10 <sup>-18</sup>	1,85	LeChevallier, 1993

<i>Spirillum Nox</i>	$0,42 \times 10^{-18}$	0,213	LeChevallier, 1993
<b>Bacteriën</b>	$9,1 \times 10^{-19} - 1,8 \times 10^{-17}$	0,462 - 9,13	Holm-Hansen, 1973
<i>E. coli</i> , ATCC 35218	$2,1 \times 10^{-18}$	1,07	Hattori, 2003
<i>E. coli</i> , ATCC 25922	$1,3 \times 10^{-18}$	0,659	Hattori, 2003
<i>E. coli</i> *	$1 - 2 \times 10^{-18}$	0,507 - 5,01	Karl, 1980
<i>Bacillus subtilis</i> , ATCC 6051	$1,67 \times 10^{-17}$	8,47	Hattori, 2003
<i>Bacillus subtilis</i> , ATCC 9372	$7,13 \times 10^{-18}$	3,62	Hattori, 2003
<i>Bacillus subtilis</i> *	$6 \times 10^{-19}$	0,304	Dauner, 2001
<i>Bacillus spp.</i>	$8,12 \times 10^{-19} - 2,6 \times 10^{-18}$	0,412 - 1,32	Karl, 1980
<b>Schimmels</b>			
<i>Pichia membranifaciens</i>	$6,2 \times 10^{-15}$	3140	Veiga, 2003
Mix 8 soorten schimmels	$1,2 \times 10^{-18}$	0,609	Karl, 1980
<b>Gisten/Sporen</b>			
Gisten	$7,7 \times 10^{-17} - 5,5 \times 10^{-15}$	36,0 - 2790	Hattori, 2003
Gisten-schimmels	$10^{-16} - 10^{-14}$	50,7 - 5070	Venkateswaran, 2003
Gram positief	$2,5 \times 10^{-16} - 10^{-10}$	127 - 50700000	Venkateswaran, 2003
Sporen	$5 \times 10^{-21} - 2 \times 10^{-18}$	0,00254 - 1,01	Venkateswaran, 2003
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,3 \times 10^{-17}$	6,59	Autio, 1992
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$6,7 \times 10^{-17}$	34	Guillou, 2003
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$2,5 \times 10^{-18}$	1,27	Karl, 1980
<b>Protozoa</b>			
<i>Entamoeba histolytica</i>	$7,24 \times 10^{-14}$	36700	Berekend uit: Miyahira, 1991
<i>Leishmania donovani</i>	$4,65 \times 10^{-16}$	236	Berekend uit: Miyahira, 1991
<i>Pneumocystis carinii</i>	$0,21 \times 10^{-16}$	10,7	Berekend uit: Miyahira, 1991

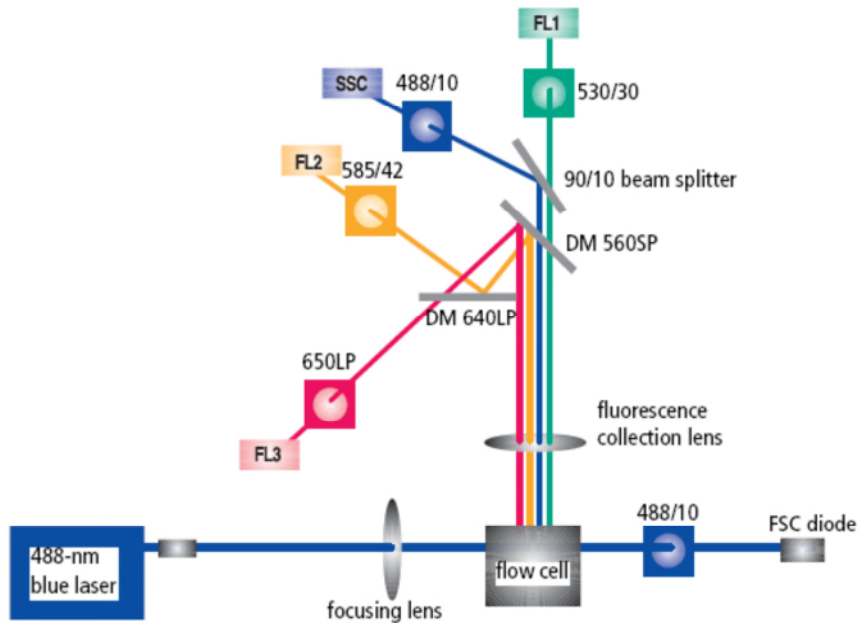


FIGUUR 2. ATP CONCENTRATIE PER CEL. BLAUW: BACTERIËN, ROOD: PROTOZOA, GROEN: GISTEN EN SPOREN. DE WAARDEN EN BIJBEHORENDE REFERENTIES ZIJN WEERGEGEVEN IN TABEL 3.

## 2.2 Flowcytometrie

### 2.2.1 Inleiding

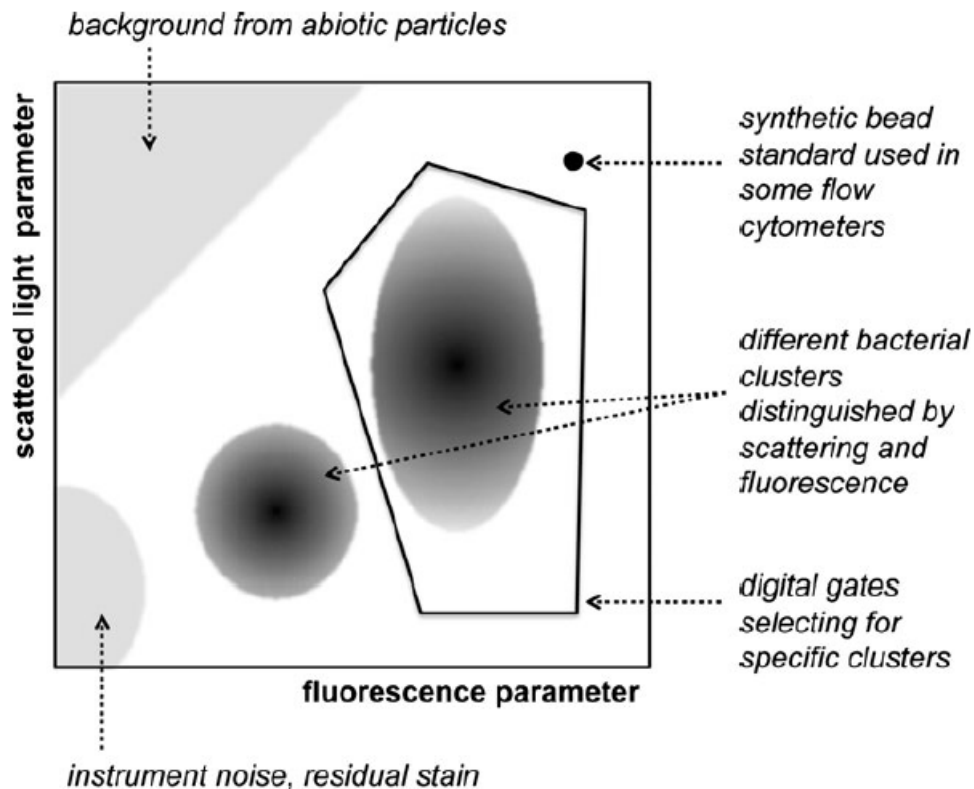
Flowcytometrie is een geautomatiseerde techniek voor het tellen van microscopisch kleine deeltjes die in een stromende vloeistof voorkomen. Een lichtstraal, meestal laserlicht van een enkelvoudige (monochrome) kleur, wordt gericht op een stromende vloeistof waarin per keer slechts één deeltje de lichtstraal passeert (door middel van hydrodynamische focusing). Het type, de grootte en andere eigenschappen van het deeltje dat zich in de lichtstraal bevindt bepaalt de mate van verstrooiing van het licht. Met de Forward Scatter diode wordt het volume (grootte) van de cel gemeten. Met de Side Scatter diode wordt de zijwaartse verstrooiing van het licht gemeten. Dit zegt wat over de granulariteit en de interne structuur van de cel. De fluorescentiedetectoren FL1, FL2 en FL3 meten fluorescentie-intensiteit (Figuur 3). Deze informatie wordt vertaald naar histogrammen en dot-plots. Door alle typen informatie te combineren is het mogelijk om cellen te onderscheiden en te tellen



FIGUUR 3. FACSCALIBUR OPTISCHE PAD CONFIGURATIE.

Een schematische weergave van een dot plot is weergegeven in Figuur 4, dit laat zien dat er een specifiek deel kan worden geselecteerd (gate) waarbij clusters met bijvoorbeeld bacteriecellen worden onderscheiden van clusters van achtergrond (Hammes & Egli, 2010). Dit onderscheid wordt gemaakt door het gebruik van fluorescente kleuring. Flowcytometrie is niet ideaal voor het analyseren van complexe macrodeeltjes analyse (zoals biofilm) of inorganische troebelheid (grond of sediment). Dit omdat flowcytometrie een methode is die enkele cellen telt die fluorescent zijn (Hammes & Egli, 2010).





FIGUUR 4. SCHEMATISCHE WEERGAVE DOT-PLOT VAN FLOWCYTOMETRIE (HAMMES & EGLI, 2010).

## 2.2.2 Flowcytometrie kits

### 2.2.2.1 KWR methode

De standaardprocedure voor flowcytometrie bij KWR maakt gebruik van de kleurstoffen SYBR-Green en Propidium Iodide (PI). De kleurstof SYBR-Green bindt aan DNA in alle cellen. PI kan een cel binnen gaan en aan het DNA binden wanneer het celmembraan permeabel is, wat in ieder geval zo is bij dode cellen. Op deze manier kan onderscheid worden gemaakt tussen het totaal aantal cellen (positief voor SYBR-Green), membraanintacte cellen (positief voor SYBR-Green-, negatief voor PI) en membraangecompromitteerde cellen (positief voor SYBR-Green en PI).

### 2.2.2.2 Gistkleuringen

Voor gistcellen is van Invitrogen de LIVE/DEAD® FungaLight™ Yeast Viability Kit beschikbaar. De kit bestaat uit de groene kleurstof SYTO® 9 en de rode kleurstof propidium iodide die beiden aan het DNA binden. Bij gebruik van alleen de SYTO® 9 kleuring worden alle gistcellen gelabeld, diegene met een intact membraan en die met een beschadigd membraan. Propidium iodide kleurt alleen het DNA van gistcellen met een beschadigd membraan. Dit zorgt voor een reductie van de SYTO® 9 signaal door fluorescentie resonantie energie transfer (FRET) wanneer beide kleurstoffen aanwezig zijn. Op deze manier kan onderscheid worden gemaakt tussen membraanintacte en membraanbeschadigde cellen.

### 2.2.2.3 Schimmel

Schimmels bestaan uit hyphen, sporen en conidiën. De sporen en conidiën hebben een erg dikke en resistente celwand die de protoplast beschermt tegen fysieke, chemische en

biologische bedreigingen. Deze celwand zorgt ook voor moeilijkheden met toepassing van fluorescente kleurstoffen in combinatie met flowcytometrie. In 2002 is een methode ontwikkeld om deze problemen te overkomen. Hiervoor wordt een monster van 1 ml gedurende 30 seconden op 440 W en 2.450 MHz opgewarmd in de magnetron. Vervolgens werd het monster 2 uur, op kamertemperatuur, gekleurd met propidium iodide (eindconcentratie 100 µg/l) (Prigrione, 2004).

#### 2.2.2.4 Protozoa

Een uitdaging bij het gebruik van flowcytometrie voor het tellen van protozoa is onder andere dat deze in lage aantallen aanwezig zijn in het water, maar daarnaast kan de grootte van een protozoa ook een rol spelen aangezien protozoa ongeveer 10x groter zijn dan bacteriën. Vaak zijn protozoa zoals *nanoflagellates* en *ciliophora* (trilhaardiertsjes) aanwezig in, respectievelijk,  $10^2$ - $10^3$  per ml en 1-10 per ml in veel aquatische omgevingen (Vives-Rego, 2000, Lindström, 2002). Deze aantallen zijn te laag om betrouwbare resultaten met flowcytometrie te kunnen verkrijgen. Mogelijk is een concentratiestap dus noodzakelijk.

*Ciliophora* kunnen worden gekleurd met de kleurstoffen PicoGreen, TO-PRO-1 en YO-YO-1 (Molecular Probes; Lindstrom, 2002 en Soudant, 2005). Een andere manier om ciliophora te kleuren is door gebruik te maken van het feit dat *ciliophora* relatief meer DNA hebben dan andere planktonische protozoa. De kleurstof DAPI (diamidiniophenyliondole) bindt aan DNA en de intensiteit van het fluorescentiesignaal zou voor *ciliophora* dan hoger moeten zijn dan voor andere planktonische protozoa. Voor deze kleuring is wel een andere lichtbron, namelijk een laser met UV licht, nodig aangezien het absorptiemaximum van DAPI bij 358 nm ligt (Lindström, 2002).

De protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia* worden veelvuldig geanalyseerd met flowcytometrie. Hierbij wordt gebruik gemaakt van anti-Cryptosporidium en anti-Giardia FITC conjugated monoclonal antibodies (MAB) specifiek voor oocysten en de cystewand. Deze protozoa kunnen worden gesorteerd waarna de identiteit met microscopie wordt bevestigd (Hammes, 2010 en Vesey, 1994).

Ook is er via verschillende leveranciers een anti-Protozoa TUBG1 antilichaam voor flowcytometrie op de markt die reageert met het gammatubulin van protozoa eiwit.

### 2.3 Biomassa-koolstof bepaling

De biomassaparameters ATP en flowcytometrie worden in dit onderzoek onder andere vergeleken met het koolstofgehalte in het water met micro-organismen. Dit wordt ook wel biomassakoolstof genoemd. De standaard koolstofbepaling van water met de daarin aanwezige organische deeltjes, word gedaan via de TOC bepaling. Met deze analyse wordt het totaal organische koolstof (TOC) in het water bepaald. Dit bestaat uit koolstof dat aanwezig is in micro-organismen, maar ook uit koolstof dat aanwezig is in ander organisch materiaal dat in het water aanwezig is. Door het koolstofgehalte in alleen het water te meten en dit te vergelijken met water waarin micro-organismen aanwezig zijn, is TOC mogelijk een goede manier om de hoeveelheid aanwezige biomassa, bestaande uit bijvoorbeeld bacteriën, protozoa, schimmels en gisten, te bepalen.

Rondvraag bij een aantal analytische, chemische laboratoria leidde niet tot een methode om op een andere manier het biomassakoolstofgehalte te bepalen. In oudere wetenschappelijke papers wordt wel een alternatieve methoden gebruikt. Hiervoor wordt het monster eerst gedroogd en wordt het drooggewicht bepaald (Bratbak *et al.*, 1984). Vervolgens wordt van

deze droge stof het koolstofgehalte bepaald. Daarnaast wordt van de matrix, bijvoorbeeld water of kweekmedium, de hoeveelheid zouten en mineralen bepaald. Met deze gegevens kan het koolstofgehalte van alleen de micro-organismen worden bepaald. Via deze methode is berekend dat ongeveer 50% van het drooggewicht van bacteriën wordt gevormd door koolstof. Dit percentage verschilt echter tussen de drie bacteriesoorten die zijn getest.

In Tabel 4 is een overzicht gegeven van het koolstofgehalte per cel van een aantal verschillende micro-organismen. Een *E. coli* cel heeft ongeveer 29,5 – 362,5 fg koolstof per cel. De detectiegrens van de TOC bepaling bij KWR is 0,2 mg C/l. Dit betekent dat er ongeveer  $5,5 \times 10^8$  –  $6,8 \times 10^9$  *E. coli* bacteriën of  $1,0 \times 10^6$  –  $5,6 \times 10^7$  schimmels aanwezig zouden moeten zijn in 1 liter water om een signaal te kunnen meten. Echter, voor een betrouwbaarder resultaat moeten de aantallen bacteriën of schimmels nog een factor tien hoger zijn.

TABEL 4. OVERZICHT VAN HET TOC-GEHALTE VAN VERSCHILLENDE MICRO-ORGANISMEN.

	Drooggewicht 1 cel (pg)	TOC per cel (pg C/cel)	Referenties
<b>Bacteriën</b>			
<i>E. coli</i>	31% van totaal gewicht	40-50% van drooggewicht	Bratbak, 1984
<i>E. coli</i> ATCC 23725	$179 - 725 \times 10^{-3}$		Delgado, 2013
<i>E. coli</i>	$1,17 - 83 \times 10^{-3}$	-	Loferer-Kröbsbacher, 1998
<i>E. coli</i>	$180 - 710 \times 10^{-3}$	$110 - 350 \times 10^{-3}$	Fagerbakke, 1996
<i>Pseudomonas putida</i>	-	$1,1 - 3,1 \times 10^{-1}$	Bratbak, 1985
<b>Protozoa</b>			
<i>Heterotrophic nanoflagellates</i>	5020		Bloem, 1988
<b>Schimmels</b>			
<i>Aspergillus niger</i>	-	13	Cheng, 2009
Mix van schimmels uit lucht	-	3,6 - 201	Cheng, 2009
Mix van schimmels uit allerlei milieus	-	38-57% van drooggewicht	Zhang, 2017
<b>Gisten</b>			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20-50	-	Delgado, 2013
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19-20	-	Mitchison, 1958

## 3 Experimenteel onderzoek - Materiaal en methoden

### 3.1 Inleiding

Uit de literatuurstudie is gebleken dat van de meeste micro-organismen waarmee in dit project wordt gewerkt, en van belang zijn voor de Nederlandse drinkwatersituatie, geen ATP-gehalte per cel beschikbaar is. Om de verschillende biomassamethoden met elkaar te vergelijken en zo het ATP-gehalte per cel te bepalen, is er voor gekozen om te starten met de standaard methoden die worden gebruikt door KWR. Voor de experimenten zijn micro-organismen, representatief voor de Nederlandse drinkwatersituatie, geselecteerd om zo'n breed mogelijk beeld te krijgen over de prestaties van de huidige methodieken bij verschillende micro-organismen.

### 3.2 Materiaal en Methoden

#### 3.2.1 Micro-organismen

In dit onderzoek zijn zeven verschillende micro-organismen geanalyseerd. Deze micro-organismen dienen als indicatororganisme en worden in dit onderzoek gebruikt als een representatief voorbeeld voor een bepaalde groep micro-organismen:

- *Aeromonas hydrophila*: representatief voorbeeld van gram-negatieve bacteriën. Gram-negatieve bacteriën zijn dominant aanwezig in het drinkwater.
- *Mycobacterium intracellulare*: Bacterie met een dikke en sterke celwand die niet permeabel is voor hydrofiele stoffen door de aanwezigheid en oriëntatie van speciale vetzuren en koolhydraatcomplexen in de celwand (Brennan, 2003; Jankute, 2015). Het is een representatief voorbeeld voor alle Mycobacterium-soorten, die in drinkwater worden aangetroffen, maar in veel lagere aantallen dan gram-negatieve bacteriën.
- *Bacillus subtilis*: Sporevormende, gram-positieve bacterie. Representatief voorbeeld voor gram-positieve bacteriën, die meestal in relatief lage aantallen in het drinkwater aanwezig zijn.
- *Aspergillus fumigatus*: representatief voorbeeld voor filamenteuze schimmels die algemeen in drinkwater voorkomt (BTO 2011.035, BTO 2014.015). *A. fumigatus* kan zowel sporen als hyphen vormen.
- Gist verkregen van het Centraalbureau voor Schimmelcultures: representatief voorbeeld voor gisten die algemeen in drinkwater voorkomt (Valster et al. 2009).
- *Acanthamoeba castellanii*: protozo die weinig voorkomt in het Nederlandse drinkwater (BTO 2011.035, BTO 2014.015, van der Wielen, 2013). Kan voorkomen als cyste en trophozoiet en is onderdeel van de groeicyclus van *Legionella* bacteriën. Representatief voorbeeld voor protozoën in drinkwater.
- *Vermamoeba* (voorheen *Hartmanella*) *vermiformis*: protozo die aanwezig is in het Nederlandse drinkwater en onderdeel is van de groeicyclus van *Legionella* bacteriën (Valster et al. 2009). Kan voorkomen als cyste en trophozoiet. Representatief voorbeeld voor protozoën in drinkwater.

### 3.2.2 Bereiding van stockoplossingen

Voor elk experiment zijn de micro-organismen vers opgekweekt op agarplaten (bacteriën, schimmels, gisten) of vloeibaar medium (protozoa). Vanuit dit materiaal is voor elk experiment een nieuwe stockoplossing gemaakt in fysiologisch zout (PBS, Tabel 5). Hierdoor verschilt de concentratie van ieder organisme per experiment.

TABEL 5. BEREIDING VAN STOCKOPLOSSINGEN VOOR EXPERIMENTEN.

	Micro-organisme	Oogsten	Stockoplossing
Bacteriën	<i>A. hydrophila</i>	5 kolonies resuspenderen in 5 ml PBS	2 ml suspensie in 2000 ml PBS (experimenten 1 en 2), of 1 ml suspensie in 100 ml PBS (experiment 3)
	<i>M. intracellulare</i>	5 kolonies resuspenderen in 5 ml PBS	
	<i>B. subtilis</i>	5 kolonies resuspenderen in 5 ml PBS	
Schimmel	<i>A. fumigatus</i>	10 ml PBS over de plaat spreiden, opvangen en afdraaien	
Gist		5 kolonies resuspenderen in 5 ml PBS	
Protozoa	<i>A. castellanii</i>	Vanuit de suspensie	
	<i>V. vermiformis</i>	Vanuit de suspensie	

In totaal zijn er drie experimenten uitgevoerd. De versheid van de cellen verschilt tussen de experimenten. De leeftijd van de cellen is in Tabel 6 weergegeven. Een langere opslagperiode van de micro-organismen (op agarplaat) bij 4°C kan de activiteit van de cellen beïnvloeden waardoor mogelijk het ATP-gehalte verandert en de kleurstoffen voor flowcytometrie en direct celtelling makkelijker of moeilijker kunnen worden opgenomen.

TABEL 6. LEEFTIJD VAN DE MICRO-ORGANISMEN DIE VOOR DE TESTEN ZIJN GEBRUIKT. DE GEVEEN PERIODE IS HET AANTAL DAGEN DAT DE AGARPLAAT MET MICRO-ORGANISMEN BIJ 4°C HEEFT GESTAAN VOORDAT DE EXPERIMENTEN ZIJN UITGEVOERD.

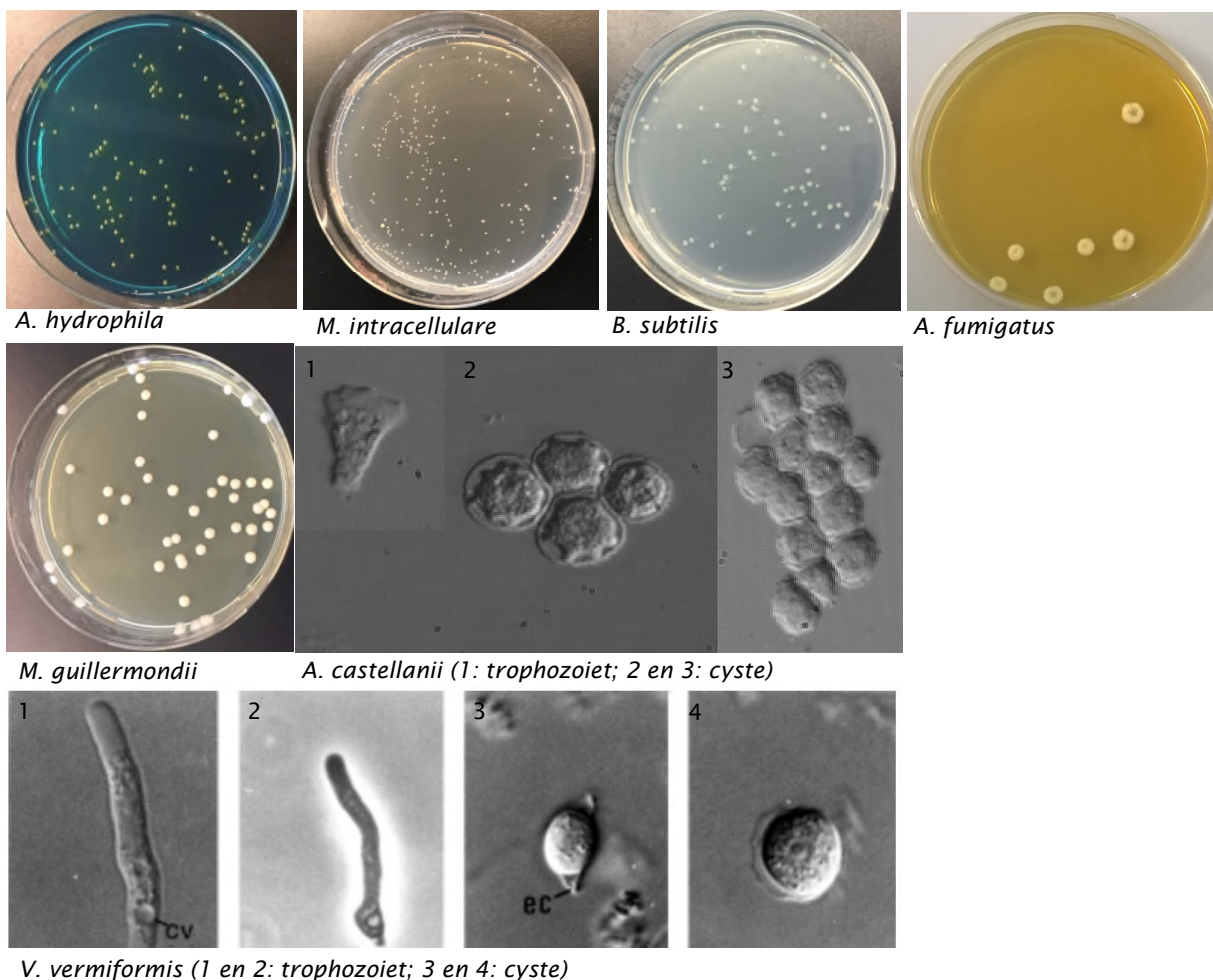
Micro-organisme	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
<i>A. hydrophila</i>	Ongeveer 1 week	Ongeveer 1,5 week	1 dag
<i>M. intracellulare</i>	1-2 dagen	Ongeveer 1 week	1 dag
<i>B. subtilis</i>	Ongeveer 1 week	Ongeveer 1,5 week	1 dag
<i>A. fumigatus</i>	1-2 dagen	0 dagen	1 dag
Gist	1-2 dagen	Ongeveer 1 week	1 dag
<i>A. castellanii</i>	0 dagen	0 dagen	0 dagen
<i>V. vermiformis</i>	0 dagen	0 dagen	0 dagen

### 3.2.3 Kweekbepaling

In Tabel 7 is van elk organisme aangegeven wat de medium- en kweekcondities zijn. De recepten van de verschillende media zijn te vinden in Bijlage III. In Figuur 5 is van alle bacteriën, schimmels en gisten een voorbeeld van de kweekplaat weergegeven. Het aantal *A. castellanii* en *V. vermiformis* kan niet met kweek op een agarplaat worden bepaald. In plaats daarvan zijn microscopische foto's van de protozoa in vloeibaar medium uit de literatuur gegeven.

TABEL 7. OVERZICHT MICRO-ORGANISMEN GEBRUIKT IN DIT ONDERZOEK. CBS: CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES. ATCC: AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION.

Micro-organisme	Stam en herkomst	Medium	Temperatuur (°C)	Incubatietijd
<i>A. hydrophila</i>	M800, KWR	ADA	30	24 uur
<i>M. intracellulare</i>	ATCC 13950	Middlebrook	37	5-12 dagen
<i>B. subtilis</i>	ATCC 23857	LLA	37	24 uur
<i>A. fumigatus</i>	KWR, drinkwaterisolaat	MEA	50	> 72 uur
Gist	CBS, drinkwaterisolaat	PDA	24-26	72 uur
<i>A. castellanii</i>	ATCC 30898	PYNFH	30	Elke 4 weken
<i>V. vermiformis</i>	ATCC 50256	PYNFH	25	doorzetten



FIGUUR 5. KWEEKPLATEN VAN DE MICRO-ORGANISMEN UIT TABEL 7. DE FOTO'S VAN DE PROTOZOA ZIJN AFKOMSTIG VAN DE WEBSITE [WWW.BMS.ED.AC.UK/RESEARCH/OTHERS/SMACIVER/ACANTHAMOEBA](http://WWW.BMS.ED.AC.UK/RESEARCH/OTHERS/SMACIVER/ACANTHAMOEBA) (*A. CASTELLANII*) EN UIT ALEXEY AND MICHEL, 1999 (*V. VERMIFORMIS*).

### 3.2.4 Adenosine trifosfaat (ATP)

#### 3.2.4.1 Experiment 1

In experiment 1 is de ATP concentratie bepaald volgens de standaardprocedure van KWR met Celsis reagentia. Daarnaast is de LuminUltra lysisbuffer gebruikt volgens de LuminUltra procedure, door het monster eerst te filtreren over een filter en vervolgens de lysisbuffer toe te voegen (het totaal volume is dan 10 ml). Van deze mix wordt vervolgens 100 µl, in duplo, gemeten met Celsis meetapparatuur. Alle monsters zijn gemeten met de Celsis meetapparatuur waarbij voor de Celsis-methode het substraat en enzym van Celsis is gebruikt en voor de LuminUltra methode alleen het enzym van Celsis. Daarom wordt ook dezelfde correctiefactor van Celsis gebruikt.

#### 3.2.4.2 Experiment 2 en 3

In experiment 2 en 3 is de ATP concentratie bepaald volgens de standaardprocedure met Celsis reagentia. Daarnaast is de LuminUltra lysisbuffer gebruikt door aan 100 µl monster, 100 µl LuminUltra lysisbuffer en 800 µl LuminUltra buffer toe te voegen. Vervolgens is 100 µl, in duplo, van deze mix gebruikt voor de meting. Alle monsters zijn gemeten met de Celsis meetapparatuur waarbij voor de Celsis-methode het substraat en enzym van Celsis is gebruikt en voor de LuminUltra methode alleen het enzym van Celsis.

De standaard ATP-analyse met Celsis reagentia is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-002. De detectiegrens is 1 ng/l.

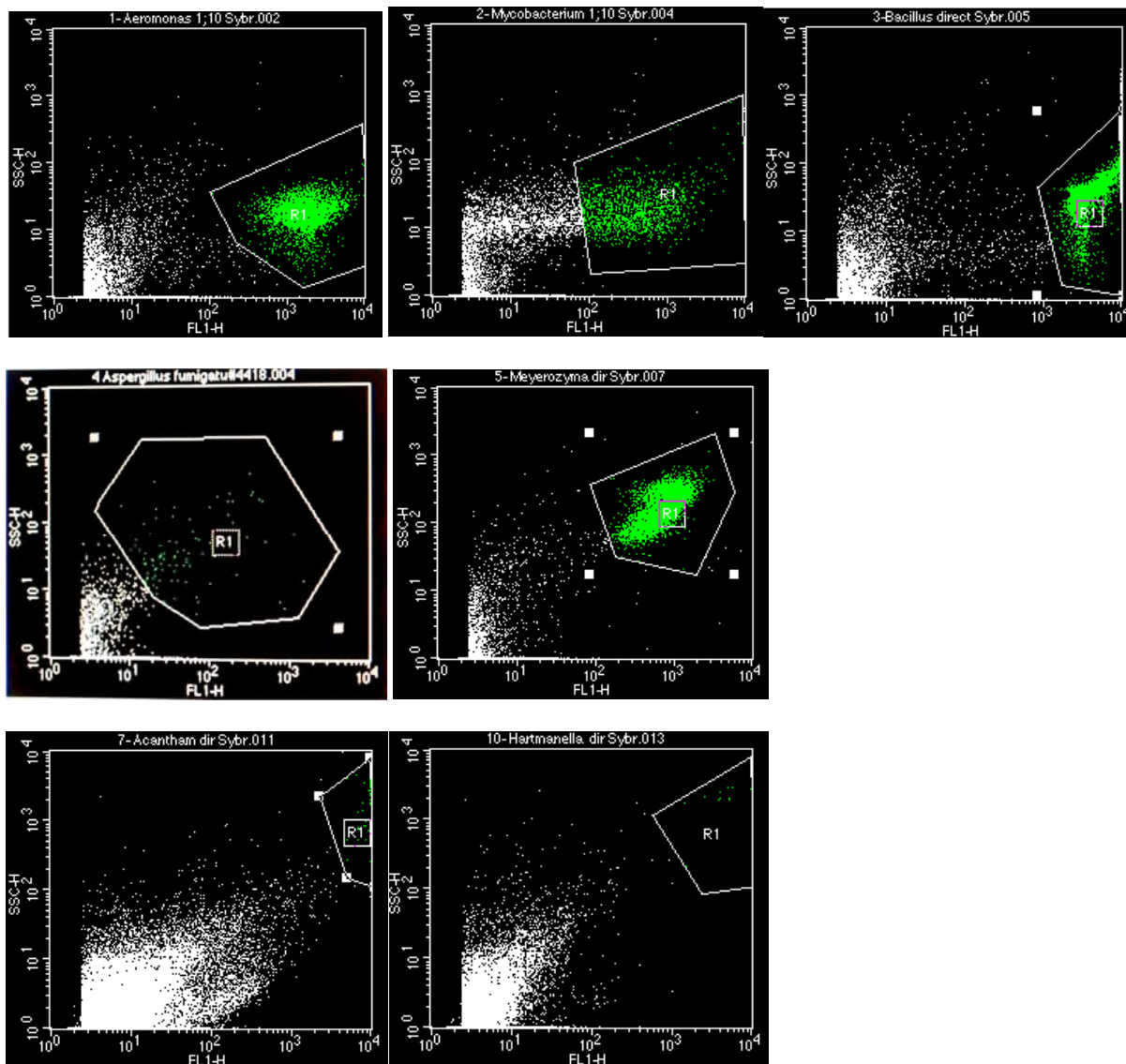
### 3.2.5 Flowcytometrie

#### 3.2.5.1 Methode

De flowcytometrie (FCM) analyse is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-071. Hiervoor is 1 ml van het monster gekleurd met SYBRgreen, een kleurstof dat aan DNA in cellen bindt. Na 10 minuten incubatie is het monster geanalyseerd. De bepalingsgrens in water is 1000 cellen per ml monster. Voor elk micro-organismen zijn indien nodig de gates opnieuw ingesteld. Het totaal aantal cellen is geteld. In Figuur 6 zijn de gates weergegeven die zijn gebruikt om het totaal aantal cellen (R1-gebied) van de ruis te onderscheiden.

#### 3.2.5.2 Toepasbaarheid op micro-organismen

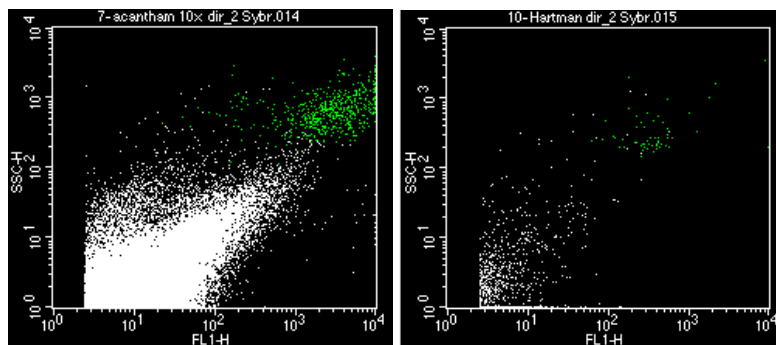
Tijdens de eerste test bleek dat met de standaard instellingen die voor drinkwatermonsters worden gebruikt de micro-organismen *A. fumigatus*, *A. castellanii* en *V. vermiformis* niet geanalyseerd kunnen worden. De protozoa zijn te groot waardoor ze buiten het scherm vallen en niet zichtbaar zijn in de resultaten. Daarnaast zijn de aantallen van deze micro-organismen laag wat de betrouwbaarheid van de resultaten beïnvloedt. De schimmel *A. fumigatus* vormt sporen en hyphen. De structuur van de hyphen, waarin een groot aantal sporen zitten, maakt dat deze niet betrouwbaar geteld kunnen worden met flowcytometrie. Om deze reden is de flowcytometrie bepaling na de eerste test niet meer ingezet voor *A. fumigatus*.



FIGUUR 6. VOORBEELDEN VAN GATES DIE ZIJN GEBRUIKT MET DE FLOWCYTOMETRIE. V.L.N.R. A. *HYDROPHILA*, *M. INTRACELLULARE*, *B. SUBTILIS*, *A. FUMIGATUS*, *GIST*, *A. CASTELLANII*, *V. VERMIFORMIS* DE (GROENE) CELLEN BINNEN DE GATE (R1) ZIJN HET TOTAAL AANTAL CELLEN.

Protozoa kunnen echter wel geteld worden als de instellingen worden aangepast. Hiervoor is de intensiteit van de laser en de gevoeligheid van de detectoren verlaagd. Cellen die zeer vermoedelijk de protozoa zijn kunnen dan wel geteld worden (zie Figuur 7).





FIGUUR 7. FLOWCYTOMETRIE MET AANGEPASTE INSTELLINGEN VAN *A. CASTELLANII* (LINKS) EN *V. VERMIFORMIS* (RECHTS) ZODAT DEZE MICRO-ORGANISMEN GEDETECTEERD KONDEN WORDEN. IN BIJLAGE IV ZIJN DE AANGEPASTE INSTELLINGEN GEGEVEN.

### 3.2.6 Directe celtelling

#### 3.2.6.1 Methode

Het totaal aantal van ieder getest micro-organisme in oplossing is bepaald via directe celtelling (DCT). Hiervoor zijn de cellen gekleurd met de fluorescente kleurstof acridineoranje dat wordt opgenomen door levende en dode cellen en aan DNA en RNA bindt, zodat het totaal aantal cellen wordt geteld.

Het (water)monster met daarin micro-organismen wordt over een zwart polycarbonaat filter (0,2  $\mu\text{m}$ ) gefiltreerd. Het filter met daarop de cellen wordt gedurende 5 minuten in een acridineoranjeoplossing geïncubeerd. Na een wasstap wordt het filter gedroogd en overgebracht op een objectglas. Hierna wordt van het preparaat met een fluorescentiemicroscopie het aantal fluorescerende cellen geteld en wordt het aantal bacteriën per ingezet volume berekend. Tevens zijn microscopische foto's gemaakt en deze zijn weergegeven in Bijlage I.

De DCT is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-013.

#### 3.2.6.2 Toepasbaarheid op micro-organismen

Tijdens de eerste test bleek dat van *A. fumigatus* naast de sporen ook de hyphen, als lange draden, zichtbaar zijn onder de microscoop. Hyphen kunnen uit meerdere cellen bestaan en kunnen ook meerdere sporen bevatten waardoor de DCT analyse niet betrouwbaar kan worden uitgevoerd. Het resultaat zal daardoor een onderschatting zijn van het totaal aantal aanwezige cellen. Om deze reden is de DCT bepaling na de eerste test niet meer ingezet voor *A. fumigatus*. Voor de overige micro-organismen waren er geen beperkingen. Opgemerkt moet worden dat het aantal cellen soms vrij laag was, wat de betrouwbaarheid van de telling beïnvloedt. Dit was met name het geval voor de protozoa, waarbij per microscopisch beeldveld slechts 0-3 cellen aanwezig waren. Ideaal voor een betrouwbare bepaling is ongeveer 50 cellen, wat voor de andere micro-organismen wel het geval was.

### 3.2.7 Biomassa koolstof bepaling

Het bepalen van het koolstofgehalte van de biomassa in water is nog niet eerder gedaan bij KWR. Gebaseerd op de beperkt beschikbare literatuur is het koolstofgehalte (TOC, Total Organic Carbon) op twee verschillende manieren bepaald:

- TOC in watermonsters: TOC wordt direct bepaald in watermonsters (60 ml) met en zonder gedoseerde micro-organismen.
- TOC in droge stof: Watermonsters (1 liter) met en zonder gedoseerde micro-organismen worden eerst ingedampt, daarna wordt het drooggewicht gemeten en wordt het TOC-gehalte van de droge stof bepaald.

Door het TOC-gehalte van water zonder gedoseerde micro-organismen en water met gedoseerde micro-organismen (zonder kweekmedium) met elkaar te vergelijken, is het TOC-gehalte dat wordt veroorzaakt door micro-organismen te berekenen.

Bij de TOC-bepaling wordt eerst het anorganisch koolstof verwijderd en vervolgens wordt het koolstof gemeten met behulp van NDIR detectie. Dit gebeurt door de monsters aan te zuren en door te blazen met lucht. Daarna wordt het monster in een verbrandingsbuis geïnjecteerd met behulp van een autosampler. De verbrandingsbuis is gevuld met een katalysator waarin het organisch koolstof bij een temperatuur van 680°C wordt omgezet in CO<sub>2</sub>. Het gevormde CO<sub>2</sub>-gas wordt, na afkoelen en drogen, met behulp van een niet-dispersieve infrarood detector gemeten. De hoeveelheid geabsorbeerde straling is een maat voor het TOC-gehalte in het monster. Vluchtige organische stoffen die kunnen worden uitgeblazen zoals benzeen, toluen, cyclohexaan en chloroform kunnen ontsnappen bij het doorblazen met lucht.

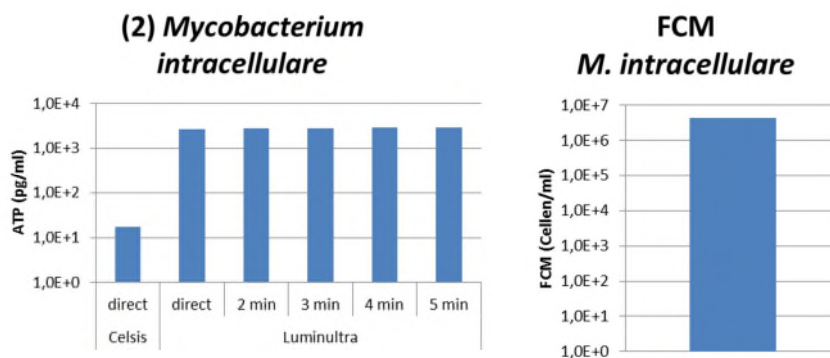
De TOC bepaling is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LAM-068. De detectiegrens van de methode is 0,2 mg C/l.

## 4 Experimenteel onderzoek - Resultaten

### 4.1 Vergelijking ATP analysemethoden

Het ATP-gehalte van de watermonsters met micro-organismen wordt op twee manieren bepaald: de standaardmethode van KWR waarbij alle reagentia van Celsis worden gebruikt (verder Celsis-methode genoemd), en de methode waarbij de lysisbuffer van LuminUltra en substraat en enzym van Celsis worden gebruikt (verder LuminUltra-methode genoemd). Voor *M. intracellulare* is de incubatietijd van de LuminUltra-methode getest en vergeleken met de Celsis-methode (Figuur 8). Hiervoor is alleen een stockoplossing met een hoog aantal cellen gemeten.

Er wordt een hogere ATP-concentratie gemeten met de LuminUltra-methode dan met de Celsis-methode. Een langere incubatietijd met de LuminUltra lysisbuffer in de LuminUltra-methode leidt echter niet tot hogere ATP-concentraties. In de vervollexperimenten is daarom geen aanvullende incubatietijd voor de lysisstap aangehouden in de LuminUltra methode. De incubatietijd met de Celsis lysisbuffer is niet gevarieerd. Hiervoor zijn de standaardinstellingen van de leverancier, 10 seconden incubatie, aangehouden.



FIGUUR 8 ATP METINGEN MET CELSIS- OF LUMINULTRA-METHODE OP *M. INTRACELLULARE* (LINKS). EEN STOCKOPLOSSING VAN *M. INTRACELLULARE* IS DIRECT GEMETEN OF NA 2, 3, 4 EN 5 MINUTEN INCUBATIE MET DE LYSISBUFFER VAN LUMINULTRA. FLOWCYTOMETRIE (FCM) ANALYSE VAN DE STOCKOPLOSSING (RECHTS).

### 4.2 Vergelijking biomassa analysemethoden op hoge aantallen micro-organismen

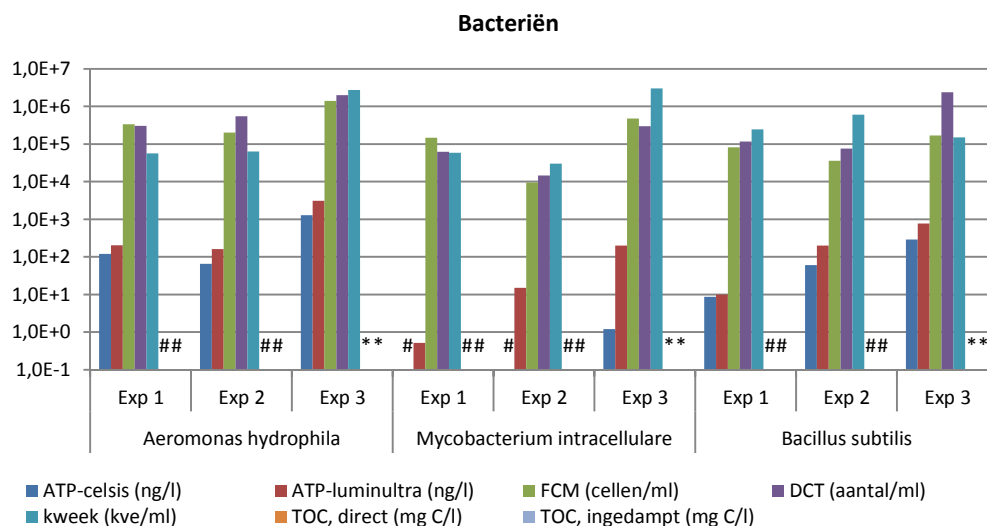
Zoals beschreven in hoofdstuk 3 is uit de eerste test gebleken dat voor sommige micro-organismen een aantal analyses niet uitvoerbaar zijn. In de vervollexperimenten zijn daarom niet alle analyses op alle micro-organismen uitgevoerd. In Tabel 8 is een overzicht gegeven van welke analyse op welke micro-organisme is uitgevoerd. De leeftijd van de cellen is in Tabel 6 gegeven.

TABEL 8. OVERZICHT ANALYSES OP DE VERSCHILLENDE MICRO-ORGANISMEN

	ATP	FCM	DCT	kweek	TOC
<i>A. hydrophila</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>M. intracellulare</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>B. subtilis</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>A. fumigatus</i>	✓			✓	✓
Gist	✓	✓	✓	✓	✓
<i>A. castellanii</i>	✓		✓		✓
<i>V. vermiformis</i>	✓		✓		✓

#### 4.2.1 Bacteriën

Voor alle bacteriesoorten is het ATP-gehalte bepaald met de LuminUltra methode hoger dan met de Celsis methode (Figuur 9). Voor *M. intracellulare* wordt er niet of nauwelijks ATP gemeten met de Celsis-methode. In de eerste twee experimenten met *A. hydrophila* geeft de kweek lagere aantallen cellen dan flowcytometrie en directe celtelling. In het derde experiment komen de *Aeromonas* resultaten tussen de kweek en de twee celtelmethoden goed overeen. Voor *M. intracellulare* is het beeld wisselend, waarbij de kweekmethode soms lagere (experiment 1) en soms hogere (experiment 2 en 3) aantallen geeft dan de twee celtelmethoden. Bij *B. subtilis* is in experiment 1 en 2 de kweek hoger dan de flowcytometrie en directe celtelling terwijl in het derde experiment de directe celtelling duidelijk hoger is. Het TOC-gehalte is voor alle drie de bacteriesoorten lager dan de detectiegrens.



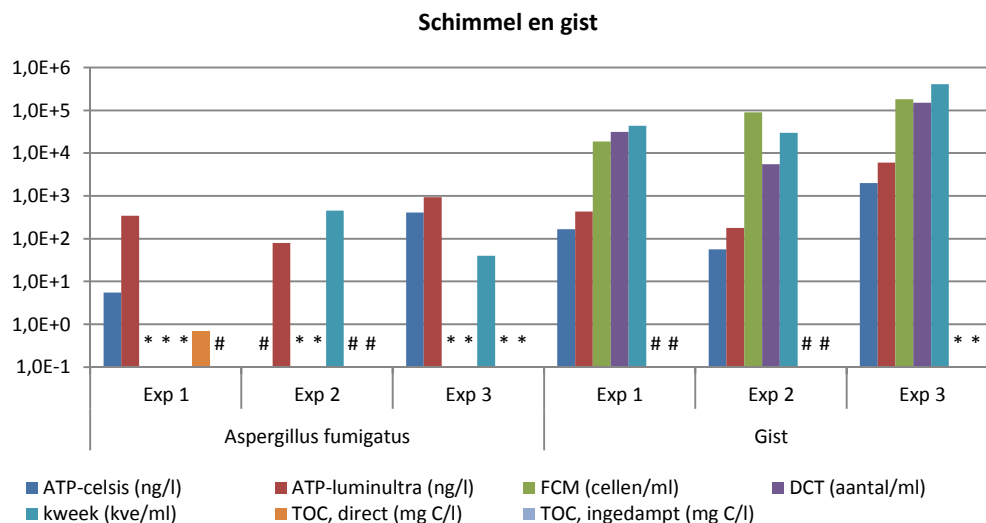
FIGUUR 9. RESULTATEN VAN DE BIOMASSAMETHODEN OP DE VERSCHILLENDE BACTERIËN. IN DE LEGENDE IS DE EENHEID VAN DE INDIVIDUELE PARAMETERS GEGEVEN. \*: NIET INGEZET OF RESULTAAT NIET BETROUWBAAR. #: RESULTAAT ONDER DE DETECTIEGREN. DE EXACTE GETALLEN ZIJN GEGEVEN IN BIJLAGE II.

#### 4.2.2 Filamenteuze schimmel en gist

Vergelijkbaar met de resultaten met de bacteriën geeft de LuminUltra-methode ook een hoger ATP-gehalte voor de filamenteuze schimmel en gist dan met de Celsis-methode (Figuur 10). Voor *A. fumigatus* zijn kweekresultaten beschikbaar, maar geen flowcytometrie of directe celtelling. Het aantal gekweekte cellen van experiment 3 was lager dan van de eerste twee experimenten. In het derde experiment zijn cellen gebruikt van *A. fumigatus* die langzamer zijn gaan groeien dan normaal (7 i.p.v. 3 dagen). Dit duidt erop dat de opkweek van *A. fumigatus* tijdens experiment 3 niet goed is gegaan waardoor deze waarde een onderschatting is.

Voor de gist geeft de kweekmethode in experiment 1 en 3 licht hogere aantallen dan met flowcytometrie en directe celtelling, terwijl in experiment 2 de hoogste aantallen werden waargenomen met flowcytometrie. Tijdens experiment 1 en 3 is de gist nog vers (1-2 dagen), terwijl deze in experiment 2 oud is (1 week). Het is waarschijnlijk dat een deel van de oude cellen zijn afgestorven, waardoor de kweekbare aantallen in experiment 2 lager liggen dan het aantal getelde cellen met flowcytometrie. Waarom de aantallen in experiment 2 geteld met de directe celtelling lager liggen is onduidelijk.

TOC is eenmaal op een lage concentratie gemeten voor *A. fumigatus*. De overige metingen voor *A. fumigatus* en de gist zijn lager dan de detectiegrens.

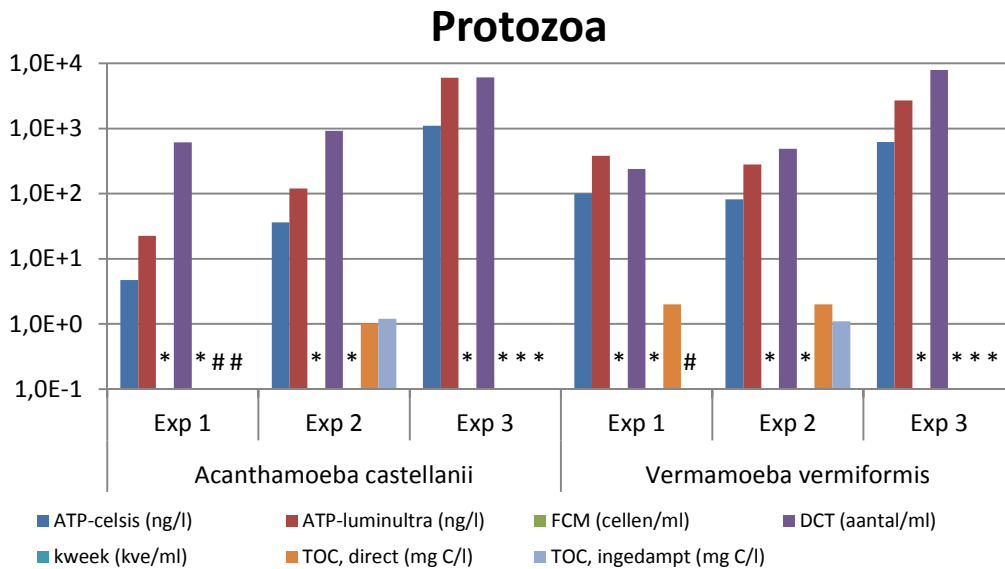


FIGUUR 10. RESULTATEN VAN DE BIOMASSAMETHODEN OP EEN SCHIMMEL EN GIST. IN DE LEGENDE IS DE EENHEID VAN DE INDIVIDUELE PARAMETERS GEGEVEN. \*: NIET INGEZET OF RESULTAAT NIET BETROUWBAAR. #: RESULTAAT ONDER DE DETECTIEGREN. DE EXACTE GETALLEN ZIJN GEGEVEN IN BIJLAGE II.

#### 4.2.3 Protozoa

Bij beide protozoa geeft de ATP-bepaling met de LuminUltra-methode een hoger ATP-gehalte dan met de Celsis-methode. Voor beide protozoa wordt met directe celtelling aantallen getallen, maar deze aantal cellen waren vrij laag (0-3 cellen per microscopisch beeld). De protozoa zijn niet te tellen met flowcytometrie omdat ze te groot zijn waardoor ze buiten het scherm vallen. Voor *A. castellanii* wordt in het tweede experiment TOC gemeten, maar niet in het eerste experiment. Bij *V. vermiformis* wordt TOC direct zowel in het eerste en tweede

experiment gemeten. TOC ingedampt is alleen in het tweede experiment boven de detectielimiet.



FIGUUR 11. RESULTATEN VAN DE BIOMASSAMETHODEN OP VERSCHILLENDE PROTOZOA. IN DE LEGENDA IS DE EENHEID VAN DE INDIVIDUELE PARAMETERS GEGEVEN. \*: NIET INGEZET OF RESULTAAT NIET BETROUWBAAR. #: RESULTAAT ONDER DE DETECTIEGREN. EXACTE GETALLEN ZIJN GEGEVEN IN BIJLAGE II.

## 5 Discussie

Het doel van dit onderzoek was om de betrouwbaarheid van de ATP-analyse en flowcytometrie telling voor het meten en kwantificeren van de totale biomassa, en biomassa van bacteriën, protozoen, schimmels en gisten vast te stellen. Hiervoor zijn micro-organismen gekozen die dienen als indicatororganisme voor verschillende groepen micro-organismen: gram-negatieve bacteriën (*A. hydrophila*), gram-positieve bacteriën (*B. subtilis*), bacteriën met een dikke en stevige celwand (*M. intracellulare*), filamenteuze schimmels (*A. fumigatus*), gisten en protozoa (*V. vermiformis*, *A. castellanii*). Omdat er vanuit wordt gegaan dat iedere soort representatief is voor de desbetreffende groep micro-organismen zal daarom in de discussie worden gesproken over de groep micro-organismen en niet over de individuele soorten.

### 5.1 Toepassing van analysemethoden op micro-organismen

De gebruikte analysemethoden zijn in meer of mindere mate goed uitvoerbaar voor de verschillende micro-organismen. De enige methode die voor geen enkel micro-organisme goed toepasbaar is, is de TOC-bepaling zowel direct op het watermonster als na indamping. Omdat één cel weinig koolstof bevat, zijn zeer hoge aantallen cellen nodig om het koolstofgehalte boven de detectiegrens uit te laten komen. Dit is onder rijke kweekcondities in het laboratorium of in eutrofe milieus (bv maag/darmkanaal) haalbaar, maar dit is geen realistische situatie in het oligotrofe drinkwatermilieu.

#### 5.1.1 Bacteriën

Met flowcytometrie en directe celtelling wordt het totaal aantal cellen geteld, terwijl met de kweekmethode alleen levende en kweekbare cellen worden geteld. Dit betekent dat de kweek gelijk of lager zou moeten liggen dan de andere twee methoden. De eerste twee experimenten met *A. hydrophila* lieten lagere aantallen zien dan met de twee celtelmethoden, maar bij het derde experiment waren de aantallen vergelijkbaar. Mogelijk worden de lagere aantallen gekweekte *A. hydrophila* veroorzaakt doordat in de eerste twee experimenten de gebruikte cellen ouder zijn, waardoor een deel van de cellen zijn afgestorven. Hierdoor is een deel van deze cellen daarom niet kweekbaar, maar nog wel aan te kleuren voor de flowcytometrie en directe celtelling. In experiment 3 zijn verse cellen gebruikt, waardoor dit fenomeen niet optrad in experiment 3. Zowel voor *M. intracellulare* als *B. subtilis* zijn de kweekresultaten hoger dan DCT en FCM wat wordt veroorzaakt doordat beide bacteriën een andere celwandstructuur hebben dan *A. hydrophila*. *M. intracellulare* heeft een dikke celwand die niet permeabel is voor hydrofiele stoffen, en *B. subtilis* is een gram-positieve bacterie, waardoor het naar verwachting moeilijker is voor de kleurstof om in de cel door te dringen en aan het DNA te hechten. Voor *B. subtilis* geldt daarbij ook dat in experiment 1 en 2 de cellen ouder waren en sporevorming plaats vindt. De sporen zijn wel kweekbaar, maar het DNA kan zeer waarschijnlijk niet of zeer beperkt worden gekleurd met de SYBR green kleurstof. Voor zowel *M. intracellulare* als *B. subtilis* is de fluorescente kleurstof die voor de celtelling wordt gebruikt dus waarschijnlijk onvoldoende opgenomen door alle cellen en/of sporen, waardoor deze aantallen lager liggen dan de gekweekte aantallen.

Samengevat waren alle methoden, met uitzondering van de TOC-bepaling, goed toepasbaar op gram-negatieve bacteriën. Voor gram-positieve bacteriën was de ATP-methode goed

toepasbaar, maar wordt de Celsis ATP methode waarschijnlijk beïnvloed door een dikke celwand en spore vorming waardoor het ATP gehalte onderschat wordt (of dit ook voor LuminUltra geldt kan niet worden vastgesteld aan de hand van deze resultaten). De betrouwbaarheid van de resultaten met de kweekmethode hangt af van de versheid van de cellen, terwijl de directe celtelling en flowcytometrie waarschijnlijk beïnvloed worden door sporevorming omdat deze niet of minder goed worden meegenomen in de kwantificering. Door sporevorming lijkt de kleurstof niet of in mindere mate door te dringen in de cellen waardoor het niet aan het DNA kan binden. De sporen kunnen echter bij de kweekmethode wel tot ontwikkeling komen en een kolonie vormen. Hierbij dient wel opgemerkt te worden dat de meeste gram-positieve bacteriën geen sporevormers zijn, dus dit aspect treedt alleen op voor enkele specifieke subgroepen (met name soorten die behoren tot *Bacillus* en *Clostridium*) van de gram-positieve bacteriën. Daarnaast bevat drinkwater voornamelijk gram-negatieve bacteriën, waardoor het belang van (sporevorming van) gram-positieve bacteriën op de resultaten van echte drinkwatermonsters beperkt is (van der Kooij & van der Wielen, 2014). Om de biomassa in Nederlands drinkwater te bepalen zijn de resultaten van gram-negatieve bacteriën meer van toepassing op de praktijksituatie dan de resultaten van gram-positieve bacteriën.

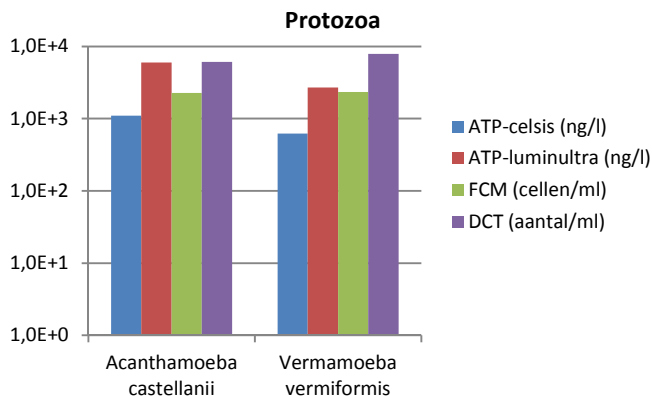
### 5.1.2 Schimmels

De vorming van hyphen door filamenteuze schimmels maakt dat flowcytometrie en directe celtelling niet betrouwbaar kunnen worden uitgevoerd, doordat deze hyphen niet goed worden gedetecteerd (flowcytometrie) of niet goed geteld kunnen worden (directe celtelling). In één hyphe kunnen ook meerdere sporen aanwezig zijn wanneer een sporendoesje is gevormd. Deze individuele sporen zijn echter niet telbaar met flowcytometrie of directe celtelling, waardoor het resultaat een onderschatting is van de werkelijkheid. Met kweek kunnen de individuele hyphen beter aangetoond worden, maar het is mogelijk dat één kolonie uit meerdere *A. fumigatus* cellen is gevormd die dicht bij elkaar in één hyphe zitten, waardoor ook kweek geen betrouwbare aantallen oplevert. De biomassa van *A. fumigatus* kan wel worden bepaald met de ATP-methode, maar daarbij wordt wel verschil waargenomen tussen de twee ATP-methoden (zie ook paragraaf 5.2). Beide ATP-methoden, flowcytometrie en directe celtelling zijn goed toe te passen op gistcellen.

### 5.1.3 Protozoa

Voor de protozoa is de kweekmethode niet mogelijk en geeft flowcytometrie alleen een betrouwbaar resultaat als de instellingen worden aangepast. Met de standaardinstellingen om bacteriën te tellen, zijn protozoa niet of nauwelijks te detecteren in watermonsters omdat de cellen te groot zijn. Door het verlagen van de intensiteit van de lasers en de gevoeligheid van de detectoren zijn protozoa wel te meten met flowcytometrie (Figuur 12). De celaantallen zijn voor beide protozoa lager dan bij de directe celtelling. Een kanttekening bij beide celtelmethode is dat voor flowcytometrie en directe celtelling voldoende cellen in het monster aanwezig dienen te zijn om een betrouwbaar resultaat te krijgen. Dergelijke aantallen worden in drinkwatermonsters echter niet waargenomen.





FIGUUR 12. RESULTATEN VAN DE BIOMASSAMETHODEN OP VERSCHILLENDE PROTOZOA VAN EXPERIMENT 3. DE FLOW CYTOMETRIE INSTELLINGEN ZIJN AANGEPAST ZOALS BESCHREVEN IN DE TEKST. IN DE LEGENDA IS DE EENHEID VAN DE INDIVIDUELE PARAMETERS GEGEVEN.

## 5.2 Celsis vs LuminUltra

Uit dit onderzoek blijkt dat de Celsis-methode een onderschatting van de ATP concentratie van micro-organismen geeft vergeleken met de LuminUltra-methode. Het verschil tussen deze twee methoden is de gebruikte lysisbuffer, waarbij de Celsis lysis buffer (Celsis-methode) en LuminUltra lysis buffer (LuminUltra-methode) zijn gebruikt. In drinkwater zijn de meeste bacteriën gram-negatief, hiervoor geeft de LuminUltra-methode gemiddeld een 15 keer hoger ATP gehalte dan de Celsis-methode. Dit verschil geeft een indicatie van de onderschatting van de ATP-concentratie met de Celsis-methode. Om een betrouwbaarder beeld te krijgen van deze onderschatting zijn echter ATP-metingen met beide methoden nodig op drinkwatergerelateerde monsters. In het algemeen kan echter worden gesteld dat het ATP-gehalte structureel onderschat wordt en geen enkele methode de echte waarde zal beschrijven, maar altijd een benadering zal zijn. De onderschatting die wordt waargenomen is waarschijnlijk een vast percentage, dus de gemeten ATP concentratie met Celsis is zeer waarschijnlijk wel een goede indicatie voor de echte ATP concentratie. Dit moet echter wel nog met onderzoek worden vastgesteld.

Tevens kan de vraag worden gesteld of de ATP-bepaling voortaan met LuminUltra-methode in plaats van de Celsis-methode uitgevoerd kan worden. Door de jaren is bij KWR en sommige drinkwaterlaboratoria een grote database opgebouwd van ATP-concentraties gemeten met de Celsis-methode. Deze database is vervolgens gebruikt om richtwaarden (bv biofilmvormingssnelheid van  $10 \text{ pg ATP cm}^{-2} \text{ dag}^{-1}$ ) of wettelijke normen (bv biomassa-productiepotentie materialen van  $1000 \text{ pg ATP cm}^{-2}$ ) af te leiden. Daarnaast is de methode ook opgenomen in een Europese standaard (NEN-EN 16421). Hierdoor is het erg moeilijk om over te stappen van de Celsis-methode naar de LuminUltra methode. Om na te gaan of de verschillen tussen de Celsis- en LuminUltra-methode constant zijn in allerlei soorten drinkwatermonsters, is het raadzaam om minimaal honderd drinkwater- en 100 biofilmmonsters te meten met de Celsis- en LuminUltra-methode. Wanneer de verschillen constant zijn, is een eventuele overstap naar de LuminUltra-methode gemakkelijker, omdat in dat geval de richtlijnen kunnen worden gecorrigeerd met een vaste factor.

### 5.3 ATP-gehalte per cel

Op basis van de resultaten kan het ATP-gehalte per cel voor elk soort micro-organisme worden bepaald. In Tabel 9 is het gemiddelde ATP-gehalte per cel berekend, met daarbij de standaardafwijking (SD). Het gemiddelde is bepaald uit drie experimenten, met uitzondering van de micro-organismen waarbij het ATP-gehalte onder de detectiegrens ligt of de celtelmethode niet drie keer is uitgevoerd of een betrouwbaar resultaat is verkregen. Daarnaast zijn voor sommige micro-organismen niet alle celtelmethode (kweek, DCT, FCM) uitgevoerd waardoor een vergelijking tussen de micro-organismen met dezelfde celtelmethode niet mogelijk is. Voor de bacteriën en de gist is het ATP-gehalte per cel bepaald door de resultaten van de flowcytometer te gebruiken. Voor de filamenteuze schimmel was dit de kweekresultaten, terwijl voor de protozoa de resultaten van de directe celtelling is gebruikt. De resultaten tussen de drie experimenten variëren soms sterk, wat resulteert in een hoge standaarddeviatie. Hierdoor kunnen de resultaten alleen worden gebruikt als een indicatie van de hoeveelheid ATP per cel. In Tabel 9 is bij elk micro-organisme aangegeven of 1 cel in 100 µl (gelijk aan 10 cellen in 1 ml) gedetecteerd kunnen worden met de ATP-bepaling, uitgaande van de detectiegrens van 1 pg/ml.

TABEL 9. ATP-GEHALTE PER CEL (FG ATP/CEL) VOOR DE VERSCHILLENDE MICRO-ORGANISMEN. HET ATP-GEHALTE IS DAARBIJ BEPAALD MET DE CELSIS-METHODE OF DE LUMINULTRA-METHODE. DE HOEVEELHEID ATP PER CEL IS BEREKEND OP BASIS VAN HET AANTAL GETELDE CELLEN VOLGENS ÉÉN VAN DE CELTELMETHODES (FCM, KWEK, DCT).

Organisme	Indicator voor	Telmethode	N	KWR (Celsis)			LuminUltra		
				fg ATP/cel	SD	Detectie	fg ATP/cel	SD	Detectie
<i>A. hydrophila</i>	Gram-negatief	FCM	3	0,53	0,34	Nee	1,20	0,88	Nee
<i>M. intracellulare</i>	Stevige celwand	FCM	2	0,00054	0,0028	Nee	0,67	0,82	Nee
<i>B. subtilis</i>	Gram-positief	FCM	3	1,17	0,92	Nee	3,42	2,90	Nee
<i>A. fumigatus</i>	Filamenteuze schimmel	kweek	1	10250	-	Nee	11712	16317	Nee
Gist	Gist	FCM	3	6,89	5,53	Nee	19,4	15,9	Nee
<i>A. castellanii</i>	Protozoa	DCT	3	75,8	91,89	Nee	383,9	521,47	Ja
<i>V. vermiformis</i>	Protozoa	DCT	3	220,8	175,32	Ja	832,2	660,58	Ja

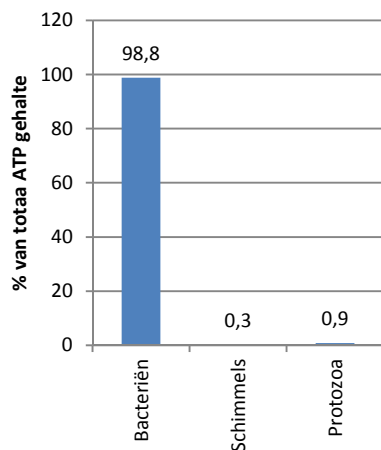
Het ATP-gehalte per cel voor de gram-negatieve en gram-positieve bacteriën liggen in dezelfde orde grootte als resultaten uit de literatuur waarbij bacteriën in een rijk medium zijn opgekweekt (Tabel 2 en Tabel 3). Het ATP-gehalte per cel van *Aeromonas* is echter wel een meer dan factor 2 lager dan het ATP-gehalte per cel van *Bacillus*. Dit laat zien dat de hoeveelheid actieve biomassa in een levende cel tussen bacteriesoorten kan verschillen (in dit onderzoek lag het aantal kweekbare cellen en totaal aantal cellen geteld met FCM namelijk in dezelfde range), zoals ook is aangetoond door Karl (1980). Dit betekent dat met celaantallen minder betrouwbaar de hoeveelheid actieve biomassa kan worden bepaald, zoals ook in het tekstboek over microbiologie voor microbiologiestudenten is opgenomen (Schlegel, 1986). Het ATP-gehalte per cel voor de twee geteste bacteriesoorten is beduidend hoger dan in bacteriën die uit een drinkwatermilieu afkomstig zijn (0,017 fg ATP/cel; van der Wielen & van der Kooij, 2010), wat waarschijnlijk wordt veroorzaakt doordat de geteste bacteriesoorten onder rijke condities zijn opgekweekt. Het hier berekende ATP-gehalte per cel voor schimmels is minder betrouwbaar omdat hiervoor de resultaten uit slechts één experiment zijn gebruikt en de aantallen cellen niet betrouwbaar kon worden bepaald. De

berekende ATP per cel is vele malen hoger dan wat in de literatuur beschikbaar is (0,609 – 3140 fg ATP/cel; Tabel 3). Het ATP-gehalte per cel van de in onze studie gebruikte gist valt binnen de waarden die in de literatuur zijn gepubliceerd (1,27 – 5070 fg ATP/cel; (Tabel 3), maar ook daar is de spreiding groot. Voor de protozoa is de spreiding in het ATP-gehalte per cel dat is gepubliceerd in de literatuur erg groot en deze is waarschijnlijk sterk afhankelijk van het soort protozo. De hier berekende waarde voor ATP/cel ligt wel in de range die in de literatuur wordt aangegeven (10,7 – 36700 fg ATP/cel; Tabel 3).

#### 5.4 Bijdrage van micro-organismen aan het ATP gehalte van drinkwatermonsters

Met de hierboven berekende ATP-gehalten per cel van de verschillende soorten micro-organismen is berekend wat de percentuele bijdrage is van bacteriën, schimmels/gisten, en protozoa aan het totale ATP gehalte van een drinkwatermonster (Figuur 13).

Om deze percentages te kunnen berekenen zijn de volgende aantallen in drinkwater aangehouden: bacteriën  $5 \times 10^4$  N/ml, schimmels  $1 \times 10^4$  N/l, protozoa 1560 N/l. De bacterie-aantallen zijn daarbij een gemiddelde van de aantallen die zijn gerapporteerd in eerdere studies (BTO 2014.015), de schimmel-aantallen zijn gebaseerd op gemiddelde genkopieaantallen van schimmels die in drinkwater zijn aangetroffen (BTO 2014.015) en aanname van 50 genkopieën per cel (van der Wielen, 2013) en de protozoa aantallen zijn gebaseerd op het onderzoek van Rinske Valster (Valster, 2009). Deze gegevens zijn gecombineerd met de ATP-gehalten per cel uit paragraaf 5.2. De resultaten van deze berekening laten zien dat het ATP gehalte in drinkwater voornamelijk wordt bepaald door bacterieel ATP (98,8%) en dat het ATP van ieder van de andere micro-organismen een minimale bijdrage leveren (<1%).



FIGUUR 13. PERCENTUELE BIJDRAGE VAN BACTERIËN, SCHIMMELS/GISTEN, VERMAMOEBE EN ALLE PROTOZOA AAN HET TOTALE ATP-GEHALTE VAN EEN DRINKWATERMONSTER.

Analyse van ATP in drinkwatermonsters heeft laten zien dat in 1 op de 10 à 20 drinkwatermonsters de ATP concentratie soms afwijkend hoog is (> 10 ng ATP/l boven het gemiddelde, gemeten met de Celsis-methode) (BTO 2009.044). De mogelijke verklaring die hiervoor is gegeven is dat de toevallige aanwezigheid van één protozo- cel in het watermonster een dergelijke verhoging laat zien. Tabel 10 laat, op basis van beide ATP-methoden, zien hoeveel cellen per ml van ieder organisme nodig zijn om het ATP-gehalte met 10 ng/l te laten stijgen. Uit de resultaten blijkt dat met de Celsis-methode er 45 tot 132

protozo-cellen/ml nodig zijn om een verhoging van 10 ng/l ATP te krijgen. Dit laat zien dat de genoemde verklaring, dat een enkele protozocel verantwoordelijk is voor de afwijkende ATP-concentratie, niet klopt. Er zijn meerdere mogelijke opties om een afwijkend hoge ATP concentratie te verklaren, b.v. een stukje losgekomen biofilm of gesuspenderde deeltjes met daaraan gehechte biomassa en ATP. Het blijft echter onduidelijk wat de oorzaak is van een afwijkend hoge ATP concentratie in drinkwater. Hetzelfde geldt voor gisten, waarvan meer cellen nodig zijn om de verhoging in het ATP-gehalte te kunnen verklaren.

TABEL 10. HET AANTAL BENODIGDE CELLEN PER ML OM HET ATP-GEHALTE MET 10 NG/L TE LATEN STIJGEN. DIT IS OP BASIS VAN BEIDE ATP-METHODEN BEREKEND.

		KWR (Celsius)	LuminUltra
<i>A. hydrophila</i>	Gram-negatief	18.697	8.313
<i>B. subtilis</i>	Gram-positief	8.552	2.922
Gist	Gist	1.452	516
<i>A. castellanii</i>	Protozoa	132	26
<i>V. vermiformis</i>	Protozoa	45	12

### 5.5 Toepasbaarheid van ATP en flowcytometrie om de biomassa van drinkwater te bepalen

Uit dit onderzoek blijkt dat de huidige ATP-methode van Celsis en de ATP-methode van LuminUltra ATP uit bacteriën, filamenteuze schimmels, gisten en protozoa kunnen meten. Uit de resultaten is wel duidelijk geworden dat de huidige Celsis-methode niet al het ATP uit de cellen vrijmaakt.

Met de huidige flowcytometrie methode en instellingen worden alleen bacteriën en gisten geteld. Als de instellingen worden aangepast kunnen echter ook protozoa worden geteld. Doordat de resultaten echter hebben laten zien dat de biomassa in drinkwater voornamelijk door bacteriën wordt bepaald, zal het missen van protozoa en filamenteuze schimmels weinig invloed hebben op de aantallen micro-organismen die met flowcytometrie in drinkwater worden geteld. Een nadeel van de flowcytometrie (en directe celtelling) is echter wel dat er geen onderscheid wordt gemaakt tussen grote en kleine bacteriecellen in het aantal cellen dat geteld wordt. Er kan mogelijk wel verschil zijn in de intensiteit van de fluorescentie tussen verschillende bacteriecellen, maar van deze gegevens wordt minder gebruik gemaakt en de betrouwbaarheid daarvan is ook onduidelijk. Zo lieten de resultaten van deze studie bijvoorbeeld zien dat de bacteriesoort *B. subtilis* twee keer zoveel ATP per cel bevat dan de bacteriesoort *A. hydrophila*. Wanneer in monster A evenveel cellen aanwezig zijn als *A. hydrophila* in monster B, dan zullen flowcytometrieresultaten aangeven dat de celaantallen gelijk zijn tussen beide monsters, terwijl de actieve biomassa in dat geval in monster A twee keer zo hoog is. Het is niet ondenkbaar dat dit soort verschillen tussen biomassa en celaantallen ook tussen verschillende drinkwatermonsters kunnen optreden. Het is echter aannemelijk dat flowcytometrie wel goed toepasbaar is in het vergelijken van drinkwatermonsters afkomstig uit één distributiegebied, aangezien de samenstelling van de bacteriepopulatie niet veel verandert tijdens transport in het distributiesysteem (Roeselers et al., 2015). Hierdoor zullen de verhoudingen tussen grote en kleine cellen zijn binnen het distributiegebied van één pompstation vermoedelijk redelijk constant zijn, ook omdat de voedingsomstandigheden binnen een distributiesysteem gelijk zal zijn. Veranderingen in celaantallen en/of ATP binnen een distributiegebied zullen daardoor zeer waarschijnlijk het

gevolg zijn van een storing in bijvoorbeeld de zuivering of het distributienet en kunnen daardoor zowel met ATP-metingen als flowcytometrie worden opgemerkt. Drinkwatermonsters afkomstig uit verschillende distributiegebieden kunnen echter minder goed met elkaar vergeleken worden met flowcytometrie omdat de samenstelling van de bacteriepopulatie tussen distributiegebieden verschilt (Roeselers et al., 2015) alsook de biologische stabiliteit van het water. Beide aspecten kunnen een effect hebben op de celgrootte en dus het ATP-gehalte per cel in het drinkwater. In dat geval is ATP dus een betrouwbaardere maat voor de hoeveelheid biomassa in het water dan flowcytometrie. De combinatie van ATP en flowcytometrie, om zo het ATP-gehalte per cel te bepalen, kan wel interessant zijn voor sommige onderzoeksdoeleinden.

## 6 Conclusies en aanbevelingen

### 6.1 Conclusies

Beide ATP-methoden (Celsis-methode en LuminUltra-methode) meten ATP van alle geteste micro-organismen, dus de toegepaste ATP-methode in drinkwater zal het ATP bepalen van bacteriën, schimmels en protozoa.

ATP in drinkwater wordt voor meer dan 98% bepaald door bacterieel ATP, terwijl de bijdrage van schimmels en protozoa minder dan 1% is, dus de bijdrage van schimmels en protozoa aan de microbiële biomassa in drinkwater is beperkt.

De lysisbuffer van Celsis maakt minder ATP vrij uit cellen van bacteriën, schimmels en protozoa dan de lysisbuffer van LuminUltra. Doordat tot nu toe de lysisbuffer van Celsis wordt gebruikt door KWR om het ATP-gehalte in drinkwater en/of biofilms te meten, zijn de gemeten ATP-concentraties een onderschatting van de daadwerkelijke ATP-concentratie in het drinkwatermilieu.

De af en toe afwijkende hoge ATP-concentratie die in een drinkwatermonster wordt gemeten, wordt niet veroorzaakt door de aanwezigheid van een enkele gist en/of protozo. Er zijn meerdere verklaringen voor deze verhoging, maar de precieze reden voor dergelijke incidentele afwijkende hoge ATP-concentratie blijft onduidelijk.

Protozoën (te groot) en schimmels (aanwezigheid van hyphen) worden niet geteld met het standaardprotocol van KWR voor flowcytometrie, terwijl bacteriën en gisten wel worden geteld met het standaardprotocol. Protozoa zijn telbaar met flowcytometrie, maar de instellingen van de flowcytometer moeten daarvoor worden aangepast. Bacteriën, gisten en protozoa kunnen worden geteld met het standaardprotocol van KWR voor de directe celtelling, maar door de lage aantallen gisten en protozoa in drinkwater, zijn de aantallen geteld met flowcytometrie en directe celtelling minder betrouwbaar. Doordat bacteriën meer dan 98% van de biomassa uitmaken in drinkwater, is flowcytometrie en directe celtelling geschikt om het totaal aantal cellen in drinkwater te bepalen. De biomassa van de micro-organismen is bij de aantallen die zijn getest niet te bepalen met TOC, omdat het TOC-gehalte onder de detectiegrens ligt. De methode is dus te ongevoelig om de biomassa van micro-organismen in drinkwater te bepalen.

Doordat het ATP per cel gehalte kan verschillen tussen bacteriesoorten, zijn celtellingen met flowcytometrie of directe celtelling niet altijd een betrouwbare maat voor biomassa in drinkwater, vooral wanneer drinkwater tussen verschillende distributiegebieden met elkaar worden vergeleken. In die gevallen is ATP een betrouwbaardere maat voor de hoeveelheid biomassa in het water dan flowcytometrie

### 6.2 Aanbevelingen

Op basis van de resultaten doen we de volgende aanbevelingen:

Met de huidige ATP-methoden wordt ATP van bacteriën, schimmels en protozoa gemeten, dus de huidige methodiek volstaat om ATP van alle micro-organismen in drinkwater te meten. Rekening houdend met de grote database, richtlijnen, wettelijke normen en NEN-methoden

is het voorlopig aan te bevelen om de Celsis methode toe te blijven passen en niet over te stappen naar de LuminUltra methode.

Aanbevelingen voor verder onderzoek:

- De Celsis en LuminUltra methode met elkaar te vergelijken voor een groot aantal drinkwater- en biofilmmonsters uit verschillende voorzieningsgebieden en perioden van het jaar.
- Cellen opkweken op arm medium. Er is ervaring met bacteriën om deze op arm medium op te kweken, maar er is geen ervaring met schimmels, gisten en protozoa. Door de cellen op te kweken op arm medium komen deze beter overeen met cellen uit drinkwater. Daarnaast kan de vergelijking worden gemaakt tussen cellen die zijn opgegroeid in rijk en arm medium.
- Het onderzoek dat hier is uitgevoerd voor aparte micro-organismen kan ook worden uitgevoerd voor de biofilm, waarbij de ATP-methoden en celtmethoden worden getest voor de verschillende organismen in de biofilm. Hierbij spelen de volgende vragen:
  - Literatuurstudie naar de aantallen van bacteriën, schimmels, gisten en protozoa in de biofilm.
  - Wat is het verschil in ATP concentraties in biofilm tussen de Celsis en LuminUltra methode?
  - Welke celtmethode is betrouwbaar voor biofilm; kweek, flowcytometrie of directe celtelling?
  - Is het mogelijk om verschil tussen bacteriën, schimmels en protozoa te maken met celtmethoden en/of qPCR en kan op basis daarvan worden aangegeven wat het percentage van bacteriën, schimmels en protozoa in de biofilm is?
  - Wat is de invloed van biofilmstukjes en gesuspendeerde deeltjes op de ATP concentratie in drinkwater?

## 7 Referenties

- Allman, R. (1992). Characterisation of fungal spores using flow cytometry. *Mycological Research*, 96(12), 1016-1018.
- Autio K, Mattila-Sandholm T. (1992). Detection of active yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) in frozen dough sections. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2153-2157.
- Bloem J., Starink M., Bär-Gilissen MJB., Cappenberg TE. (1988). Protozoan grazing, bacterial activity, and mineralization in two-stage continuous cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 54, no 12, pp 3113-3121.
- Bradner, J., & Nevalainen, K. (2003). Metabolic activity in filamentous fungi can be analysed by flow cytometry. *Journal of microbiological methods*, 54(2), 193-201.
- Bratbak G., Dundas I. (1984). Bacterial dry matter content and biomass estimations. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 48, no. 4, 755-757.
- Bratbak G. (1985). Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 49, no. 6, pp 1488-1493.
- Brennan P.J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, vol 83, no 1-3, pp 91-97.
- BTO 2011.035. Opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater
- BTO 2014.015. Effect van waterkwaliteit, seizoen, drinkwaterinstallatie en verblijftijd/afstand op opportunistische pathogenen in drinkwater
- Cheng JYW., Chan CK., Lee CT., Lau APS. (2009). Carbon content of common airborne fungal species and fungal contribution to aerosol organic carbon in a subtropical city. *Atmospheric Environment*, vol 43, pp 2781-2787.
- Crombrugge J., Waes G.. (1991). Methods for assessing the bacteriological quality of raw milk from the farm. ATP method. In: Heeschen W, ed. Brussels: International Dairy Federation, pp. 53-60.
- Dauner M., Storni T., Sauer U. (2001). *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *J. Bacteriology*, vol 183, pp 7308-7317.
- Delgado FF., Cermak N., Hecht VC., Son S., Li Y., Knudsen SM., Olcum S., Higging JM., Chen J., Grover WH., Manalis SR. (2013). Intracellular water exchange for measuring the dry mass, water mass and changes in chemical composition of living cells. *PLoS ONE*, 8(7), e67590.
- Eydal, H.S.C., Pedersen, K. (2007). Use of an ATP assay to determine viable microbial biomass in Fennoscandian Shield groundwater from depths of 3e1000 m. *J. Microbiol. Meth.* 70, 363e373.



Fagerbakke KJ, Haldal M, Norland S. (1996). Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, vol 10, pp 15-27.

Fairbanks, B.C., Woods, L.E., Bryant, R.J., Elliot, E.T., Cole, C.V., Coleman, D.C., (1984). Limitations of ATP estimates of microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* 16 (6), 549e558.

Fajardo-Cavazos P., Schuenger A.C., Nicholson W.L. (2008). Persistence of biomarker ATP and ATP-generating capability in bacterial cells and spores contaminating spacecraft materials under earth conditions and in a simulated martian environment. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 74, pp 5159-5167

Gérikas Ribeiro, C., Marie, D., Lopes dos Santos, A., Pereira Brandini, F., & Vaultot, D. (2016). Estimating microbial populations by flow cytometry: comparison between instruments. *Limnology and Oceanography: Methods*, 14(11), 750-758.

Guillou S., Besnard V., El Mur N., Federighi M. (2003). Viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells exposed to low-amperage electrolysis as assessed by staining procedure and ATP content. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 85-89.

Hamilton R.D., Holm-Hansen O. (1967). Adenosine triphosphate content of marine bacteria. *Limnol. Oceanogr.*, vol 12, no. 2, pp 319-325

Hammes, F., & Egli, T. (2010). Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(3), 1083-1095.

Hammes F., Goldschmidt F., Vital M., Wang Y., Egli T. (2010). Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments. *Water Res*, 44, 3915-3923.

Hattori N., Sakakibara T., Kajiyama N., Igarashi T., Maeda M., Murakami S. (2003). Enhanced biomass assay using mutant luciferase resistant to benzalkonium chloride. *Analytical Biochemistry*, vol 319, pp 287-295

Hoffman, R.M., Standridge, J.H., Prieve, A.F., Cucunato, J.C., & Bernhardt, M. (1997). Using flow cytometry to detect protozoa. *American Water Works Association. Journal*, 89(9), 104.

Holm-Hansen, O. (1973). Determination of total microbial biomass by measurement of adenosine triphosphate. In: *Estuarine Microbial Ecology*, L. H. Stevenson and R. R. Colwell, editors, University of South Carolina Press, Columbia, pp. 73-89.

Humphreys, M. J., Allman, R., & Lloyd, D. (1994). Determination of the viability of *Trichomonas vaginalis* using flow cytometry. *Cytometry*, 15(4), 343-348.

Jankute M., Cox J.A., Harrison J, Besra G.S. (2015). Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annual Reviews in Microbiology*, vol 69, pp 405-423.

Jensen, B.K., (1989). ATP-related specific heterotrophic activity in petroleum contaminated and uncontaminated groundwaters. *Can. J. Microbiol.* 35 (8), 814e818.

- Karl, D.M. (1980). Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.* **44**, 739-96.
- Kuiper M.W., Valster R.M., Wullings B.A., Boonstra H., Smidt H., van der Kooij D. (2006). Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 72, no 9, pp 5750-5756.
- LeChevallier MW, Shaw NE, Kaplan LA, Bott TL. (1993). Development of a rapid assimilable organic carbon method for water. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 59, no 5, pp 1526-1531.
- Lindström, E. S., Weisse, T., & Stadler, P. (2002). Enumeration of small ciliates in culture by flow cytometry and nucleic acid staining. *Journal of microbiological methods*, 49(2), 173-182.
- Loferer-Kröbbacher M, Klima J, Psenner R. (1997). Determination of bacterial cell dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 64, no 2, pp 688-694.
- Lundin, A. (2000) Use of firefly luciferase in ATP related assays of biomass, enzymes and metabolites. *Methods Enzymol.* 305, 346-370.
- Magic-Knezev, A., van der Kooij, D., (2004). Optimisation and significance of ATP analysis for measuring active biomass in granular activated carbon filters used in water treatment. *Water Res.* 38 (18), 3971-3979.
- Martin, S., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A. J., Rader, J.A., Schie, R.C. v., LaFace, D.M., & Green, D.R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *Journal of Experimental Medicine*, 182(5), 1545-1556.
- Mitchison JM. (1958). The growth of single cells, II *Saccharomyces Cerevisiae*. *Experimental Cell Research*, vol 15, pp 214-221.
- Miyahira Y., Takeuchi T. (1991). Application of ATP measurement to evaluation of the growth of parasitic protozoa in vitro with a special reference to *Pneumocystis Carinii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol 100A, no 4, pp 1031-1034.
- Neidhart F.C. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Vol 1, pp 14, Table 1, ASM Press.
- Pridmore, R.D., Cooper, A.B., Hewitt, J.E., (1984). ATP as biomass indicator in eight North Island Lakes, New Zealand. *Freshwater Biol.* 14 (1), 73-78.
- Prigione, V., Lingua, G., & Marchisio, V. F. (2004). Development and use of flow cytometry for detection of airborne fungi. *Applied and environmental microbiology*, 70(3), 1360-1365.
- Schenk, M., Raffellini, S., Guerrero, S., Blanco, G.A., & Alzamora, S.M. (2011). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* by UV-C light: study of cell injury by flow cytometry. *LWT-Food science and technology*, 44(1), 191-198.

- Schlegel, H.G. 1993. *General Microbiology*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Schneider, D.A., Gourse, R.L., (2004). Relationship between growth rate and ATP concentration in *Escherichia coli*: a bioassay for available cellular ATP. *J. Biol. Chem.* 279 (9), 8262e8268.
- Soudant, P., Chu, F.L.E., & Lund, E.D. (2005). Assessment of the cell viability of cultured *Perkinsus marinus* (Perkinsea), a parasitic protozoan of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, using SYBRgreen-propidium iodide double staining and flow cytometry. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(6), 492-499.
- Stanley, P.E. (1986). Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic cells. *Methods Enzymol.* 133, 14-22.
- Stuedler, S., Böhmer, U., Weber, J., & Bley, T. (2015). Biomass measurement by flow cytometry during solid - state fermentation of basidiomycetes. *Cytometry Part A*, 87(2), 176-188.
- Stanley, P.E., (1989). A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology. *J. Biolumin. Chemilumin.* 4 (1), 375e380.
- Valster R.M., Wullings B.A., Bakker G., Smidt H., van der Kooij D. (2009). Free-living protozoa in two unchlorinated drinking water supplies, identified by phylogenetic analysis of 18S rRNA gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 75, no 14, pp 4736-4746.
- van der Kooij, D., & van der Wielen, P. W. J. J. (2014). *Microbial growth in drinking-water supplies. Problems, causes, control and research needs*. London, UK: IWA Publishing.
- Van der Wielen P.W.J.J. en van der Kooij D. (2010). Effect of water composition, distance and season on the adenosine triphosphate concentration in unchlorinated drinking water in the Netherlands. *Water Research*, pp 4860-4867.
- Van der Wielen P.W.J.J. en van der Kooij D. (2013). Nontuberculous mycobacteria, fungi, and opportunistic pathogens in unchlorinated drinking water in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 79, no 3, pp 825-834.
- Veiga A., Arrabaca J.D., Sansonetty F., Ludovico P., Côrte-Real M., Loureiro-Dias M.C.. (2003). Energy conversion coupled to cyanide-resistant respiration in the yeasts *Pichia membranifaciens* and *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, vol 3, pp 141-148
- Veal, D., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J., & Attfield, P. (2000). Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of immunological methods*, 243(1), 191-210.
- Velten, S., Hammes, F., Boller, M., Egli, T., (2007). Rapid and direct estimation of active biomass on granular-activated carbon through adenosine tri-phosphate (ATP) determination. *Water Res.* 41, 1973e1983.
- Venkateswaran K., Hattori N., La Duc M.T., Kern R. (2003). ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. *J Microbiological Methods*, vol 52, pp 367-377

Wilson, C.A., Stevenson, L.H., Chrzanowski, T.H., (1981). The contribution of bacteria to the total adenosine triphosphate extracted from the microbiota in the water of a salt-marsh creek. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 50, 183e195.

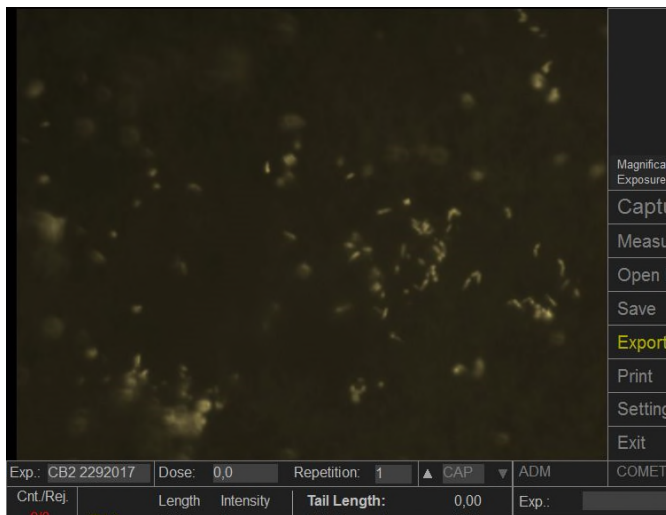
Yaginuma H., Kawai S., Tabata K.V., Tomiyama K., Kakizuka A., Komatsuzaki T., Noji H., Imamura H. (2014). Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. *Scientific Reports*, 4:6522

# Bijlage I Foto's van directe celtelling

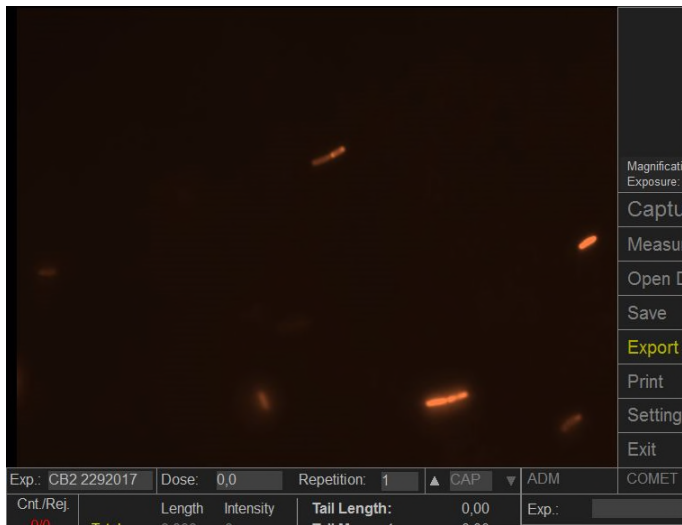
## *Aeromonas hydrophila* (gram-negatief)



## *Mycobacterium intracellulare* (dikke en stevige celwand)



### *Bacillus subtilis* (gram-positief)



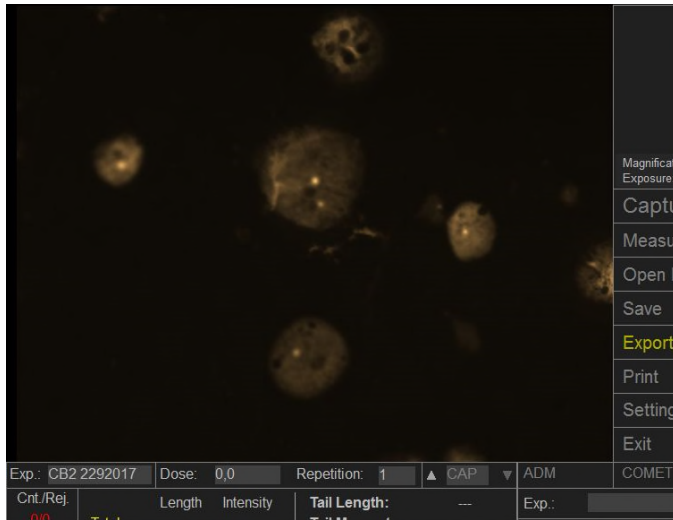
### *Aspergillus fumigatus* (filamenteuze schimmel)

Geen foto beschikbaar

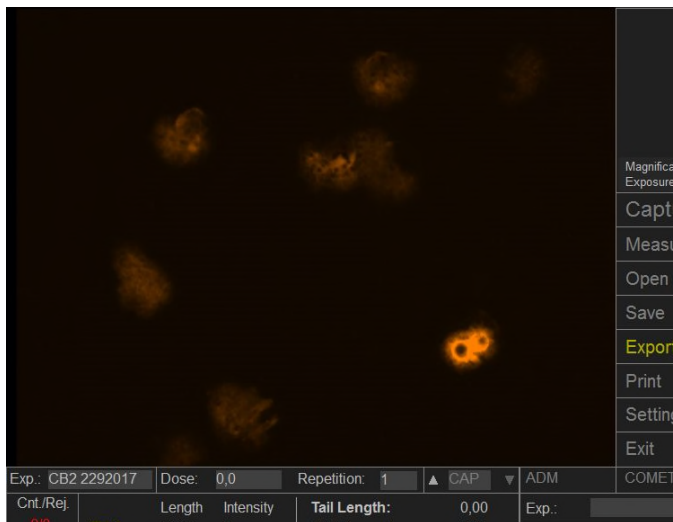
### *Gist*



*Acanthamoeba castellanii* (protozoa)



*Vermamoeba vermiformis* (protozoa)



## Bijlage II Resultaten experimenten

		ATP-Celsis (ng/l)	ATP-LU (ng/l)	FCM (cellen/ml)	DCT (aantal/ml)	kweek (kve/ml)	TOC, direct (mg C/l)	TOC, ingedampt (mg C/l)
<i>A. hydrophila</i>	Exp 1	121	206	339000	303397	56667	#	#
	Exp 2	65	160	203000	544000	63600	#	#
	Exp 3	1300	3100	1400000	2000000	2740000	*	*
<i>M. intracellulare</i>	Exp 1	#	0,5	148000	62954	58667	#	#
	Exp 2	#	15	9420	14600	30000	#	#
	Exp 3	1,2	200	480000	300000	0	*	*
<i>B. subtilis</i>	Exp 1	8,8	9,9	81700	115754	248000	#	#
	Exp 2	61,0	200	36000	75200	605200	#	#
	Exp 3	290,0	780	170000	2400000	151167	*	*
<i>A. fumigatus</i>	Exp 1	5,5	343	*	*	*	0,7	#
	Exp 2	#	79	*	*	452	#	#
	Exp 3	410	930	*	*	40	#	#
<i>M. guillermondii</i>	Exp 1	168	428	18800	31071	43333	#	#
	Exp 2	56	180	89200	5480	29600	#	#
	Exp 3	2000	6000	180000	150000	407500	#	#
<i>A. castellanii</i>	Exp 1	4,7	22,5	*	609	*	#	#
	Exp 2	36	120	*	914	*	1,0	1,2
	Exp 3	1100	6000	*	6100	*	*	*
<i>V. vermiformis</i>	Exp 1	100	380	*	240	*	2,0	*
	Exp 2	82	280	*	490	*	2,0	1,1
	Exp 3	620	2700	*	7900	*	*	*

\* = niet ingezet of resultaat niet betrouwbaar

# = resultaat onder de detectiegrens



## Bijlage III Media recepten

### III.1 ADA

Aeromonas Dextrine Agar (ADA) is gemaakt volgens huisvoorschrift LMB-022.

#### Recept

Los 18,4 gram m-Aeromonas Selective agar op in 500 ml demiwater. Steriliseer 15 min. bij  $121 \pm 3^\circ\text{C}$ . Dit basismedium is gedurende 9 maanden bij  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  houdbaar. Voeg vervolgens 1 ml van het selectieve supplement toe aan het basismedium dat tot circa  $50^\circ\text{C}$  is gekoeld. Meng, waarbij vorming van luchtbellen moet worden vermeden. Stel de pH zo in dat de pH van het medium  $8,0 \pm 0,2$  bij  $25^\circ\text{C}$  is. Giet 15-20 ml uit in plastic petrischalen. Het medium is ten hoogste 2 weken houdbaar bij  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ .

### III.2 Middlebrook

Middlebrook is gemaakt volgens voorschrift van de fabrikant (Difco).

#### Recept

Los 19 gram op in 900 ml demiwater dat 5 ml glycerol bevat. Autoclaveer gedurende 15 minuten bij  $121 \pm 3^\circ\text{C}$ . Voeg vervolgens 100 ml Middlebrook OADC Enrichment toe wanneer het medium is gekoeld tot  $50-55^\circ\text{C}$ . Stel de pH van het medium op  $6,6 \pm 0,2$ . Giet 15-20 ml uit in plastic petrischalen.

### III.3 LLA 8,0

Lab-Lemco-agar 8,0 (LLA 8,0) is gemaakt volgens huisvoorschrift LMB-004.

#### Recept

Los de 23,0 gram Lab-Lemco-agar op in 1000 ml demiwater. Autoclaveer gedurende 15 minuten bij  $121 \pm 3^\circ\text{C}$ . Stel de pH zodanig in dat na stollen de pH van het medium  $7,4 \pm 0,2$  is. Giet 15-20 ml uit in plastic petrischalen. Het medium is 1 maand houdbaar bij  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ .

### III.4 MEA

Malt extract agar is medium voor schimmels.

#### Recept

Los 50 gram op in 1000 ml demiwater. Autoclaveer gedurende 15 minuten bij  $121 \pm 3^\circ\text{C}$ . Laat afkoelen tot  $50^\circ\text{C}$  en voeg vervolgens Penicilline G (267,79 mg/L) en Streptomycine (1332 mg/L) toe. Stel de pH zodanig in dat na stollen de pH van het medium  $5,4 \pm 0,2$  is. Giet 15-20 ml uit in plastic petrischalen.

### III.5 Gistmedium

Rijk gistmedium is gemaakt volgens het protocol van het Houseley lab (<https://www.babraham.ac.uk/our-research/epigenetics/jon-houseley/protocols>), waarbij het protocol voor Yeast Culture v1.6 is gebruikt.

#### Recept

Los 20 gram Pepton, 10 gram gist extract, 20 gram suiker en 15 gram agar op in 1000 ml

demiwater. Autoclaveer gedurende 15 minuten bij  $121 \pm 3^\circ\text{C}$ . Giet 15-20 ml uit in plastic petrischalen.

<https://www.google.nl/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjH0-n4t-jWAhXDZlAKHQcqDhsQFggTMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.babraham.ac.uk%2Ffiles%2Fdownload%2F0a5bf39cb5867d&usq=AOvVaw2Tf-CZWdeJV6C1QZ7RFoml>

### III.6 PYNFH

Medium voor protozoa, gemaakt volgens voorschrift van ATCC (ATCC 327-X):

#### Recept

Het gevriesdroogde medium is steriel opgelost in 55 ml steriel, gedestilleerd water. Het medium kan vervolgens 30 dagen bewaard worden bij  $2 - 8^\circ\text{C}$ .

<https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/45AF696E7DF54E3889C249ED9D0E659E.ashx>

## Bijlage IV Flowcytometrie instellingen voor protozoa

