



KWR 2017.021 | Februari 2017

Verband tussen *Aeromonas* nagroei en de aanwezigheid van waterpissebedden

Aeromonas groei in aanwezigheid van
waterpissebedden



Verband tussen *Aeromonas* nagroei en de aanwezigheid van waterpissebedden

Aeromonas groei in aanwezigheid van
waterpissebedden

KWR 2017.021 | Februari 2017

Opdrachtnummer

401386/013

Projectmanager

Edwin Kardinaal

Opdrachtgever

DPWE-bedrijven

Kwaliteitsborger

Paul van der Wielen

Auteurs

Nikki van Bel*, Kay Hup*, Annemieke Kolkman*, Anke
Brouwer*, Wim Hijnen**

* KWR

** KWR/Evides

Verzonden aan

DPWE-bedrijven

Jaar van publicatie
2017

Meer informatie

dr. Nikki van Bel
T 030-6069516
E Nikki.van.Bel@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl



KWR 2017.021 | Februari 2017 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

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

Samenvatting

Aeromonas bacteriën worden beschouwd als nagroeiindicator van het drinkwaterdistributiesysteem en geeft een indicatie van de biologische stabiliteit van het drinkwater. In het Nederlandse drinkwater zijn vlak na de productielocatie de *Aeromonas*-aantallen laag, maar de concentraties in het distributiesysteem kunnen regelmatig de richtlijn overschrijden. De aanwezigheid van waterpissebedden wordt hier al langere tijd mee in verband gebracht. Waterpissebedden bevatten een hoog gehalte aminozuren en vetzuren. Uit groeiexperimenten blijkt dat *Aeromonas* in drinkwater en spuiwater, in aanwezigheid van de autochtone microbiële populatie, hier goed op kan groeien. De aanwezigheid van een levende of dode waterpissebed zorgt ook voor groei en groei is sterker als sediment aanwezig is. Echter, aangezien een groot aantal waterpissebedden nodig is om een aminozuur- of vetzuurconcentratie in het drinkwater te bereiken waarbij *Aeromonas* kan groeien, zijn waterpissebedden een belangrijke, maar zeer waarschijnlijk niet de enige, factor voor de groei van *Aeromonas* in het ecosysteem van het drinkwaterdistributienet. Andere dierlijke organismen spelen hierbij mogelijk een rol, maar dit zou verder onderzocht moeten worden.

Inhoud

1	Inleiding	5
1.1	Achtergrond	5
1.2	Doelstelling en uitgevoerd onderzoek	6
1.3	Rapportage	6
2	Materiaal en methoden	7
2.1	Spuiacties 's-Gravendeel	7
2.2	Spuiactie Tholen/Halsteren: waterpissebedden kweek	7
2.3	Karakterisatie waterpissebedden	7
2.4	Groei op verschillende groeistoffen	8
2.5	Vetzuur- en aminozuurgehalte van waterpissebedden	10
3	Resultaten	12
3.1	Spuiregime Kralingen: planning en uitvoering	12
3.2	Spuiregime Tholen/Halsteren	14
3.3	Identificatie waterpissebedden uit spuiactie Tholen/Halsteren en Kralingen	14
3.4	Vetzuur- en aminozuuranalyse	19
3.5	Groeiproeven	24
4	Conclusies	34
5	H₂O-artikel. De rol van waterpissebedden bij de vermeerdering van <i>Aeromonas</i> in het drinkwaterdistributiesysteem	35
5.1	Samenvatting	35
5.2	Inleiding	35
5.3	Verzamelen en karakteriseren van waterpissebedden uit het distributiesysteem	36
5.4	Vetzuur- en aminozuurgehalte van waterpissebedden	36
5.5	Groei van <i>Aeromonas</i> op waterpissebedden, vetzuren en aminozuren in drinkwater	37
5.6	Waterpissebedden als voedsel voor <i>Aeromonas</i> in het distributiesysteem	38
5.7	Conclusies	39
5.8	Referenties	39
6	Referenties	40
	Bijlage I	41

1 Inleiding

1.1 Achtergrond

Aeromonas in drinkwater heeft geen gezondheidskundige betekenis, maar wordt wel beschouwd als een indicatie voor de mate van nagroei in het distributiesysteem. In 2014 is binnen het BTO een project gestart over de waarde van *Aeromonas* en KG22 als wettelijke parameters voor nagroei. Bij een aantal DPWE bedrijven (PWN, Waternet, Evides) worden overschrijdingen van de *Aeromonas* norm waargenomen. Als de specifieke (groei)factoren die van belang zijn bij de toename van *Aeromonas* aantallen in het distributiesysteem bekend zijn, kunnen waarschijnlijk gericht beheersmaatregelen worden genomen.

In een DPWE project van 2015 zijn de samenstelling en groei-eigenschappen achterhaald van de *Aeromonas* soorten die in het distributiesysteem van verschillende productielocaties met en zonder overschrijdingen vóórkomen (KWR 2016.073). De soortensamenstelling in de diverse voorzieningsgebieden is variabel in ruimte en in tijd. De gevonden *Aeromonas* soorten zijn: *A. bestiarum*, *A. media*, *A. veronii*, *A. rivuli*, *A. salmonicida*, *A. sobria* en *A. hydrophila*. Voorkeur voor ammonium boven nitraat als stikstofbron voor de groei blijkt een algemene eigenschap voor de meeste stammen. Een relatief hoge specifieke groeisnelheid op een relatief lage concentratie van een aminozuur (arginine) en een langketige vetzuur (oleaat) werd voor de meeste stammen waargenomen. Oleaat en verschillende andere langketige vetzuren zijn aangetroffen in waterpissebedden en andere kreeftachtigen (Lau et al., 2012; Culkin en Morris, 1969). Chitine en een aantal biopolymeren werden door de *Aeromonas* stammen niet benut. Hierbij is echter (nog) niet gekeken naar inductie van deze afbraak door *Aeromonas* in aanwezigheid van een monomeer zoals eerder is aangetoond (van der Kooij et al., 1980).

De resultaten van een aantal eerder uitgevoerde locatiespecifieke onderzoeken (Hijnen, 1992; SPO Evides en routine meetprogramma's in het leidingnet in de afgelopen jaren) laten zien dat een mogelijk verband bestaat tussen *Aeromonas* aantallen in het leidingnet en de aanwezigheid van waterpissebedden. Een gericht BTO-onderzoek in 2015, met daarin een landelijke inventarisatie van dierlijke organismen in het distributiesysteem, naar de relatie tussen waterpissebedden en *Aeromonas* in verschillende distributiesystemen liet echter geen relatie tussen beide organismen zien (BTO 2016.065). Bij de voorzieningsgebieden van Evides is echter wel gezien dat *Aeromonas*-overschrijdingen voorkomen in de voorzieningsgebieden waar ook hoge aantallen waterpissebedden aanwezig zijn (pers. comm. Wim Hijnen). Om deze tegenstrijdige waarnemingen te kunnen duiden is gericht aanvullend onderzoek nodig op laboratoriumschaal met groeiproeven om de interactie van *Aeromonas* en waterpissebedden onder verschillende gecontroleerde milieucondities te analyseren. Op grond van eerder onderzoek is vastgesteld dat (i) waterpissebedden hoge aantallen *Aeromonas* bacteriën kunnen bevatten en (ii) dat een dode waterpissebed een sterke toename van *Aeromonas*-aantallen kan veroorzaken in aanwezigheid van de autochtone flora (Hijnen, 1992; SPO Evides). Een belangrijke vraag is hierbij of een *Aeromonas* toename in het water het gevolg is van het vrijkomen van *Aeromonas* uit een waterpissebed (*Asellus aquaticus*) wanneer deze dood gaat en uiteenvalt, en/of dat *Aeromonas* groeit op specifieke organische verbindingen die vrijkomen bij de activiteit van het organisme in het milieu of het uiteenvallen van een dode waterpissebed wanneer deze desintegreert.

1.2 Doelstelling en uitgevoerd onderzoek

Achterhaal of, en zo ja welke, relatie er bestaat tussen *Aeromonas* en waterpissebedden in het drinkwaterecosysteem.

Hiervoor is onder andere gekeken naar eigenschappen van waterpissebedden die zijn geïsoleerd uit het leidingnet: grootte, levensvatbaarheid en in hoeverre *Aeromonas* in deze waterpissebedden voorkomt. Omdat eerder is waargenomen dat (i) *Aeromonas* goed groeit in water met een waterpissebed, (ii) een sterke affiniteit heeft voor onder andere het vetzuur oleaat (en mogelijk andere vetzuren) en (iii) vetzuren belangrijke bestanddelen zijn van waterpissebed biomassa, is gekeken naar de aantallen *Aeromonas* en de vetzuursamenstelling van waterpissebed uit het drinkwatermilieu. In een groeiproef is de groei van *Aeromonas* in drinkwater en spuiwater in aanwezigheid van afzonderlijk waterpissebedden (dood/levend) en mengsels van vetzuren en aminozuren (verbindingen die ook aanwezig zijn in waterpissebedden). De relatie tussen *Aeromonas* en waterpissebedden kan parasitair, neutraal en/of symbiotisch zijn en mogelijk dat de resultaten daar iets over kunnen zeggen.

1.3 Rapportage

In overleg met de DPWE-begeleidingsgroep is afgesproken dat dit onderzoek wordt gerapporteerd in de vorm van een H₂O-artikel. De resultaten die niet in dit artikel passen, zijn zeer beknopt, met beperkte interpretatie, weergegeven in dit rapport.

2 Materiaal en methoden

2.1 Spuiacties 's-Gravendeel

Om de waterpissebedden voor de experimenten te verzamelen is door Evides een spuiplan opgesteld in een wijk in 's-Gravendeel, onderdeel van het distributienet van Kralingen. Deze spuiactie is op 28 juni 2016 uitgevoerd waarna diezelfde dag de analyses en groei-experimenten in spuiwater gestart en/of uitgevoerd zijn.

Een uitgebreide uitleg en rationale achter de spuiactie is beschreven in paragraaf 3.1.

Voor de tweede set groeiproeven (in drinkwater maar met toevoeging van waterpissebedden) is op 22 november een extra spuiactie uitgevoerd in 's-Gravendeel waarbij waterpissebedden zijn verzameld. Hierbij is op normale snelheid (1,5 m/s) gespuid met drie volumes. Tevens is hierbij drinkwater bemonsterd waarin de tweede set groeiproeven zijn uitgevoerd.

2.2 Spuiactie Tholen/Halsteren: waterpissebedden kweek

De spuiactie bij Tholen/Halsteren, een grondwaterpompstation van Evides, behoort officieel niet tot dit project, maar is wel meegenomen in dit project als mogelijk alternatief indien de bovengenoemde spuiactie in 's-Gravendeel in juni niet genoeg waterpissebedden zou opleveren.

In Tholen/Halsteren zijn op 9 en 10 mei 2016 twee spuiacties uitgevoerd. Op deze locatie is een alternatieve spui methode getest waarin het water verrijkt wordt met CO₂. De verwachting is dat hierdoor de levende waterpissebedden verdoofd raken en makkelijker uit de drinkwaterleiding te spuien zijn. De opbrengst van (dode en levende) waterpissebedden is naar het laboratorium van KWR gebracht waarna de levende exemplaren voorzichtig met een pincet in een glazen schaal zijn overgebracht zoals hieronder beschreven.

2.3 Karakterisatie waterpissebedden

2.3.1 Grootte

Met behulp van microscopie is de grootte van de levende waterpissebedden bepaald. Van de twee levende waterpissebedden die voor de groeiproeven zijn gebruikt, is niet de lengte bepaald om extra stress te voorkomen. De grootte van de twee gebruikte exemplaren was gelijk en kan voor het drinkwaterdistributiesysteem worden omschreven als 'middelgrote' waterpissebedden (details worden hierna gegeven).

2.3.2 *Aeromonas* aantallen

Waterpissebedden (levend of dood) zijn individueel in 1 ml steriel drinkwater fijngestampt waarna de *Aeromonas* aantallen in het water op ADA agar is bepaald, bij 30°C gedurende 24 uur. In sommige gevallen zijn ook de *Aeromonas* aantallen van meerdere waterpissebedden in één mengsel bepaald. Hierbij werden de *Aeromonas*-aantallen gedeeld door de aantallen waterpissebedden die in bewerking waren genomen.

2.3.3 Ammoniumbepaling

In vijf gevallen waarin het aantal *Aeromonas* van meerdere waterpissebedden in één mengsel is bepaald, is ook de ammoniumconcentratie bepaald. De ammoniumionen in een watermonster reageren met het natriumhypochloriet en natriumsalicylaat waarbij een groen

gekleurde verbinding wordt gevormd. De mate waarin dit gebeurt wordt in een spectrofotometer bij 660 nm bepaald. De analyse wordt uitgevoerd volgens huisprotocol LAM-036, en de detectiegrens is 0,02 mg N/l.

2.3.4 *Asellus*-kweek

Tijdens twee spuiacties met CO₂-verrijkt water in Tholen/Halsteren op 9 en 10 mei 2016 zijn relatief veel levende waterpissebedden verzameld. Een aantal van deze waterpissebedden zijn meteen gebruikt voor het onderzoek. De overige waterpissebedden zijn in cultuur gehouden tot mogelijk later gebruik.

De waterpissebedden zijn in locatie-eigen drinkwater en spuiwater in een glazen schaal verzameld met daarin een esdoornblad. De cultuur is constant in het donker bij 15°C bewaard, waarbij de glazen schaal losjes is afgedekt. Na verloop van tijd is het esdoornblad verteerd waarna alleen de nerven nog over zijn. Indien dit het geval is, is een nieuw blad toegevoegd. Enkele keren is vers drinkwater toegevoegd.

2.4 Groei op verschillende groeistoffen

2.4.1 *Aeromonas* entflessen en stammen

De groei-experimenten zijn uitgevoerd met een mengsel van *Aeromonas*-stammen (Tabel 1). De stammen zijn per stam voorgekweekt in mineraal medium waaraan 250 µg glucose/l is toegevoegd. Hierbij is de groei bepaald tot de maximale aantallen kve op de aanwezige koolstofverbinding. De stammen zijn in gelijke aantallen kve in een mengcultuur gebracht en in een lage aantallen van 2-10 KVE/ml toegevoegd aan de groeiproeven in de kolven (drinkwater, respectievelijk spuiwater).

TABEL 1. *AEROMONAS* STAMMEN DIE ALS STARTCULTUUR ZIJN GEDOSEERD AAN DE GROEI-PROEF. DE STAMMEN ZIJN IN EERDER ONDERZOEK GEÏSOLEERD UIT HET DRINKWATER (KWR 2016.073).

Soort	Locatie	Monstercode
<i>A. bestiarum</i>	Andijk	875850
<i>A. hydrophila</i>	Andijk	873282
<i>A. rivuli</i>	Beerenplaat	1461989
<i>A. rivuli</i>	Scheveningen	872916
<i>A. media</i>	Weesperkarspel	871768
<i>A. salmonicida</i>	Andijk	873292
<i>A. sobria</i>	Braakman	1453325
<i>A. sobria</i>	Scheveningen	872991
<i>A. veronii</i>	Weesperkarspel	871769
<i>A. veronii</i>	Beerenplaat	1461461

2.4.2 Groeiproeven

Groeiproeven zijn in tweevoud uitgevoerd bij 25°C met niet-gepasteuriseerde spuiwater van het drinkwaterdistributienet van Kralingen uit de gemeente 's-Gravendeel. In alle groeiproeven is 0,1 g NO₃-N/l, 0,1 g NH₄-N/l en 0,5 g NaHPO₄/l gedoseerd aan het water als N- en P-bronnen.

Groeioproef in spuiwater

Per groeikolf (inhoud: 600 ml) is één van de volgende (potentiële) groeistoffen toegevoegd:

- 1 levende waterpissebed, afkomstig uit distributienet van 's Gravendeel
- 1 dode waterpissebed, afkomstig uit distributienet van 's Gravendeel
- 1 dode waterpissebed, gepasteuriseerd op 60°C, afkomstig uit distributienet van 's Gravendeel
- 1 darmkanaal van een waterpissebed, afkomstig uit distributienet van 's Gravendeel
- Mengsel van gelijke hoeveelheden vetzuren opgelost in steriel, gedemineraliseerd water (totaal: 0,57 mg vetzuren, waarvan 0,413 mg C-atomen):
 - Myristaat
 - Palmitinezuur
 - Stearaat
 - Oleaat
 - Arachidinezuur
- Mengsel van 17 aminozuren (totaal: 960 µg aminozuren, waarvan 413 µg C-atomen)
 - alanine, arginine, asparaginezuur, glutaminezuur, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, fenylalanine, proline, serine, threonine, tyrosine, valine, cysteïne

De gedoseerde waterpissebedden zijn per conditie op basis van een visuele inspectie gekozen zodat deze zo goed mogelijk overeenkomen met elkaar. De dode waterpissebedden zijn dood uit het leidingnet verzameld, maar waren onbeschadigd en niet beschimmeld op het moment dat ze aan de groeioproef werden gedoseerd. Het darmkanaal is verzameld uit het leidingnet, en was onbeschadigd en niet beschimmeld. De toegevoegde vetzuren zijn gekozen op basis van voorkomen in hoge concentratie in *Asellus aquaticus* (Lau *et al.*, 2013) en de oplosbaarheid in water. Hierbij is het gehalte vetzuren gedoseerd dat in 10 mg *Asellus aquaticus* voorkomt. Dit houdt in dat de gedoseerde vetzuurconcentratie ongeveer gelijk staat aan 6 *Asellus aquaticus* exemplaren, bij een gemiddeld gewicht van 1,6 mg per *Asellus aquaticus*. Aangezien er voorafgaand aan deze groeioproeven geen gegevens beschikbaar waren over de concentratie aminozuren in *Asellus aquaticus*, is ervoor gekozen om een gelijke hoeveelheid C-atomen en dus koolstofbron te doseren.

Alle toevoegingen (behalve de waterpissebedden en de aminozuren) zijn voor dosering aan de groeioproef gepasteuriseerd bij 60°C gedurende 30 minuten. Het spuiwater is niet gepasteuriseerd.

Groeioproef in drinkwater

Per groeikolf (inhoud: 600 ml) is één van de volgende (potentiële) groeistoffen toegevoegd:

- 1 levende waterpissebed uit de KWR kweek (7 maanden in kweek gehouden in het laboratorium)
- 1 dode waterpissebed uit 's Gravendeel
- 1 levende waterpissebed uit 's Gravendeel
- 10 fecale pellets van waterpissebedden
- Mengsel van gelijke hoeveelheden vetzuren opgelost in steriel, gedemineraliseerd water (totaal: 10 µg C/l):
 - Myristaat
 - Palmitinezuur
 - Stearaat

- Oleaat
- Arachidinezuur
- Mengsel van 17 aminozuren (totaal: 10 µg C/l)
 - alanine, arginine, asparaginezuur, glutaminezuur, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, fenylalanine, proline, serine, threonine, tyrosine, valine, cysteïne

Alle toevoegingen (behalve de waterpissebedden en de aminozuren) zijn voor dosering aan de groeiproef gepasteuriseerd bij 60°C gedurende 30 minuten. Het drinkwater is niet gepasteuriseerd, alleen voor het uitvoeren van drie controle-experimenten is het water gepasteuriseerd.

De groei van de *Aeromonas* stammen is bepaald door het koloniegetal in tweevoud te bepalen op ADA agar. Groei van de totale microbiële flora is gemeten door bepaling van het ATP gehalte in het water. ATP is gemeten volgens huisvoorschrift LMB-002 (Magic-Knezev & van der Kooij, 2004), met een detectiegrens van 1,0 ng ATP/l.

De *Aeromonas* verdubbelingssnelheid (V ; h^{-1}) is bepaald uit de lineaire fase van de exponentiele groei in het water, volgens de formule:

$$\text{Verdubbelingssnelheid } V = (\log N_2 - \log N_1) / (\log 2 \times (t_2 - t_1))$$

Waarbij N_2 en N_1 de koloniegetallen op tijdstippen t_2 en t_1 zijn.

Het groeimaximum (kve/ml) is vastgesteld als het maximale aantal kolonievormende eenheden. De groeiproeven zijn gestopt wanneer het aantal kve tweemaal lager was dan het maximum. Uitzondering hierop is de groeiproef met een levende waterpissebed, waarvoor een sterke stijging van de aantallen *Aeromonas* werd verwacht na overlijden van de waterpissebed. Deze groeiproeven zijn gedurende 24 dagen in stand gehouden.

2.5 Vetzuur- en aminozuurgehalte van waterpissebedden

Waterpissebedden uit het spuiwater van Tholen/Halsteren en 's-Gravendeel zijn verzameld en per drie exemplaren bewaard in methanol bij -80°C tot verdere analyse.

Voor analyse is de methanol verdampt en zijn de waterpissebedden gedroogd bij 37°C gedurende 2 uur onder een stroom van stikstofgas waarna het drooggewicht is bepaald (Tabel 2). Vervolgens zijn de waterpissebedden gehomogeniseerd in methanol waarbij interne standaarden zijn toegevoegd. Vetzuren zijn geëxtraheerd door middel van water-methanol-chloroform extractie (Folch-methode). De organische fase met daarin de vetzuren is gedroogd en opgelost in chloroform. Na een schoonmaakstap zijn de vetzuren opgelost in acetonitriël waarna met LC-MS de vetzuursamenstelling is bepaald.

Na de water-methanol-chloroform extractie zijn de aminozuren geëxtraheerd uit de waterfase. Na een schoonmaakstap zijn de aminozuren opgelost in gedestilleerd water en acetonitriël waarna met een UPLC de aminozuursamenstelling is bepaald.

TABEL 2. DROOGGEWICHT VAN *APELLUS* DIE GEBRUIKT ZIJN VOOR DE VETZUUR- EN AMINOZUURANALYSE.

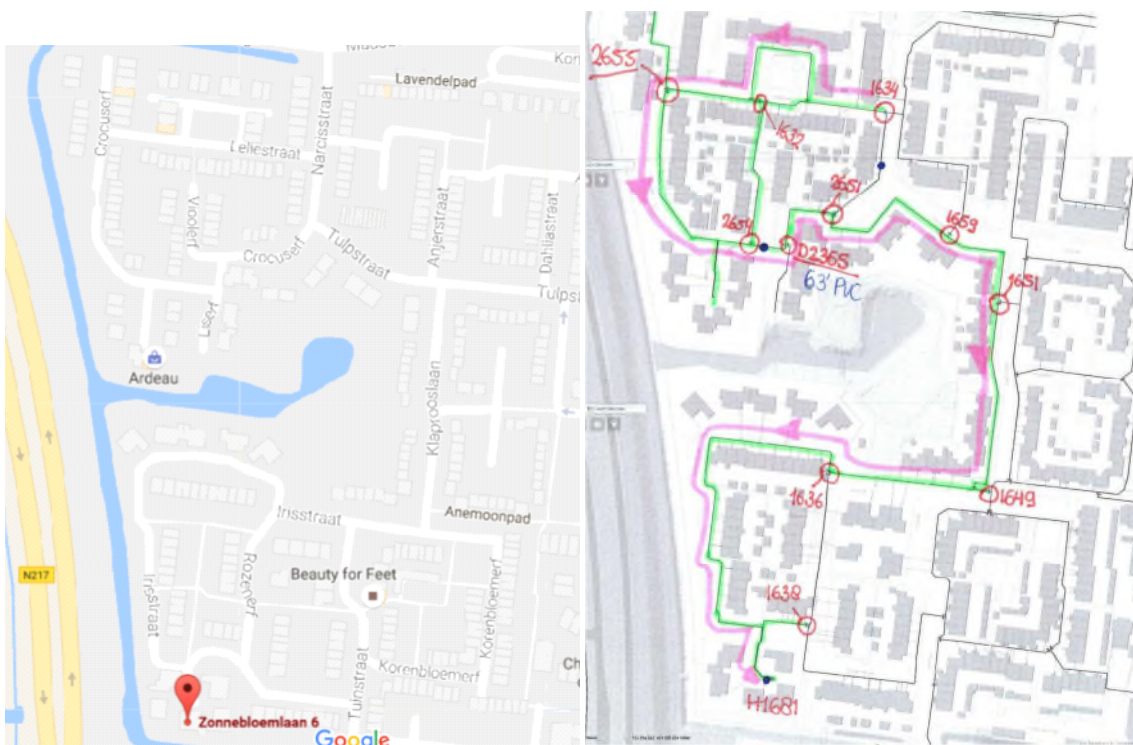
Monster	Drooggewicht	Aantal exemplaren
Tholen dood 1	1,11 mg	6
Tholen dood 2	1,32 mg	6
Tholen levend 1	3,60 mg	3
Tholen levend 2	3,84 mg	3
's Gravendeel dood 1	1,17 mg	6
's Gravendeel dood 2	1,44 mg	6
's Gravendeel levend	1,61 mg	2

De vetzuur- en aminozuursamenstelling van alle monsters is in drievoud bepaald en weergegeven als μg vetzuren of aminozuren per mg drooggewicht met de standaarddeviatie.

3 Resultaten

3.1 Spuiregime Kralingen: planning en uitvoering

De waterpissebedden voor de groeiproeven zijn verzameld uit het distributiegebied van Kralingen waar in de zomer regelmatig overschrijdingen zijn van de *Aeromonas*-norm. Door Evides is een spuiroute van 900 meter (inhoud ongeveer 9 m³) uitgezet in een woonwijk in 's-Gravendeel, waarna de aanvoerende hoofdleiding begint (Figuur 1). De brandkraan staat bij Zonnebloemlaan 8, een doodlopende straat tussen de Irisstraat en de Zonnebloemlaan. Dit deel van het distributiegebied ligt aan het eind en is doodlopend, daarom wordt verwacht dat er veel waterpissebedden aanwezig zijn op deze locatie.



FIGUUR 1. SPIURROUTE IN 'S-GRAVENDEEL, ONDERDEEL VAN HET DISTRIBUTIEGEBIED VAN KRALINGEN. LINKS: EEN KAART VAN DE WOONWIJK VAN GOOGLE MAPS. RECHTS: DE SPIURROUTE IN DEZELFDE WOONWIJK.

Over het algemeen worden tijdens spuiacties voornamelijk dode waterpissebedden aangetroffen en slechts in mindere mate levende exemplaren. Onduidelijk is of de waterpissebedden al dood zijn voordat de spuiactie plaatsvindt en ze op de bodem van de drinkwaterleiding liggen waardoor ze met de hoge stroomsnelheid worden meegevoerd. Een andere mogelijkheid is dat de waterpissebedden door de hoge spuisnelheid en door de klap tegen de halfopen afsluiters doodgaan of doordat het spuiwater met hoge snelheid op het water in het vat klappt waarin het planktonnet hangt.

Om te proberen zo veel mogelijk levende *Asellus* exemplaren te verzamelen, is een spuiprotocol opgesteld met een aantal aanpassingen aan het standaard spuiprotocol:

- de 90% uitgang van de brandkraan is verlengd waardoor de leiding in het vat onder het wateroppervlak uit komt. Het planktonnet hangt in het water en het water stroomt door het net heen en vervolgens uit het vat (Figuur 2). Hierdoor wordt de klap van het spuiwater op het water in het vat vermindert.
- drie kleine spuiacties uitvoeren (1 m³ water per spuiactie) waarbij de snelheid tussen de spuiacties wordt opgevoerd. De eerste spuiactie wordt uitgevoerd op 0,5 m/s, de tweede op 0,75 m/s, de derde op 1,0 m/s. Bij lagere snelheden is mogelijk de klap van de waterpissebedden op de afsluiter lager, waardoor de overlijdenskans daalt. Echter, mogelijk zijn de levende exemplaren te sterk gehecht aan de buiswand om met deze lage snelheid weggespoeld te worden. Om deze reden is de laatste spuiactie op de normale snelheid van 1,0 m/s uitgevoerd.



FIGUUR 2. SPUIOPSTELLING IN 'S-GRAVENDEEL. DE LEIDING VAN DE 90%-UITGANG IS VERLENGD EN KOMT IN HET BLAUWE VAT ONDER HET WATEROPPERVLAK UIT.

Door problemen met de flowmeter is het echter niet gelukt om de tweede aanpassing van spuiplan (op lagere snelheden spuien) uit te voeren. Er zijn, in tegenstelling, juist twee spuiacties met hoge snelheid uitgevoerd (Tabel 3). De opbrengst van beide spuiacties is na afloop gemengd.

TABEL 3. SPUISNELHEDEN EN SPUIVOLUME TIJDENS DE SPUIACTIE IN 'S-GRAVENDEEL.

	Duur (s)	Spuisnelheid (m/s)	Debiet (m ³ /h)	Debiet (l/s)	Spuivolume (m ³)
Spuiactie 1	80	2,37	81	22,5	1,8
Spuiactie 2	600	2,63	90	25	7,5

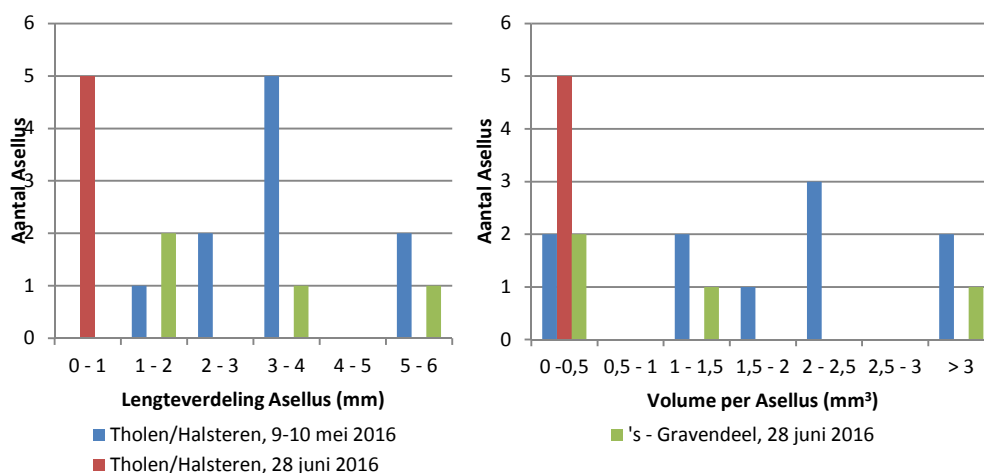
3.2 Spuiregime Tholen/Halsteren

De waterpissebedden uit Tholen/Halsteren zijn verzameld door spuien met CO₂-verzadigd water. De waterpissebedden raken hierdoor verdoofd en worden makkelijker uit het leidingnet gespoeld. De waterpissebedden zijn na het spuien vervoerd op kamertemperatuur en in vers drinkwater zonder CO₂ (een speciale filtratie is hiervoor uitgevoerd door de firma Scheideler, persoonlijk mededeling Evides).

3.3 Identificatie waterpissebedden uit spuiactie Tholen/Halsteren en Kralingen

3.3.1 Grootte

Van twee locaties (Kralingen en Tholen/Halsteren) is van een aantal levende waterpissebedden, die bij spuiacties zijn verzameld, de grootte bepaald (Figuur 3). Er is een grote spreiding in de grootte, waarbij er geen verschil is tussen de twee distributiegebieden. De exemplaren van 28 juni waren allen klein (0-1 mm).



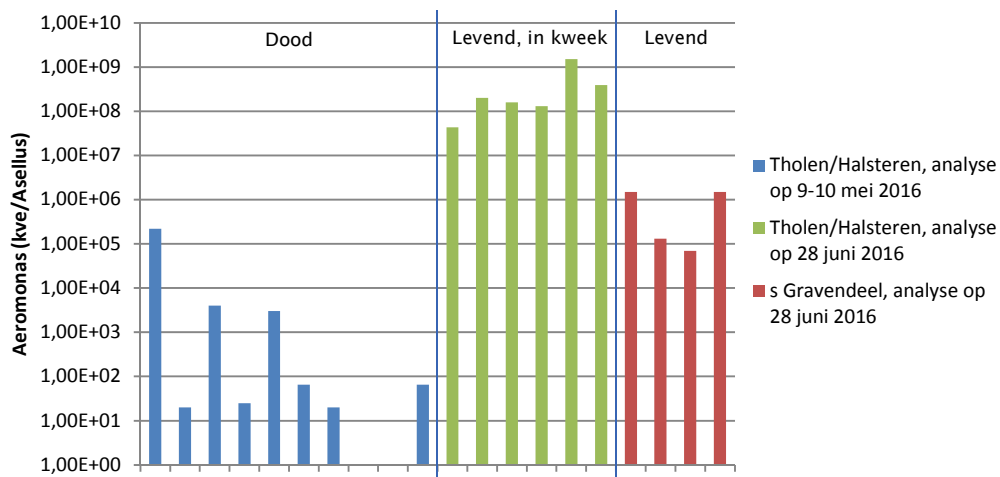
FIGUUR 3. GROOTTE (LENGTE EN DIKTE) VAN LEVENDE WATERPISSEBEDDEN UIT HET DISTRIBUTIENET VAN 'S GRAVENDEEL EN THOLEN/HALSTEREN.

3.3.2 *Aeromonas* aantallen

Van deze levende en dode exemplaren zijn per waterpissebed de *Aeromonas* aantallen bepaald (Figuur 4). De *Aeromonas* aantallen in een waterpissebed uit het distributiesysteem van Tholen/Halsteren variëren sterk ($< 5.0 - 2,2 \cdot 10^5$ kve/waterpissebed; blauwe kolommen). Als de levende waterpissebedden gedurende zeven weken in kweek zijn gehouden op het laboratorium (gevoed met esdoornblad), dan zijn de *Aeromonas* aantallen sterk gestegen

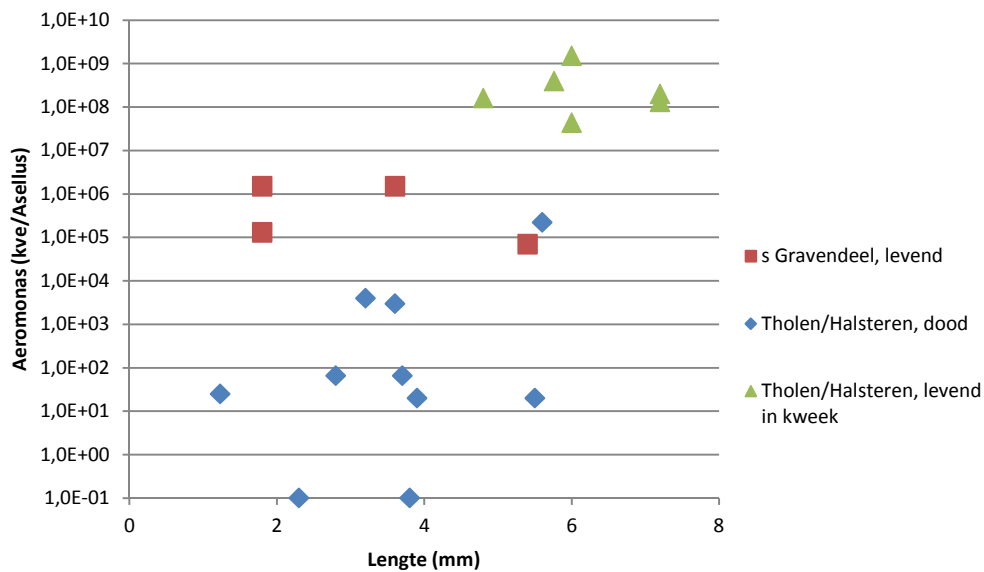
(groene kolommen) en is de variatie minder groot. De levende waterpissebedden uit 's Gravendeel bevatten op de dag dat ze zijn verzameld hoge, vrij constante aantallen *Aeromonas* (rode kolommen). Dit is 1 tot 4 log hoger dan de aantallen uit de dode exemplaren die uit Tholen/Halsteren zijn geïsoleerd (blauwe kolommen).

Deze resultaten suggereren dat de *Aeromonas*-aantallen in de waterpissebedden afhangen van de condities van de waterpissebedden: in levende actieve exemplaren direct uit het leidingnet zijn de *Aeromonas*-aantallen hoger dan in dode exemplaren uit het distributiegebied. Bij het in kweek houden van waterpissebedden in een laboratoriumomgeving, lijken de *Aeromonas* zich te kunnen vermeerderen in of op de levende waterpissebed, het water of het spuiwater. Dit suggereert dat er geen sprake is van een parasitaire relatie tussen *Aeromonas* en *Asellus*: de aanwezige waterpissebedden met deze hoge *Aeromonas* aantallen waren actief en levend. De associatie kan daarmee wijzen op een neutrale associatie of een mogelijke symbiose tussen beide organismen.



FIGUUR 4. *AEROMONAS*-AANTALLEN PER INDIVIDUELE LEVENDE OF DODE WATERPISSEBED UIT DRIE VERSCHILLENDE MILIEUS.

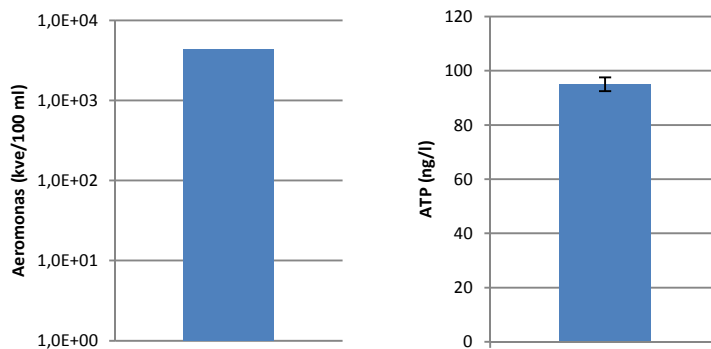
Er is geen relatie tussen de *Aeromonas* aantallen van een waterpissebed en de grootte of het volume van het exemplaar (Figuur 5). Wel zijn de aantallen in de levende waterpissebedden uit de kweek met de grootste lengte het hoogst. In dit figuur zijn alleen de metingen opgenomen die binnen dit onderzoek zijn gedaan. In het figuur in het H₂O-artikel zijn extra metingen toegevoegd die afkomstig zijn uit andere onderzoeken.



FIGUUR 5. *AEROMONAS* GEHALTE PER WATERPISSEBED. PER INDIVIDUELE WATERPISSEBED IS HET VOLUME EN HET *AEROMONAS* GEHALTE WEERGEGEVEN.

3.3.3 *Aeromonas* aantallen in spuiwater

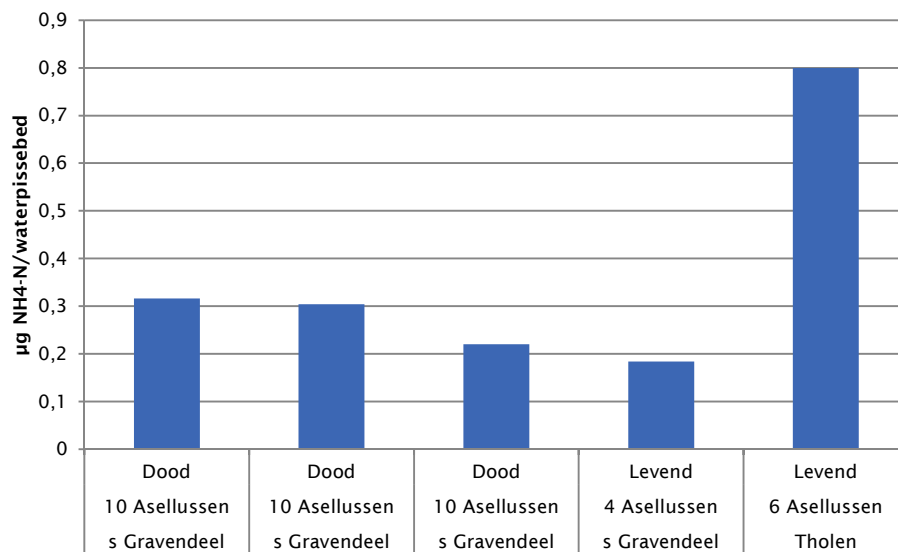
Van het spuiwater zijn de *Aeromonas* aantallen en ATP (als maat voor actieve biomassa) bepaald (Figuur 6). De *Aeromonas*-aantallen in 's Gravendeel zijn iets hoger dan de normwaarde (1000 kve/100 ml) in drinkwater: 4400 kve/100 ml.



FIGUUR 6. *AEROMONAS* AANTALLEN EN ATP GEHALTE VAN HET SPUIWATER

3.3.4 Ammoniumbepaling

Om de ammoniumconcentratie van waterpissebedden te bepalen zijn een aantal waterpissebedden in een mengmonster fijngemalen. Dit is gedaan omdat verwacht werd dat het ammoniumgehalte van één waterpissebed te laag is voor de analyse (detectielimiet: 0,02 mg N/l). De drie monsters met daarin elk tien dode waterpissebedden uit 's Gravendeel, hebben een gemiddelde ammoniumconcentratie van 0,22 tot 0,316 $\mu\text{g NH}_4\text{-N}$. Dit is licht hoger dan de vier levende waterpissebedden uit 's-Gravendeel (0,184 $\mu\text{g NH}_4\text{-N}$), maar lager vergeleken met zes levende waterpissebedden uit het distributiegebied van Tholen (0,8 $\mu\text{g NH}_4\text{-N}$). Van de levende waterpissebedden uit de kweek is het ammoniumgehalte niet bepaald.



FIGUUR 7. AMMONIUMCONCENTRATIE PER WATERPISSEBED. HET AMMONIUMGEHALTE IS BEPAALD IN EEN MENGSEL VAN 4-10 WATERPISSEBEDDEN. DE MENGSELS VAN 10 WATERPISSEBEDDEN UIT 'S-GRAVENDEEL BESTAAN UIT DODE EXEMPLAREN, VOOR DE MENGSELS VAN 4 EN 6 EXEMPLAREN ZIJN LEVENDE WATERPISSEBEDDEN GEBRUIKT.

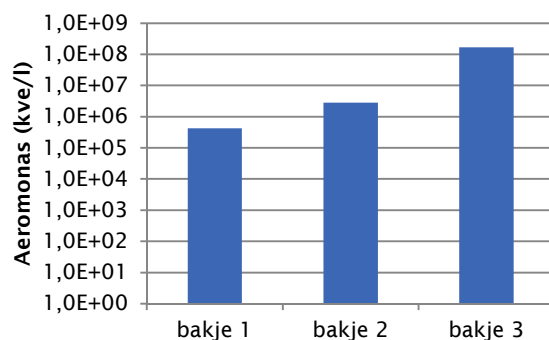
3.3.5 Waterpissebedden kweek in laboratoriumomstandigheden

De levende waterpissebedden uit Tholen/Halsteren zijn sinds de spuiactie van 9 en 10 mei in kweek gehouden (Figuur 8). De waterpissebedden zijn gedurende deze periode levend gebleven en bewegen actief, en bevinden zich voornamelijk op de onderkant van het blad en soms in het sediment.



FIGUUR 8. FOTO'S VAN WATERPISSEBEDDEN ZOALS DEZE IN KWEEK WORDEN GEHOUDEN IN HET LABORATORIUM.

Van het water met sediment en esdoornblad waarin de waterpissebedden uit Tholen in kweek worden gehouden, zijn na 13 weken de *Aeromonas* aantallen bepaald (Figuur 9). De *Aeromonas*-aantallen in dit water waren relatief hoog ($4,2 \times 10^5$ tot $1,7 \times 10^8$ kve/l). Dit komt overeen met de hoge *Aeromonas* aantallen in de waterpissebedden uit Tholen/Halsteren die op 28 juni, 7 weken na het oogsten, zijn geanalyseerd. *Aeromonas* is dus in staat zich op of in de waterpissebedden, op het esdoornblad of op het sediment te vermenigvuldigen. Dit laat echter ook zien dat hoge *Aeromonas* concentraties niet schadelijk zijn voor de waterpissebedden en dat deze samen kunnen leven.



FIGUUR 9. *AEROMONAS* CONCENTRATIE IN HET WATER VAN DE WATERPISSEBEDDEN-KWEEKBAKJES NA 13 WEKEN KWEK.

3.4 Vetzuur- en aminozuuranalyse

3.4.1 Vergelijking verschillende vetzuuranalysemethoden

Bij KWR is momenteel geen analyse beschikbaar voor het kwantitatief analyseren van vetzuren. In de literatuur is daarom gezocht naar de mogelijkheden voor zo'n dergelijke bepaling in waterpissebedden. Het uitgangspunt was hierbij een (semi) kwantitatieve methode in milieu gerelateerde matrices, die zonder veel aanpassingen geïmplementeerd kan worden binnen het laboratorium voor materialenonderzoek en chemie van KWR.

Enkele artikelen werden geschikt bevonden. De beschreven methoden waren echter geoptimaliseerd voor voedingsmiddelen en daarmee relatief hoge concentraties vetzuren. De meest geschikte methode staat beschreven in een application note van Agilent Technologies. Om deze methode geschikt te maken voor vetzuurbepaling van *Aseillus* zou de methode bij KWR ontwikkeld en geoptimaliseerd moeten worden. Vanwege de tijd en daarmee gepaard gaande kosten, is ervoor gekozen om de analyse uit te besteden.

Er is gezocht naar laboratoria met vetzuurbepalingen die geaccrediteerd zijn door de Raad van Accreditatie. Veruit de meeste laboratoria met een dergelijke bepaling voeren deze routinematig uit op voedingsgebied. Enkele laboratoria waren bereid om de uitdaging van een nieuwe matrix aan te gaan, waarbij 100 tot 500 gram monster nodig was voor de analyse. Het gewicht van een *Aseillus* is circa 1,6 mg en dit zou betekenen dat ruim 6.250 tot 31.520 beestjes per meting nodig zijn. Uitbesteding bij een dergelijk laboratorium is daarom geen optie.

Meerdere onderzoeks / R&D laboratoria, zonder accreditatie, werden benaderd en uiteindelijk werd in het Universitair Medisch Centrum Utrecht / Wilhelmina kinderziekenhuis een geschikt laboratorium (Department Molecular Cancer Research) gevonden. De heer Edwin Stigter van dit laboratorium heeft ervaring met het reproduceerbaar en kwantitatief karakteriseren van vrije vetzuren in nematoden (*Caenorhabditis elegans*, circa 20 - 25 mg) met LC-MS/MS. Het WKZ heeft geen problemen ondervonden met het uitvoeren van deze methode op waterpissebedden.

3.4.2 Vetzuuranalyse van waterpissebedden

De gebruikte methode analyseert alle vrije vetzuren, dit staat niet gelijk aan het totale vetzuurgehalte in de waterpissebedden. De isolatiemethode is niet geschikt voor vetzuren die aanwezig zijn in meer complexe biomoleculen (sphingolipiden, fosfolipiden, etc).

In de dode waterpissebedden is de vetzuurconcentratie 15,9 µg/mg drooggewicht en sterk hoger vergeleken met de levende exemplaren (3,7 µg/mg drooggewicht; Tabel 4, Figuur 10 - Figuur 13).

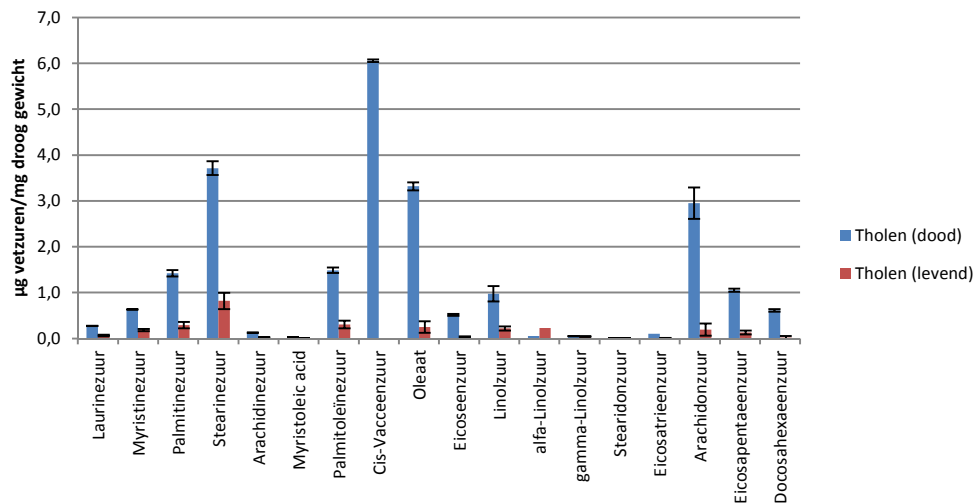
De vetzuren met de hoogste concentratie zijn Cis-Vacceenzuur, oleaat, palmitinezuur en stearinezuur. Oleaat is niet een dominant vetzuur, maar komt wel voor in een hogere concentratie en uit eerder onderzoek is bekend dat *Aeromonas* goed kan groeien op dit vetzuur (van der Kooij en Hijnen, 1988). De vetzuursamenstelling van waterpissebedden uit 's Gravendeel en Tholen/Halsteren verschilt van de resultaten uit de literatuur (Lau et al., 2013; Tabel 4), dat waarschijnlijk wordt veroorzaakt door milieuverschillen (oppervlaktewater versus drinkwaterdistributiegebied) en/of kweekcondities.

TABEL 4. VETZUURANALYSE VAN WATERPISSEBEDDEN UIT THOLEN/HALSTEREN EN 'S GRAVENDEEL

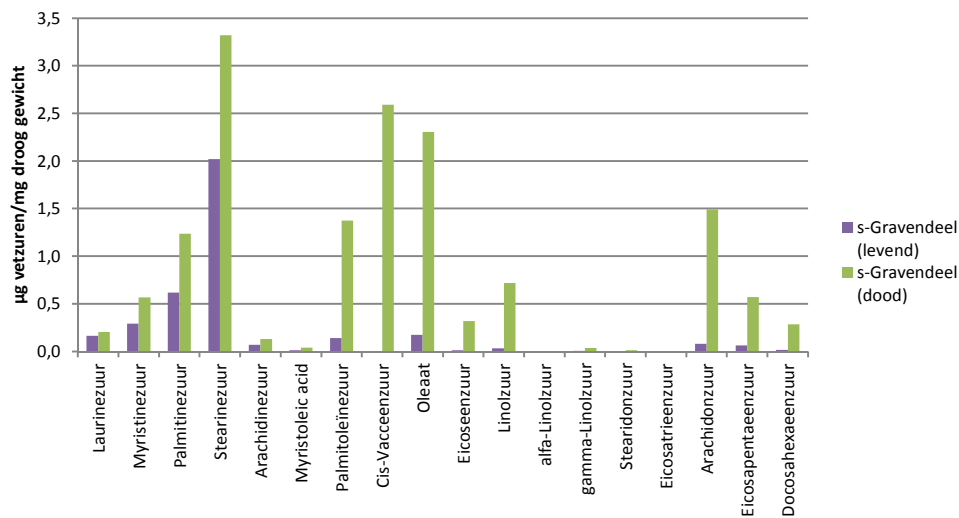
	Tholen (dood) 1		Tholen (dood) 2		Tholen Gemiddeld (dood)	Tholen (levend) 1		Tholen (levend) 2		Tholen Gemiddeld (levend)	s Gravendeel (dood) 1		s Gravendeel (dood) 2		s Gravendeel Gemiddeld (dood)		s Gravendeel (levend)		Lau et al., 2013
	µg/mg	SD	µg/mg	SD	µg/mg	µg/mg	SD	µg/mg	SD	µg/mg	µg/mg	SD	µg/mg	SD	µg/mg	SD	µg/mg	SD	µg/mg
Laurinezuur	0,24	0,00	0,31	0,02	0,28	0,06	0,01	0,06	0,00	0,06	0,23	0,01	0,18	0,01	0,20	0,03	0,16	0,00	
Myristinezuur	0,65	0,01	0,62	0,02	0,64	0,21	0,01	0,16	0,01	0,18	0,63	0,03	0,50	0,01	0,57	0,10	0,29	0,00	1,1
Palmitinezuur	1,65	0,07	1,19	0,07	1,42	0,33	0,01	0,25	0,01	0,29	1,24	0,03	1,23	0,02	1,24	0,01	0,62	0,03	9,38
Stearinezuur	4,38	0,15	3,05	0,18	3,71	0,94	0,03	0,71	0,03	0,82	3,27	0,13	3,38	0,02	3,32	0,08	2,02	0,02	2,33
Arachidinezuur	0,14	0,00	0,12	0,01	0,13	0,03	0,00	0,02	0,00	0,02	0,14	0,01	0,12	0,00	0,13	0,02	0,07	0,00	0,2
Myristoleic acid	0,04	0,00	0,03	0,00	0,04	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,04	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00	0,01	0,00	0,09
Palmitoleïnezuur	1,68	0,06	1,30	0,08	1,49	0,33	0,01	0,29	0,01	0,31	1,21	0,04	1,55	0,02	1,38	0,24	0,14	0,00	5,4
Cis-Vacceenzuur	7,11	0,03	5,00	0,27	6,06								2,59		2,59				3,52
Oleaat	4,01	0,09	2,63	0,13	3,32	0,21	0,01	0,28	0,01	0,25	1,93	0,44	2,68	0,02	2,30	0,53	0,17	0,00	7,04
Eicoseenzuur	0,57	0,02	0,47	0,01	0,52	0,03	0,00	0,04	0,00	0,03	0,30	0,01	0,34	0,01	0,32	0,03	0,01	0,00	0,45
Linolzuur	1,19	0,17	0,76	0,05	0,98	0,14	0,00	0,30	0,01	0,22	0,66	0,16	0,78	0,14	0,72	0,08	0,03	0,00	3,45
alfa-Linolzuur	0,06				0,06			0,23	0,01	0,23									2,09
gamma-Linolzuur	0,06	0,00	0,04	0,00	0,05	0,04	0,00			0,04	0,04	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00	0,01	0,00	0,37
Stearidonzuur	0,02	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,07
Eicosatrieenzuur			0,10	0,00	0,10			0,01	0,00	0,01									0,11
Arachidonzuur	3,55	0,34	2,35	0,13	2,95	0,16	0,01	0,23	0,01	0,20	1,41	0,03	1,58	0,07	1,49	0,12	0,08	0,00	2,24
Eicosapentaeenzuur	1,09	0,04	1,01	0,04	1,05	0,11	0,00	0,15	0,01	0,13	0,56	0,02	0,58	0,00	0,57	0,01	0,06	0,00	4,08
Docosahexaeenzuur	0,73	0,03	0,50	0,03	0,61	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02	0,26	0,01	0,31	0,01	0,28	0,04	0,02	0,00	1,14
Cumulatief vetzuurgehalte	27,15		19,49		23,40	2,63		2,76		2,84	11,91		15,89		15,19		3,71		43,06

Het grote verschil in vetzuurconcentratie tussen levende en dode waterpissebedden wordt vermoedelijk veroorzaakt doordat in een dode waterpissebed hydrolyse van fosfolipiden en acylglyceriden optreedt. Dit is een normaal afbraakproces en zorgt ervoor dat er meer vetzuren vrijkomen waardoor vervolgens hogere concentraties worden gemeten.

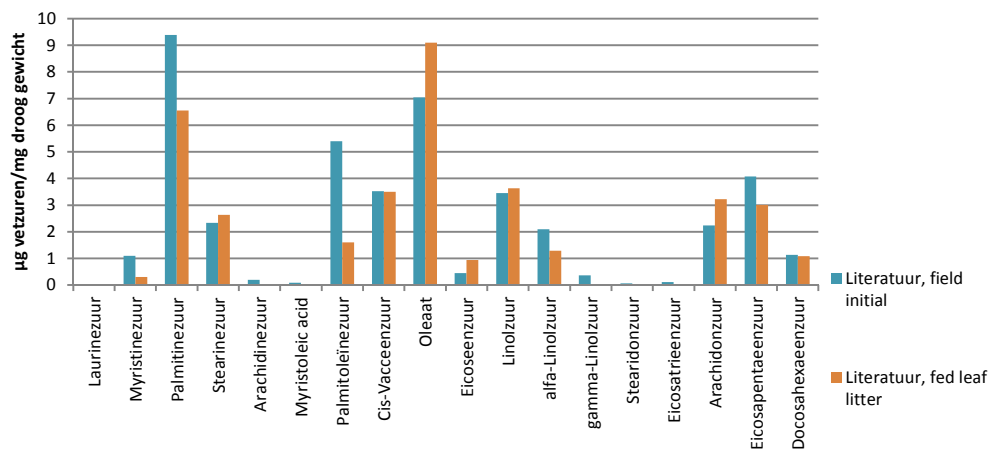
Nadeel van de gebruikte methode om het drooggewicht te bepalen is dat mogelijk niet al het water in de waterpissebed is verdampt wat effect heeft op het berekenen van het drooggewicht. Dit kan effect hebben op resultaten die per mg drooggewicht worden weergegeven. Dit zal minder effect hebben op de trends, maar mogelijk wel op de absolute aantallen. Er zijn methoden die beter geschikt zijn voor het bepalen van het drooggewicht van een waterpissebed, namelijk 16 uur drogen bij 105°C (Leuven, et al. 1986; Landahl & Nagell, 1978; Lappalainen & Kangas, 1975).



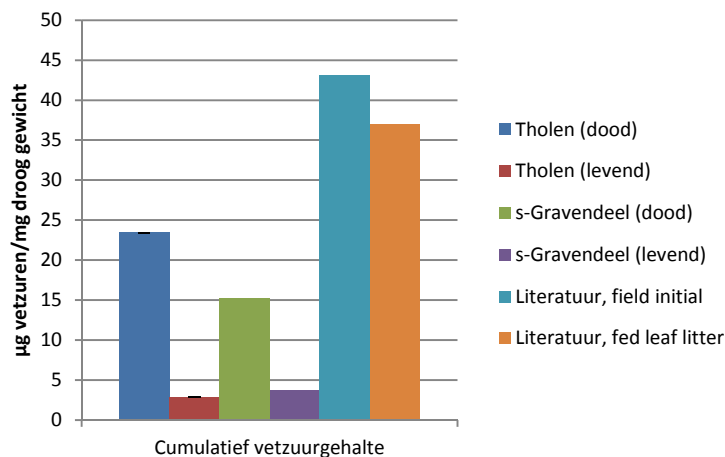
FIGUUR 10. VETZUURCONCENTRATIE IN WATERPISSEBEDDEN AFKOMSTIG UIT HET DISTRIBUTIEGEBIED VAN THOLEN. ER IS ONDERSCHIED GEMAAKT TUSSEN EXEMPLAREN DIE DOOD OF LEVEND UIT HET LEIDINGNET ZIJN GEÏSOLEERD (ERROR BAR = STANDAARD DEVIATIE).



FIGUUR 11. VETZUURCONCENTRATIE IN WATERPISSEBEDDEN AFKOMSTIG UIT HET DISTRIBUTIEGEBIED VAN 'S-GRAVENDEEL. ER IS ONDSCHIED GEMAAKT TUSSEN EXEMPLAREN DIE DOOD OF LEVEN UIT HET LEIDINGNET ZIJN GEÏSOLEERD.



FIGUUR 12. VETZUURCONCENTRATIE VAN WATERPISSEBEDDEN AFKOMSTIG UIT OPPERVLAKTEWATER, ZOALS GERAPPORTEERD IN DE LITERATUUR (LAU ET AL., 2013). DE 'FIELD INITIAL' WATERPISSEBEDDEN ZIJN NA ISOLATIE UIT OPPERVLAKTEWATER DIRECT GEANALYSEERD. DE 'FED LEAF LITTER' WATERPISSEBEDDEN ZIJN GEDURENDE 30 DAGEN IN EEN LABORATORIUM SETTING IN LEVEN GEHOUDEN MET BLADEREN ALS VOEDSEL.

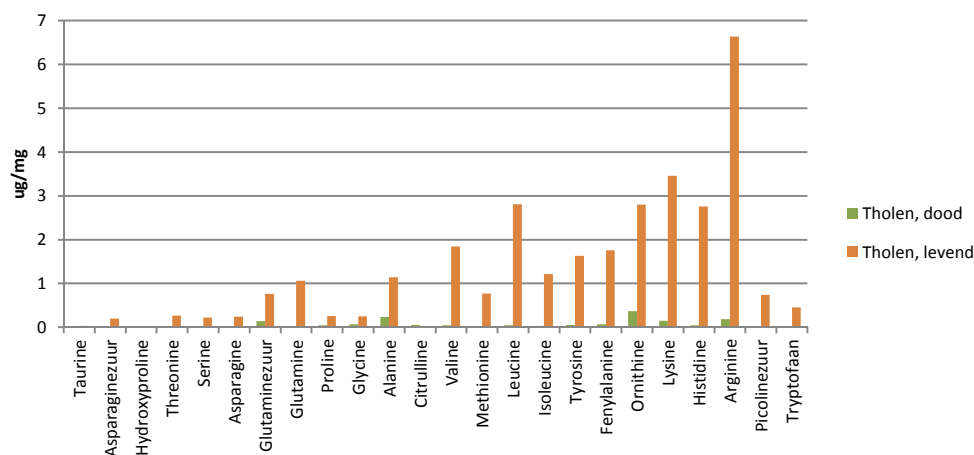


FIGUUR 13. CUMULATIEF VETZUURGEHALTE VAN DE WATERPISSEBEDDEN UIT THOLEN EN 'S-GRAVENDEEL. HET CUMULATIEVE VETZUURGEHALTE IS DE SOM VAN ALLE GEANALYSEERDE VETZUREN, EN DUS NIET GELIJK AAN HET TOTALE VETZUURGEHALTE.

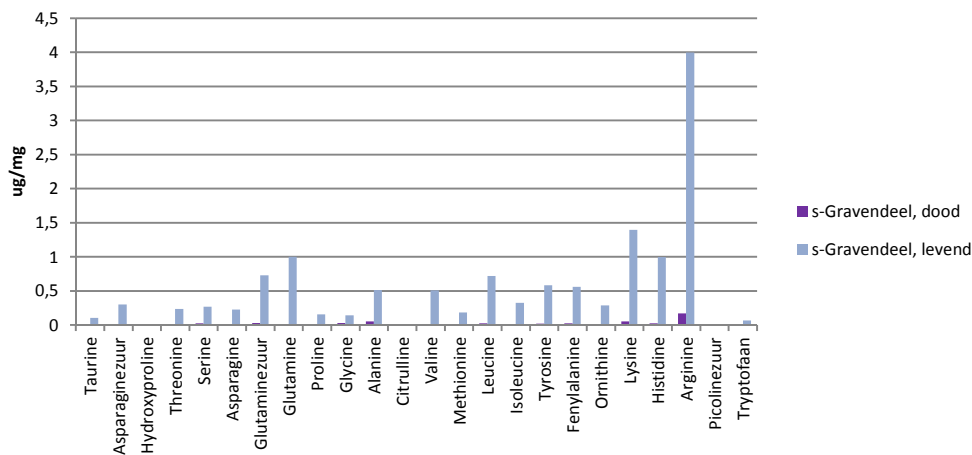
3.4.3 Aminozuuranalyse van *Asellus*

In tegenstelling tot de vetzuren, is in levende waterpissebedden de aminozuurconcentratie hoger dan in dode waterpissebedden (Figuur 14 - Figuur 16). De aminozuursamenstelling is echter wel in grote lijnen gelijk tussen dode en levende waterpissebedden.

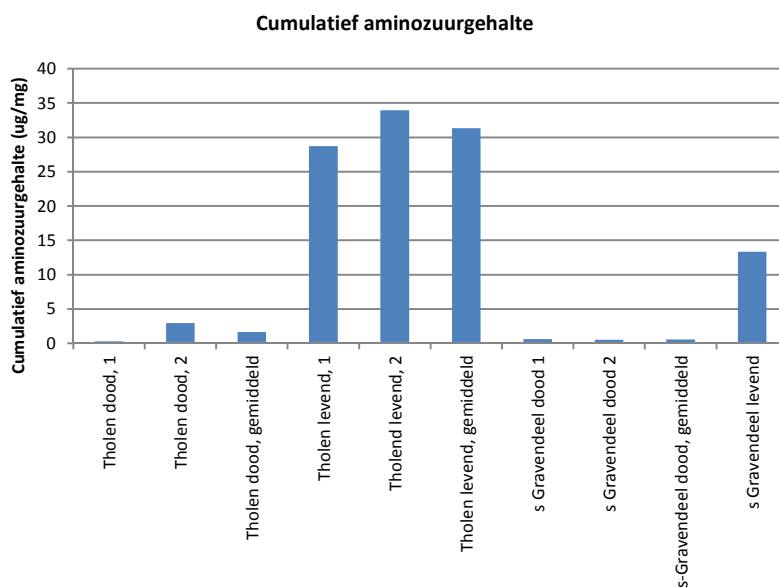
De aminozuurbepaling laat zien dat levende *Asellus* meer aminozuren bevat dan dode *Asellus*. Dit in tegenstelling tot het vetzuurgehalte dat in dode *Asellus* hoger is. Aangezien het *Aeromonas* gehalte in levende *Asellus* hoger is dan in dode exemplaren, suggereert dit dat *Aeromonas* voornamelijk aminozuren omzet en in mindere mate vetzuren. Als vetzuren een grote bron zijn, dan is de verwachting dat deze verhouding andersom zou zijn.



FIGUUR 14. AMINOZUURCONCENTRATIE IN WATERPISSEBEDDEN AFKOMSTIG UIT HET DISTRIBUTIEGEBIED VAN THOLEN. ER IS ONDERSCHIED GEMAAKT TUSSEN EXEMPLAREN DIE DOOD OF LEVEND UIT HET LEIDINGNET ZIJN GEÏSOLEERD.



FIGUUR 15. AMINOZUURCONCENTRATIE IN WATERPISSEBEDDEN AFKOMSTIG UIT HET DISTRIBUTIEGEBIED VAN 'S-GRAVENDEEL. ER IS ONDERSCHIED GEMAAKT TUSSEN EXEMPLAREN DIE DOOD OF LEVEND UIT HET LEIDINGNET ZIJN GEÏSOLEERD.



FIGUUR 16. CUMULATIEF AMINOZUURGEHALTE VAN DE WATERPISSEBEDDEN UIT THOLEN EN 'S-GRAVENDEEL. HET CUMULATIEVE AMINOZUURGEHALTE IS DE SOM VAN ALLE GEANALYSEERDE AMINOZUREN, EN DUS NIET GELIJK AAN HET TOTALE AMINOZUURGEHALTE.

3.5 Groeiproeven

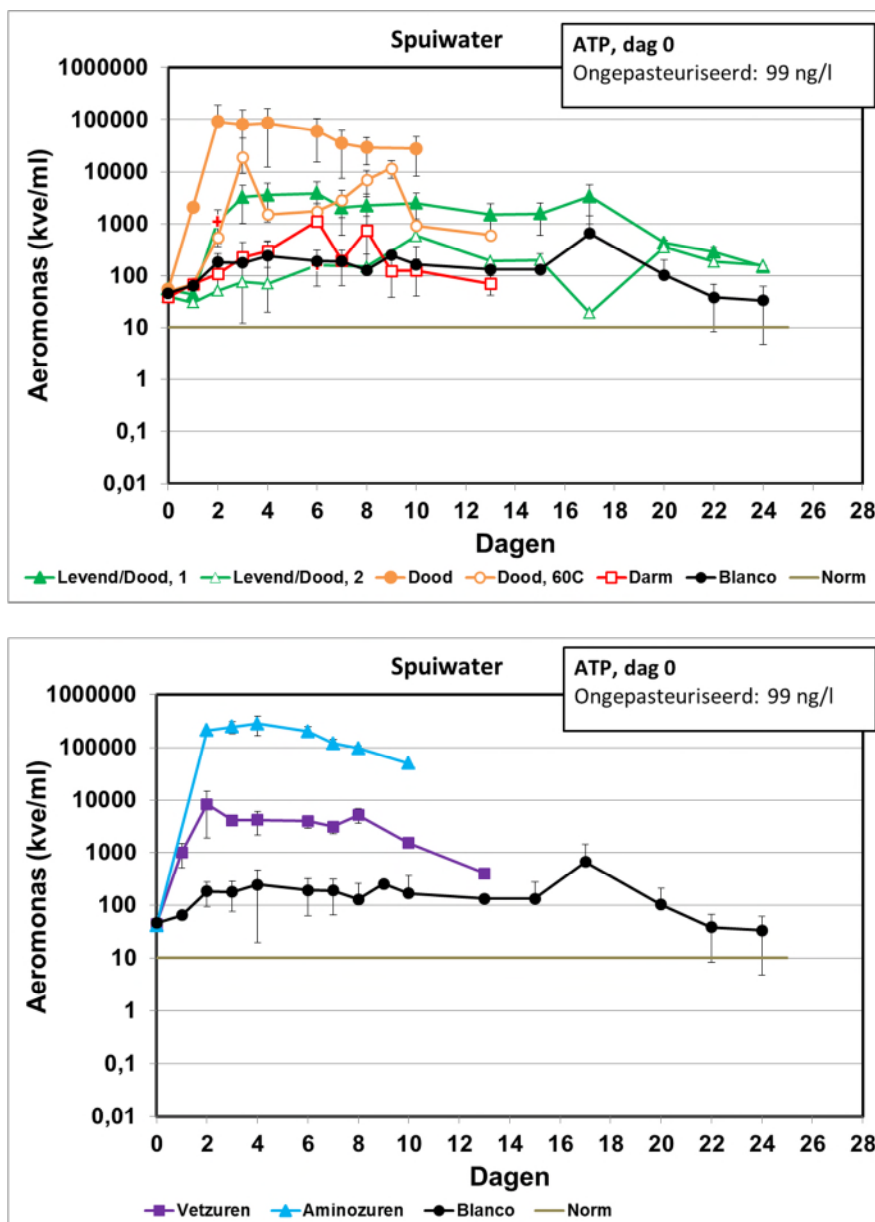
De groeiproeven zijn uitgevoerd in niet-gepasteuriseerd spuiwater en drinkwater. De autochtone flora van het drinkwater is dus aanwezig tijdens de groeiproeven en competeert met *Aeromonas* om de aanwezige groeistoffen. Aan beide watermatrices is een overdosis ammonium gedoseerd, zodat er geen stikstoflimitatie op kan treden en zo mogelijk de resultaten kan beïnvloeden.

3.5.1 Groei van *Aeromonas* in spuiwater

De *Aeromonas*-aantallen van de duplo kolven liggen voor de meeste condities dicht bij elkaar. Uitzondering hierop is bij dosering van een dode of een levende waterpissebed of de darmen van een waterpissebed. Hierbij treedt variatie op tussen de duplo's en lopen de groeicurven vanaf dag 2 met 1 tot 2 log uit elkaar (Figuur 17). De gedoseerde waterpissebedden waren van vergelijkbare grootte.

Aeromonas kan beperkt groeien in spuiwater zonder toegevoegde waterpissebed (Figuur 17). Alle doseringen stimuleren *Aeromonas* groei in aanwezigheid van de autochtone flora van het spuiwater. Op aminozuren is de groei het sterkst. De enige uitzondering hierop lijkt wanneer de darm van een waterpissebed wordt toegevoegd, waarbij de groei overeenkomt met de conditie zonder toevoegingen.

In de groeiproeven waaraan aminozuren zijn gedoseerd, groeit *Aeromonas* zeer sterk ($V = 0,26 \text{ h}^{-1}$; Figuur 17, Tabel 5). Bij dosering van een dode waterpissebed zijn de verdubbelingssnelheid ($0,22 \text{ h}^{-1}$) en de groeimaxima lager vergeleken met de conditie met aminozuren ($2,9 \cdot 10^5$ vs $8,6 \cdot 10^4$ kve/ml). De verdubbelingssnelheid van *Aeromonas* in aanwezigheid van een dode en gepasteuriseerde of een levende waterpissebed, of bij dosering van vetzuren is ongeveer gelijk aan elkaar (respectievelijk $0,17$; $0,11$; $0,16 \text{ h}^{-1}$). Dosering van een darm of geen dosering geeft de laagste verdubbelingssnelheid ($0,03 \text{ h}^{-1}$).



FIGUUR 17. GROEI VAN *AEROMONAS* IN DE GROEIPROEF. GEGEVEN IS DE GROEI IN INDIVIDUELE EXPERIMENTEN. IN DE GROEIKOLF WAARAAN EEN LEVENDE WATERPISSEBED IS GEDOSEERD, IS DEZE TUSSEN DAG 1 EN 2 (KOLF 1) EN TUSSEN DAG 4 EN 6 (KOLF 2) OVERLEDEN.

De verdubbelingssnelheid van *Aeromonas* is op een dode waterpissebed iets hoger als wanneer de waterpissebed gepasteuriseerd is, hetzelfde geldt voor de opbrengst. Bij het verzamelen van de waterpissebedden zijn alleen exemplaren van gelijke grootte geselecteerd voor de groeiproeven. Mogelijk wordt deze stijging niet veroorzaakt door groei maar door het vrijkomen van *Aeromonas* uit de dode waterpissebed, waar deze bacteriën in het gepasteuriseerde exemplaar zijn afgedood. Een andere mogelijkheid is dat door de pasteurisatiestap van de dode waterpissebed een deel van de groeistoffen worden geëlimineerd (denaturatie van eiwitten). Dit is met de huidige gegevens echter niet te bevestigen of ontcrachten.

TABEL 5. VERDUBBELINGSSNELHEID EN MAXIMALE CONCENTRATIE VAN *AEROMONAS* IN GROEIPROEVEN.

	Gemiddelde groeisnelheid	Groeimaximum	
	V (h ⁻¹)	Nmax (kve/ml)	SD (kve/ml)
Geen <i>Asellus</i> /Blanco	0,03	8,1E+02	5,8E+02
Levende <i>Asellus</i>	0,11 (0,02-0,13)	2,2E+03	2,3E+03
Dode <i>Asellus</i>	0,22 (0,19-0,23)	8,6E+04	7,4E+04
Dode <i>Asellus</i> , 60°C	0,17 (0,08-0,18)	2,6E+04	1,6E+04
Vetzuren	0,16	8,4E+03	6,2E+03
Aminozuren	0,26	2,9E+05	1,0E+05
Darm	0,03	1,2E+03	1,2E+03

Gebaseerd op een eerder experiment, was de verwachting dat na het doodgaan van een levende waterpissebed het aantal *Aeromonas* bacteriën snel zou toenemen (Hijnen *et al.*, 1992). In dit experiment is dat in één kolf wel, en in één kolf in mindere mate waargenomen. Mogelijk wordt dit veroorzaakt doordat vanaf dat moment de groeistoffen van de waterpissebed beschikbaar komen en komen ook de *Aeromonas* bacteriën die zich in de waterpissebed bevinden vrij. In kolf 1 is deze sterke groei vanaf dag 2 duidelijk zichtbaar, de dag na het doodgaan van de waterpissebed (tussen de monsternamen op dag 1 en 2). In kolf 2 is dit echter niet het geval; na het doodgaan van de waterpissebed tussen monsternamen op dag 4 en 6 werd geen *Aeromonas* toename waargenomen. De resultaten van groeiproeven waarbij een waterpissebed is gedoseerd, laten zien dat er veel variatie is tussen de verschillende exemplaren. Ondanks de gelijke grootte van de waterpissebedden, kan bijvoorbeeld de samenstelling en vitaliteit van de organismen verschillen. De resultaten zijn dan ook indicatief, maar het experiment zal herhaald moeten worden met een groot aantal waterpissebedden om betrouwbare uitspraken te kunnen doen.

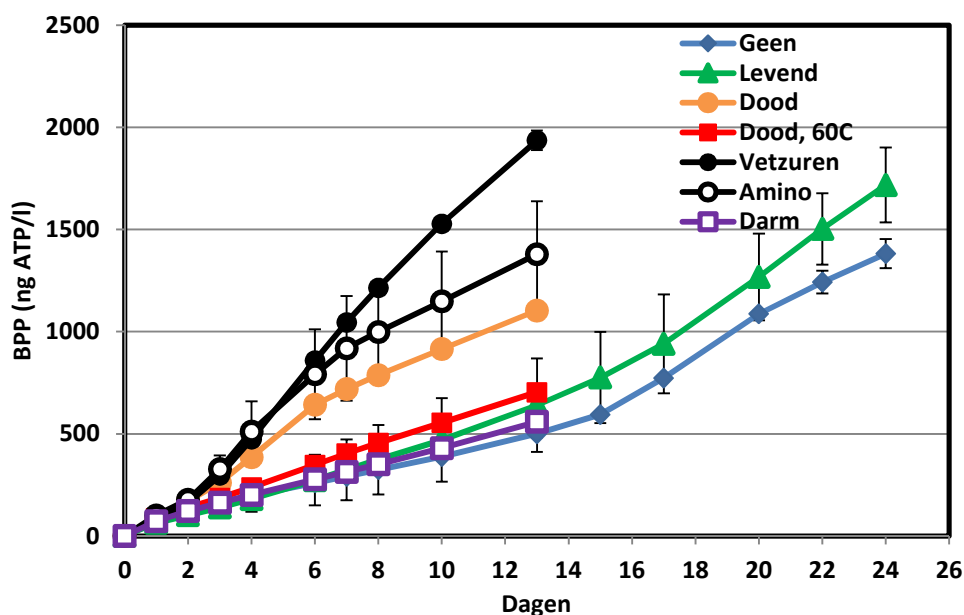
De beperkte groei bij dosering van een darm, suggereert dat er zich geen bacteriën meer in de darm bevinden en dat er geen tot weinig groeistoffen aanwezig zijn. Aangezien het groeipatroon vergelijkbaar is met de blanco's (groeikolven waarin niets is gedoseerd), bevestigt dit de afwezigheid van groeistoffen voor *Aeromonas* en stelt vragen bij de locatie in een waterpissebed waar *Aeromonas* zich bevindt. De darmen zijn verzameld uit het spuiwater en waren daarin al los aanwezig. Mogelijk zijn de resultaten anders bij gebruik van 'verse' darmen. Meer onderzoek is nodig om dit te bevestigen en te zoeken naar deze alternatieve locatie.

Opvallend is dat ook hier de aanwezigheid van een dode waterpissebed tot hogere aantallen *Aeromonas* in het water leidt dan een levende waterpissebed, terwijl uit Figuur 4 het tegenovergestelde blijkt. Namelijk dat levende waterpissebedden meer interne *Aeromonas* lijken te bevatten dan dode exemplaren. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat in de groeiproeven de afbraakstoffen van een dode waterpissebed in het water aanwezig blijven en niet wegspoelen zoals in het distributienet het geval is. *Aeromonas* zou hier dan beter op kunnen groeien.

3.5.2 Groei van de biomassa gemeten met ATP

In de groeikolven is naast *Aeromonas* ook ATP gemeten wat een maat is voor de microbiologische activiteit van het water en dus een indicatie geeft van de groei van zowel de gedoseerde *Aeromonas* bacteriën als de autochtone flora.

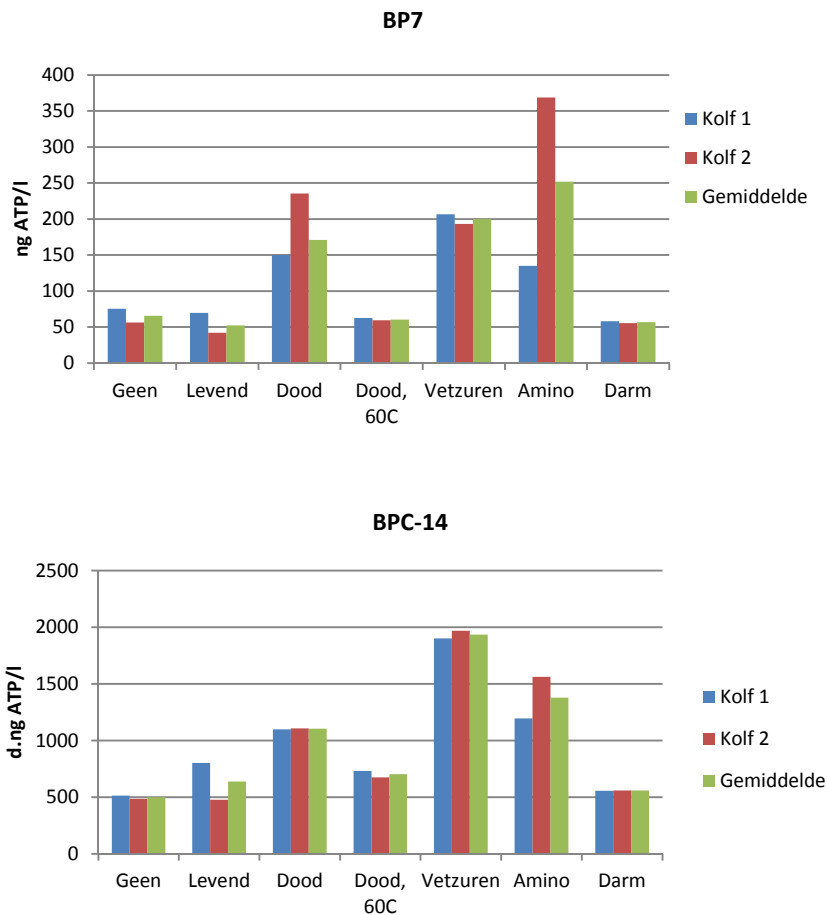
Deze metingen geven een ander beeld dan de *Aeromonas* bepalingen (Figuur 18). Er is een verband tussen de hoogste ATP concentratie op dag 14 en de groeisnelheid. In tegenstelling tot *Aeromonas* groeit de autochtone flora beter op vetzuren dan op aminozuren en dode waterpissebedden. Er is weinig verschil in groeisnelheid tussen de overige type doseringen (dode gepasteuriseerde waterpissebed, levende waterpissebed, darm en geen dosering) en in deze kolven is de ATP opbrengst na 14 dagen lager. Dit is terug te zien in de BP7 en BPC14-waardes (Tabel 6). In de eerste zeven dagen werd de hoogste groei op één dag bereikt met dosering van aminozuren (251,7 ng ATP/l), vetzuren (184,5 ng ATP/l) en dode waterpissebed (171,1 ng ATP/l). De grootste biomassa opbrengst is ook met deze drie doseringen.



FIGUUR 18. GEMIDDELDE BPP WAARDES VAN DE TWEE GROEI-PROEVEN. DE STANDAARDDEVIATIE IS GEGEVEN. IN DE GROEI-PROEF WAARAAN LEVENDE WATERPISSEBEDDEN ZIJN TOEGEVOEGD, IS HET EXEMPLAAR IN KOLF 1 TUSSEN DE MONSTERNAMES OP DAG 1 EN 2 OVERLEDEN, IN KOLF 2 IS HET EXEMPLAAR TUSSEN DE MONSTERNAMES OP DAG 4 EN 6 OVERLEDEN.

TABEL 6. BP7- EN BPC14-WAARDES PER GROEI-EXPERIMENT. DE BP7-WAARDE IS DE MAXIMALE ATP WAARDE VAN DE EERSTE 7 DAGEN VAN DE GROEI-PROEF. DE BPC14-WAARDE IS DE CUMULATIEVE HOEVEELHEID GEVORMD ATP IN 14 DAGEN.

	BP7 (ng ATP/l)			BPC-14 (Σ 14 (d.ng ATP/l))		
	Kolf 1	Kolf 2	Gemiddelde	Kolf 1	Kolf 2	Gemiddelde
Geen	75,7	56,2	66,0	514,0	487,5	500,7
Levend	69,8	42,1	52,2	801,5	478,2	639,8
Dood	149,9	235,5	171,1	1099,4	1108,2	1103,8
Dood, 60 °C	62,7	59,3	60,6	732,3	676,9	704,6
Vetzuren	206,6	193,2	199,9	1902,4	1969,8	1936,1
Aminozuren	134,9	368,5	251,7	1196,5	1562,2	1379,4
Darm	58,3	55,5	56,9	557,9	561,0	559,4



FIGUUR 19. BP7 EN BPC14 WAARDES VAN DE GROEIPROEVEN IN SPUIWATER.

In het merendeel van de groeiproeven wordt de maximale *Aeromonas* opbrengst binnen 2 tot 4 dagen bereikt (Figuur 17). Daarna vlakte de groei af en blijft de concentratie stabiel of daalt licht. De autochtone microbiële populatie blijft echter doorgroeien gedurende het hele experiment. Hierbij vlakte de groeicurve niet af.

De groei van specifieke bacteriën als *Aeromonas* in een mengcultuur met andere bacteriën hangt af van veel verschillende (a)biotische factoren:

- Voedingstoffen en nutriënten: C- en N/P-bron, hoeveelheid/samenstelling
- Beginniveau en aanwezigheid en samenstelling van concurrerende micro-organismen;
- Aanwezigheid en samenstelling van predatorenpopulatie (b.v. protozoa);
- Groeikinetiek van de bacterie en zijn concurrenten op de aanwezige voedingstoffen waarbij groeisnelheid en affiniteit voor substraat het belangrijkste is

De snelle groei van *Aeromonas* in de eerste fase duidt op de aanwezigheid van verbindingen waar *Aeromonas* een korte lagfase en een hoge affiniteit voor heeft. Het duidt er ook op dat ammonium in overmaat aanwezig is. Dat geldt met name voor de aminozuren. Bij een dosering van 413 µg aminozuren per liter is bij een gemiddelde opbrengst van 6×10^3 kve/ml per µg aminozuur-C (Table 4 in van der Kooij and Hijnen, 1988) een opbrengst van $2,5 \times 10^6$ kve/ml te verwachten. Dat betekent dat *Aeromonas* bij een N_{max} van $2,9 \times 10^5$ /ml 10% van de

aminozuren heeft benut. Bij een gemiddelde opbrengst van 6×10^3 KVE/ml per μg vetzuur-C voor de langketige vetzuren (van der Kooij and Hijnen, 1988) heeft *Aeromonas* bij een N_{max} van $8,3 \times 10^3$ /ml slechts 1-2% van deze verbindingen benut. Onduidelijk blijft dan waarom de groei op de dode waterpissebed zo snel was wetende dat een dode waterpissebed meer vetzuren bevat en maar weinig aminozuren. Mogelijk spelen andere stoffen hierbij een rol als voedings- of energiebron, b.v. eiwitten, aromatische verbindingen, RNA, DNA, etc.

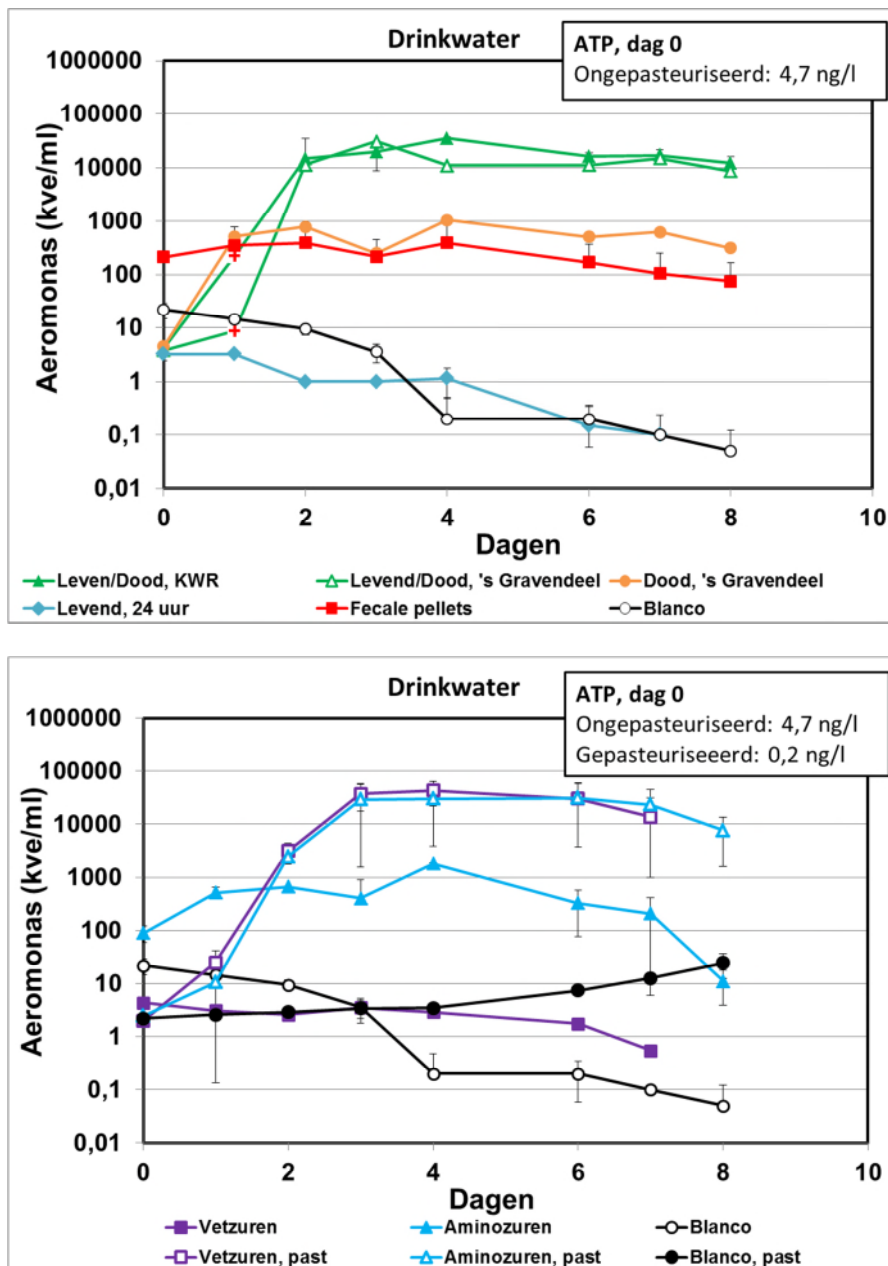
Wat wel duidelijk wordt, is dat *Aeromonas* in staat is te concurreren met de autochtone microflora onder deze condities door snel te groeien bij aanvang maar dat het daarna de concurrentie verliest, waarbij de groei op aminozuren een hogere *Aeromonas* groeirespons veroorzaakt dan de vetzuren. Alhoewel deze proeven daar geen bewijs voor zijn, lijken de vermoedelijke stoffen waar het om gaat bij de vermeerdering van *Aeromonas* in het milieu, aminozuren en vetzuren te zijn in aanwezigheid van voldoende ammonium, al spelen mogelijk ook andere stoffen hierbij een rol. Uit deze resultaten blijkt wel dat *Aeromonas* in de autochtone omgeving kan groeien en een voordeel heeft op de autochtone flora in de aanwezigheid van vetzuren, aminozuren of een dode waterpissebed.

3.5.3 Groei van *Aeromonas* in drinkwater

In drinkwater groeit *Aeromonas* sterk in aanwezigheid van een dode of levende (en binnen 1 dag overleden) waterpissebed (Figuur 20, Tabel 7). Er is geen verschil in groeirespons gezien tussen de levende exemplaren uit de KWR kweek en de milieustam uit het leidingnet van 's-Gravendeel. De herkomst van een waterpissebed lijkt hiermee niet bepalend te zijn.

Fecale pellets leiden niet tot een *Aeromonas* vermeerdering, maar houdt de aanwezige *Aeromonas* aantallen in stand (in blanco zonder pellets treedt duidelijk afsterving op). Dit suggereert dat *Aeromonas* net voldoende energie uit de omzetting van afbreekbare stoffen uit fecale pellets kan halen om zijn celprocessen te onderhouden, maar dit is te weinig om zich ook te kunnen vermeerderen. *Aeromonas* groeit niet op de stoffen die een levende waterpissebed mogelijk los laat in het water gedurende 24 uur. Dit suggereert dat uit een levende waterpissebed zonder graasactiviteit geen of onvoldoende verbindingen vrijkomen in 24 uur tijd die een snelle *Aeromonas* groei veroorzaken.

In ongepasteuriseerd drinkwater met vetzuur- en aminozuurdoseringen wordt geen groei van *Aeromonas* op de vetzuren waargenomen en is de groei op de aminozuren ook minder dan in het spuiwater. Op basis van de N_{max} -waarden in het ongepasteuriseerde en gepasteuriseerde drinkwater wordt slechts 4% van de aanwezige aminozuren-C benut door *Aeromonas*.



FIGUUR 20. GROEI VAN *AEROMONAS* IN DE GROEIPROEF IN DRINKWATER. GEGEVEN IS DE GROEI IN INDIVIDUELE EXPERIMENTEN. IN DE GROEIKOLF WAARAAN EEN LEVENDE *ASELLUS* IS GEDOSEERD, IS DEZE TUSSEN DAG 1 EN 2 OVERLEDEN EN MET EEN ROOD KRUIS GEMARKEERD. IN ELKE GRAFIEK IS HET GEMIDDELDE ATP GEHALTE OP DAG 0, VAN ALLE CONDITIES, AANGEGEVEN.

Er zijn duidelijke verschillen tussen *Aeromonas* groei in drinkwater en spuiwater met en zonder waterpissebedden of aminozuren/vetzuren:

- In aanwezigheid van sediment (spuiwater) groeit *Aeromonas* beter op een dode dan een levende waterpissebed. In drinkwater is het niet gelukt om het verschil tussen groei op levende en dode waterpissebedden vast te stellen, omdat de waterpissebed slecht kort overleefde in drinkwater;
- Daarnaast is de groeiopbrengst op een waterpissebed in drinkwater een factor 10 lager dan in spuiwater. De extra nutriënten die aanwezig zijn in het spuiwater in

vergelijking met drinkwater veroorzaken dus een verhoogde groei in aanwezigheid van *Asellus*.

Waarschijnlijk worden deze verschillen veroorzaakt doordat het spuiwater meer nutriënten bevat dan drinkwater. Dit verschil is zichtbaar in het verschil in groeicurves waaraan geen toevoegingen zijn gedoseerd. De extra voedingsstoffen (bijvoorbeeld BDOC, ammonium, fosfaat, ijzer, etc) spelen waarschijnlijk een rol bij de verhoogde groei.

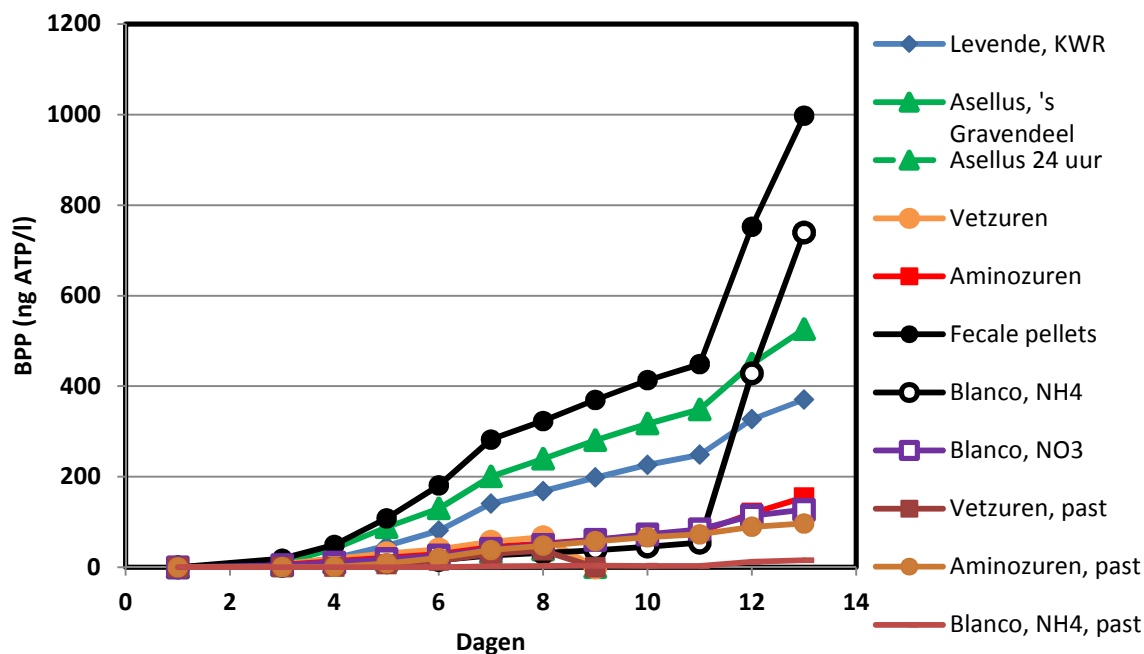
Een andere mogelijkheid is dat *Aeromonas* mogelijk op de biofilm van de sediment kan groeien, of op het sediment zelf. Een andere mogelijkheid is dat er uit de sediment groeistoffen vrij komen. Om dit aan te tonen is verder onderzoek nodig.

TABEL 7. VERDUBBELINGSSNELHEID EN MAXIMALE CONCENTRATIE VAN *AEROMONAS* IN GROEIPROEVEN.

	Groeisnelheid (V, h^{-1})	Nmax (kve/ml)
Levend, KWR kweek	0,25	35000
Dood	0,16	1050
Levend, milieustammen	0,21	30500
24 uur	-0,04	3
Vetzuren	0,00	4
Aminozuren	0,06	1800
Fecale pellets	0,02	393
Blanco, NH4	-0,06	22
Blanco, NO3	-0,01	14
Vetzuren, gepasteuriseerd	0,21	43250
Aminozuren, gepasteuriseerd	0,20	31125
Blanco, NH4 gepasteuriseerd	0,05	3125

3.5.4 Groei van de biomassa gemeten met ATP

In het drinkwater stijgt de ATP concentratie slechts zeer beperkt, wat een indicatie is dat de algehele microbiële populatie niet sterk groeit (Figuur 21). Dit in tegenstelling tot spuiwater waarin sterke groei optreedt (Figuur 18). Dit is terug te zien in de BP7 en BPC14 waarden die beduidend lager zijn dan in spuiwater (Tabel 8).



FIGUUR 21. GEMIDDELDE BPP WAARDES VAN DE TWEE GROEI-PROEVEN IN DRINKWATER ZONDER SPIJBARE DEELTJES. IN DE GROEI-PROEF WAARAAN LEVENDE WATERPISSEBEDDEN ZIJN TOEGEVOEGD, ZIJN DE WATERPISSEBEDDEN TUSSEN DE START VAN HET EXPERIMENT OP DAG 0 EN DE MONSTER-NEMING OP DAG 1.

TABEL 8. BP7- EN BPC14-WAARDES PER GROEI-EXPERIMENT IN DRINKWATER. DE BP7-WAARDE IS DE MAXIMALE ATP WAARDE VAN DE EERSTE 7 DAGEN VAN DE GROEI-PROEF. DE BPC14-WAARDE IS DE CUMULATIEVE HOEVEELHEID GEVORMD ATP IN 14 DAGEN.

	BP7 (ng ATP/l)			BPC-14 (Σ 14 (d.ng ATP/l))		
	Kolf 1	Kolf 2	Gemiddelde	Kolf 1	Kolf 2	Gemiddelde
Levend, KWR	34,8	42,5	35,1	349,3	391,8	370,6
Levend, 's Gravendeel	64,2	-	64,2	574,1	-	574,1
Dood	39,3	-	39,3	476,8	-	476,8
24 uur	7,2	7,6	7,4	N.B.	N.B.	N.B.
Vetzuren	12,0	12,7	12,3	N.B.	N.B.	N.B.
Aminozuren	9,8	7,5	8,5	193,0	114,8	153,9
Fecale pellets	56,1	108,8	82,5	1310,3	684,4	997,3
Blanco, NH ₄	6,1	5,4	5,8	561,0	917,6	739,3
Blanco, NO ₃	9,7	10,4	9,9	115,3	138,8	127,1
Vetzuren, past	12,9	5,5	8,8	N.B.	N.B.	N.B.
Aminozuren, past	14,0	16,0	14,4	131,7	61,9	96,8
Blanco, NH ₄ , past	0,3	3,2	1,6	23,7	7,2	15,5

In de groeiexperimenten die in drinkwater zijn uitgevoerd, worden lagere BPC14 waarden gemeten dan in de groei-proeven met spuiwater. Vanwege het verschil in dosering van de amino-zuren en vet-zuren-mengsels, is een onderlinge vergelijking niet mogelijk.

4 Conclusies

Aeromonas vermeerderd zich in drinkwater, ongeacht de aanwezigheid van een autochtone microbiële populatie als er waterpissebedden, of groeistoffen die daar uit vrij komen, aanwezig zijn. Amino-zuren lijken hierbij het belangrijkste substraat voor *Aeromonas* te zijn.

Fecale pellets en darmkanalen van waterpissebedden die vrij aanwezig zijn in het spuiwater leiden niet tot vermeerdering van *Aeromonas*, waardoor geconcludeerd kan worden dat deze in het distributienet van Kralingen geen belangrijke rol spelen bij vermeerdering van *Aeromonas* in het distributienet.

In spuiwater worden hogere *Aeromonas* aantallen bereikt vergeleken met drinkwater. Naar alle waarschijnlijkheid komt dit door de aanwezigheid van nutriënten in het sediment dat in het spuiwater aanwezig is.

Er zijn meerdere aanwijzingen die laten zien dat waterpissebedden een rol kunnen spelen bij de groei van *Aeromonas* in het drinkwaterdistributienet: 1). In waterpissebedden kunnen relatief hoge aantallen *Aeromonas* voor komen; 2). Bij het in kweek houden van waterpissebedden in een laboratoriumsituatie, zijn de *Aeromonas* aantallen in de waterpissebed zeer hoog; 3). Toevoeging van een waterpissebed (dood of levend) aan het water onder laboratoriumgecontroleerde condities zorgt voor een sterke groei in de eerste dagen.

5 H₂O-artikel. De rol van waterpissebedden bij de vermeerdering van *Aeromonas* in het drinkwaterdistributiesysteem

Nikki van Bel¹, Jan Bahlman², Annemieke Kolkman¹, Paul van der Wielen¹, Wim Hijnen^{1,2} (¹ KWR Watercycle Research Institute, ² Evides)

5.1 Samenvatting

In dit onderzoek is de rol van waterpissebedden bij groei van *Aeromonas* in het drinkwaterdistributiesysteem bestudeerd. In een DPWE¹ onderzoek is vastgesteld dat in waterpissebedden uit het distributiesysteem hoge aantallen *Aeromonas* bacteriën kunnen voorkomen. In groei experimenten, in aanwezigheid van andere waterbacteriën, blijkt dat *Aeromonas* snel groeit op deze organismen, vetzuren en aminozuren die in hoge concentraties in waterpissebedden uit het distributienet voorkomen. Sediment blijkt een belangrijke rol te spelen bij de groei van *Aeromonas*.

5.2 Inleiding

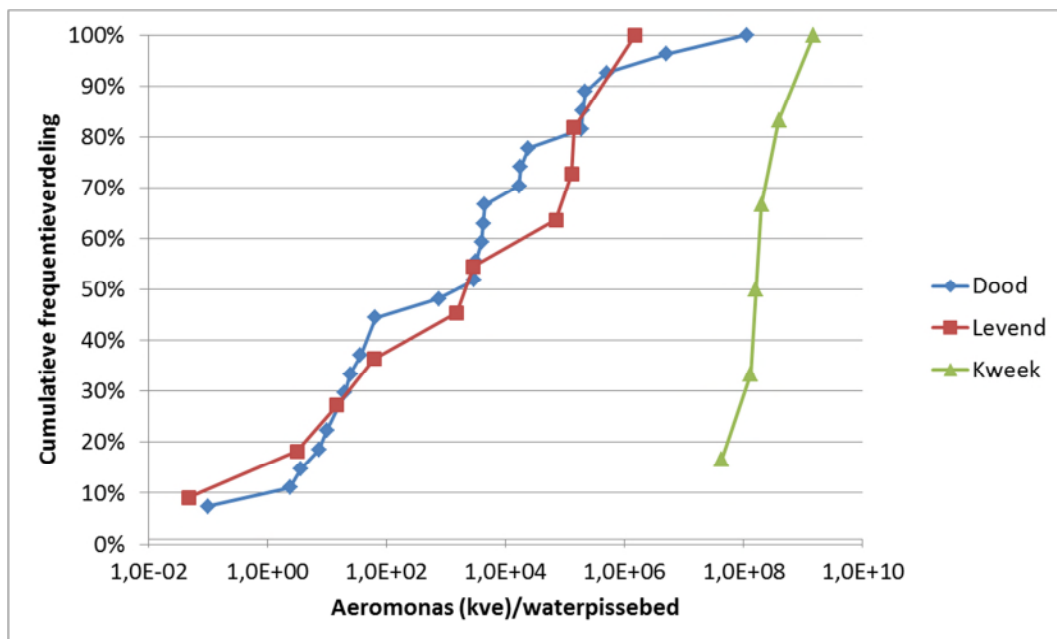
Het Nederlandse drinkwater wordt wereldwijd gezien als drinkwater van een zeer hoge microbiologische kwaliteit dat zonder rest-desinfectiemiddel gedistribueerd en geconsumeerd kan worden. Ondanks de zeer hoge kwaliteit kan nagroei van micro-organismen leiden tot volksgezondheidskundige problemen (bijvoorbeeld *L. pneumophila*) en esthetische problemen (bijvoorbeeld geur/smaakproblemen en groei van waterpissebedden die het menselijk oog kan waarnemen). Vanwege de mogelijke nagroei-problematiek zijn KG22 en *Aeromonas*, als indicatororganismen voor nagroei, in het Drinkwaterbesluit opgenomen. Deze parameters worden periodiek door drinkwaterbedrijven bepaald in drinkwatermonsters uit het distributiesysteem. Een *Aeromonas*-aantal in het distributiesysteem van maximaal 1000 kolonievormende eenheden (kve) per 100 ml is daarbij de wettelijke norm waaraan de drinkwaterbedrijven moeten voldoen. De betekenis van *Aeromonas* als nagroei-indicator staat echter ter discussie in de bedrijfstak, omdat geen directe verbanden zijn gevonden tussen *Aeromonas* en aan nagroei gerelateerde gezondheidskundige of esthetische problemen (opportunistische pathogenen zoals *Legionella pneumophila*, geur/smaak, bruin water, ongewervelde dieren; (1)). *Aeromonas*-stammen uit het distributiesysteem groeien op stoffen afkomstig van biomassa (aminozuren en langketige vetzuren). Tevens is groei van *Aeromonas* in aanwezigheid van een waterpissebed waargenomen (2), maar onduidelijk is in hoeverre en op welke manier de groei van *Aeromonas* en waterpissebedden in het distributiesysteem zijn gekoppeld. Dit artikel beschrijft een onderzoek naar dit verband, waarbij met veldmetingen en laboratoriumanalyses de relatie tussen *Aeromonas* groei en waterpissebedden verder is gekarakteriseerd. Het onderzoek is uitgevoerd door KWR in een samenwerkingsverband met de drinkwaterbedrijven Dunea, PWN, Waternet en Evides (DPWE-verband¹).

¹ Het DPWE-programma is het collectieve onderzoeksprogramma van de vier duinwaterbedrijven Dunea, PWN, Waternet en Evides. Het onderzoek wordt uitgevoerd door KWR.

5.3 Verzamelen en karakteriseren van waterpissebedden uit het distributiesysteem

Door middel van spuiacties zijn waterpissebedden verzameld uit drie distributiegebieden van Evides waar de *Aeromonas*-norm wordt overschreden. Het betreft twee locaties met oppervlaktewater als bron en één locatie met grondwater als bron. In het distributiegebied van de eerste twee locaties zijn standaard spuiacties uitgevoerd. In het derde distributiegebied is een spuiactie uitgevoerd met water dat verrijkt is met CO₂, een spui methode die in Duitsland wordt toegepast om waterpissebedden te verwijderen (3). Circa twintig exemplaren zijn vervolgens in leven gehouden door ze te bewaren in het donker bij 15°C in drinkwater met sediment en een esdoornblad.

Van een groot aantal andere waterpissebedden uit deze distributiegebieden is de lengte bepaald en is het aantal inwendig aanwezige *Aeromonas*-bacteriën geanalyseerd. De lengte van de waterpissebedden varieert tussen de 1,2 mm en 7,2 mm. De *Aeromonas*-aantallen variëren sterk per waterpissebed ($< 5 - 1,5 \times 10^9$ kve per waterpissebed; Afbeelding 1) en tonen geen verband met de lengte. *Aeromonas* aantallen in waterpissebedden, die direct na isolatie uit het distributiesysteem zijn geanalyseerd, varieerden van < 1 tot $1,1 \times 10^8$ kve per waterpissebed. Bij de waterpissebedden uit het distributiesysteem is geen systematisch verschil in *Aeromonas* concentratie tussen dode en levende exemplaren gevonden. In de levende waterpissebedden, die gedurende zeven weken in leven zijn gehouden, zijn zeer hoge aantallen *Aeromonas* gevonden met een lage variatie tussen waterpissebedden. De *Aeromonas*-aantallen in het water van deze kweek waren hoog ($5,8 \times 10^4$ kve/ml). Deze hoge *Aeromonas*-aantallen in combinatie met de observatie dat de waterpissebedden niet afstierven gedurende zeven weken maken het aannemelijk dat *Aeromonas* niet schadelijk is voor waterpissebedden.



Afbeelding 1. *Aeromonas*-aantallen in waterpissebedden.

5.4 Vetzuur- en aminozuurgehalte van waterpissebedden

Aeromonas-bacteriën die uit drinkwater zijn geïsoleerd hebben een hoge affiniteit voor aminozuren en vetzuren, met uitzondering van stearaat en lysine. Uit onderzoek van een aantal waterpissebedden, die dood of levend uit het drinkwater van één locatie in het distributiesysteem zijn verzameld, blijkt dat verschillende concentraties vetzuren en

aminozuren in waterpissebedden voorkomen. In de onderzochte dode waterpissebedden waren cis-vacceenzuur, oleaat, stearinezuur en arachidonzuur de vetzuren die in de hoogste concentraties zijn aangetroffen (1,49 - 3,32 µg vetzuur per mg droge stof). In levende individuen waren deze vetzuurconcentraties een factor 1,6 - 18,4 lager (0,08 - 2,02 µg vetzuur per mg droge stof). Wanneer alle gevonden vetzuren worden opgeteld dan bevat één dode waterpissebed, gebaseerd op een gemiddeld drooggewicht van 1,6 mg per individu, een gemiddelde vetzuurconcentratie van $24,3 \pm 0,16$ µg, terwijl een levende waterpissebed gemiddeld $5,9 \pm 0,01$ µg vetzuren bevat. Arginine, lysine, glutamine en histidine zijn de aminozuren die in de hoogste concentraties in levende individuen zijn aangetroffen, terwijl de concentratie van deze aminozuren een factor 23,4 - 80,8 lager is in dode waterpissebedden. De gemiddelde aminozuurconcentratie (som van alle gevonden aminozuren) in een levende waterpissebed is 21,3 µg, terwijl in een dode waterpissebed $0,9 \pm 0,02$ µg aminozuren is gevonden.

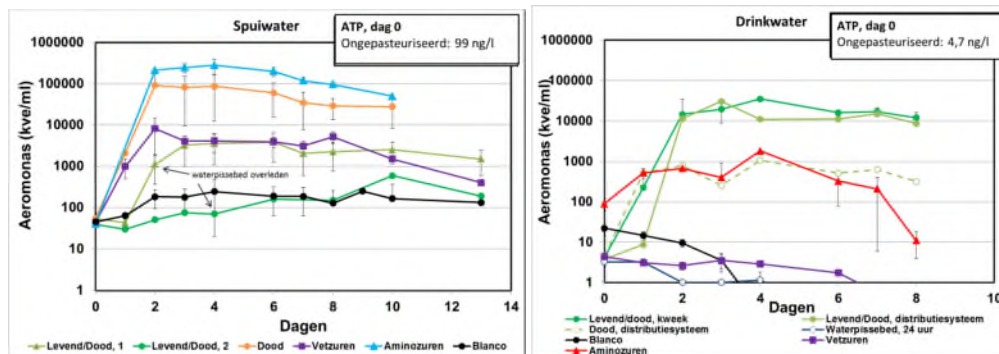
Dat dode waterpissebedden meer vrije vetzuren bevatten dan levende waterpissebedden wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat in dode exemplaren afbraak gaande is, waarbij vetzuren vrijkomen. Deze vetzuren kunnen vervolgens als voedingsbron dienen voor *Aeromonas* en andere micro-organismen. Het lagere gehalte aminozuren in dode waterpissebedden wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat na afbraak de aminozuren vrijkomen en gemakkelijker of sneller oplossen in water. Vervolgens kunnen ze door *Aeromonas* en andere micro-organismen voor hun groei worden benut.

5.5 Groei van *Aeromonas* op waterpissebedden, vetzuren en aminozuren in drinkwater

Om de situatie van *Aeromonas*-toename in het distributiesysteem na te bootsen zijn verschillende groeiproeven uitgevoerd in het laboratorium. Bepaald is of, en hoe goed, *Aeromonas* kan groeien in drinkwater uit de kraan en spuiwater (drinkwater dat tijdens spuien is opgevangen en een veel hogere concentratie sediment bevat dan drinkwater uit de kraan), met daaraan afzonderlijk toegevoegd verschillende waterpissebedden (levend, dood) en mengsels van vetzuren en aminozuren (Afbeelding 2). Aan alle groeiproeven is bij de start een lage dosis (<10 kve/ml) van vier uit drinkwater geïsoleerde *Aeromonas* stammen gedoseerd. Alle groeiproeven zijn uitgevoerd in ongepasteuriseerd drinkwater. Hierdoor is de autochtone microbiële flora nog aanwezig in het water die concurreert met *Aeromonas* voor de beschikbare voedingsstoffen, gelijk aan de situatie in het drinkwaterdistributiesysteem.

In de proef waar de levende waterpissebedden zijn getest in spuiwater (Afbeelding 2, links), was het initiële biomassagehalte relatief hoog (99 ng ATP/l), maar de groei van *Aeromonas* gering (tot een maximum van 385 keer de norm van 1000 kve/100 ml). In spuiwater met dode waterpissebedden (oranje in Afbeelding 2) of een mengsel van aminozuren (lichtblauw in Afbeelding 2) vermeerderde *Aeromonas* zich tot aantallen boven de 10^6 kve/100 ml. Dit is ongeveer duizend keer de wettelijke norm van 1000 kve/100 ml. In spuiwater met een levende waterpissebed die na twee dagen stierf (lichtgroen in Afbeelding 2), en bij dosering van een vetzurenmengsel (paars in Afbeelding 2) is groei van *Aeromonas* zichtbaar. De maximum aantallen waren onder deze condities echter wel een factor 73, respectievelijk 34, lager. Spuiwater met een levende waterpissebed die na vier dagen overleed liet echter geen duidelijke extra groeirespons zien. Waterpissebedden leiden tot verhoogde groei van *Aeromonas* ten opzichte van de blanco waarin geen toevoegingen zijn gedoseerd. Dit wijst erop dat *Aeromonas* groeit op stoffen die aanwezig zijn in waterpissebedden. De groei op een vetzuur- en aminozuurmengsel, dat van nature aanwezig is in waterpissebedden, laat zien dat *Aeromonas* in staat is om deze stoffen om te zetten. Mogelijk zijn er nog andere

stoffen aanwezig in waterpissebedden die door *Aeromonas* afgebroken kunnen worden, maar die geen onderdeel waren van deze studie.



Afbeelding 2. Groei van *Aeromonas* in spuiwater (links) en drinkwater (rechts) zonder toevoeging (blanco) of met verrijking van waterpissebedden of mengsels van aminozuren en vetzuren. Groeiproeven zijn in tweevoud uitgevoerd. Het gemiddelde met standaard deviatie is gegeven. De ATP-concentratie, een maat voor de hoeveelheid aanwezige actieve biomassa, van het water op dag 0 is gegeven. Levend/Dood: in deze groeioproef is de waterpissebed levend toegevoegd, maar is overleden tijdens het experiment. Dit is met een pijl aangegeven in de grafiek.

In het spuiwater zonder toevoegingen blijven de *Aeromonas*-aantallen gedurende de incubatieperiode constant, terwijl in drinkwater zonder toevoegingen *Aeromonas* binnen twee weken is afgenomen tot onder de detectiegrens (Afbeelding 2). Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat voedingsstoffen uit het sediment (die verhoogd aanwezig zijn in het spuiwater ten opzichte van drinkwater) door *Aeromonas* worden opgenomen, zodat *Aeromonas* niet afsterft tijdens de incubatieperiode van 14 dagen. Na 24 uur contact van een waterpissebed met het drinkwater (na 24 uur is de waterpissebed verwijderd) werd geen groei van *Aeromonas* waargenomen (Afbeelding 2, rechts), wat aantoont dat afgifte van groeibevorderende verbindingen door een waterpissebed aan het drinkwater niet zonder meer optreedt. De aan drinkwater gedoseerde levende waterpissebedden, afkomstig uit het distributiesysteem of de KWR-kweek, waren waarschijnlijk door voedselgebrek na 24 uur overleden. De dosering van waterpissebedden had in alle gevallen een toename van *Aeromonas* tot gevolg (Afbeelding 2), waarbij voor de levende individuen een maximum waarde van circa 2×10^4 kve/ml werd bereikt, vijf keer lager dan het groeimaximum op dode waterpissebedden in de groeioproeven met spuiwater. De herkomst van de waterpissebedden had geen effect op de *Aeromonas*-toename in de groeioproeven. In drinkwater met het vetzurenmengsel werd geen toename van de *Aeromonas*-aantallen waargenomen. Aminozuren zorgen wel voor verhoging van het *Aeromonas* aantal in drinkwater, maar de respons is meer dan honderd keer lager dan in spuiwater. Aminozuren en vetzuren spelen in drinkwater waarschijnlijk wel een rol als deze voorkomen samen met een dode waterpissebed. Verhoogde groei van *Aeromonas* in spuiwater met en zonder waterpissebedden, en met aminozuren en vetzuren in vergelijking met drinkwater, tonen aan dat sediment in het spuiwater ook een rol speelt bij de toename van het aantal *Aeromonas* in het distributiesysteem. Deze laboratoriumobservaties komen overeen met praktijkwaarnemingen die een relatie van *Aeromonas* met sediment hebben laten zien.

5.6 Waterpissebedden als voedsel voor *Aeromonas* in het distributiesysteem

De groeioproeven laten zien dat in 600 ml drinkwater met een levende of dode waterpissebed (gelijk aan 1700 individuen per m^3) de *Aeromonas*-aantallen in aanwezigheid van de autochtone microflora binnen twee dagen tot ruim (1.000 – 10.000 keer) boven de norm van

1000 kve/100 kunnen toenemen. Deze twee dagen komen overeen met verblijftijden die ook in het distributiesysteem voorkomen. De aantallen waterpissebedden die in het Nederlandse drinkwater worden geteld variëren van <0,1 tot ongeveer 200 per m³ spuiwater (4). In dit onderzoek werden vergelijkbare aantallen waterpissebedden in de onderzochte distributiesystemen gevonden. Het maximale aantal waterpissebedden in drinkwater is dus ongeveer tien keer lager dan het aantal waterpissebedden dat in de groeiproeven is gebruikt. De maximum aantallen in het distributiesysteem zijn echter voldoende om tot overschrijding van de *Aeromonas* norm te leiden. Aangezien het onderzoek is uitgevoerd onder gecontroleerde laboratoriumcondities (b.v. stilstaand water, constante temperatuur, etc.) kan de praktijk mogelijk verschillen. Alhoewel de getoonde gegevens geen bewijs zijn voor de betrokkenheid van waterpissebedden bij de toename van *Aeromonas* in het distributiesysteem, lijkt het wel zeer aannemelijk. Op welke wijze deze associatie precies plaatsvindt en leidt tot een toename van het aantal kweekbare *Aeromonassen* in drinkwater, is onderwerp van vervolgonderzoek.

5.7 Conclusies

De resultaten van deze studie hebben laten zien dat:

1. levende en dode waterpissebedden uit het distributiesysteem zeer hoge *Aeromonas*-aantallen kunnen bevatten
2. bij het in kweek houden van waterpissebedden in een laboratoriumsituatie de *Aeromonas*-aantallen in het water en de waterpissebed zeer hoog zijn
3. toevoegen van een waterpissebed (dood of levend) aan drinkwater of spuiwater onder laboratoriumcondities zorgt voor een sterke toename van *Aeromonas*, ook in de aanwezigheid van de autochtone bacteriepopulatie.

Uit deze resultaten kan worden geconcludeerd dat waterpissebedden in het distributiesysteem een oorzaak kunnen zijn voor groei van *Aeromonas*. Hoe belangrijk deze rol van waterpissebedden is ten opzichte van andere factoren, die mogelijk groei van *Aeromonas* veroorzaken, dient verder onderzocht te worden.

5.8 Referenties

1. van der Wielen, P.W.J.J. (2015) Waarde KG22 en *Aeromonas* als wettelijke parameters nagroei, Concept BTO rapport, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL.
2. Hijnen, W.A.M., Reijnen, G.K., Bos, R.H.M., Veenendaal, G. & van der Kooij D. (1992). Lagere *Aeromonas*-aantallen in het drinkwater van pompstation Zuidwolde door verbeterde ontgassing en vernieuwen van het filtergrind. H2O, vol 25, nr 14, 370-375.
3. Gunkel, G., Scheideler, M. and Michels, U. (2015) Invertebrates in drinking water distribution systems. GWF-Wasser/Abwasser International issue (1), 52-55.
4. van Lieverloo, J.H.M., Hoogenboezem, W., Veenendaal, G. and van der Kooij, D. (2012) Variability of invertebrate abundance in drinking water distribution systems in the Netherlands in relation to biostability and sediment volumes. Water Res 46, 4918-4932.

6 Referenties

BTO 2016.065. Landelijke inventarisatie ongewervelde dieren 2009-2013.

Culkin, F. & Morris, R.J. (1969). The fatty acids of some marine crustaceans. *Deep-Sea Research*, vol 16, pp 109-116

KWR 2016.073. Isolatie en identificatie van *Aeromonas* stammen uit vijf DPWE voorzieningsgebieden en hun groeikarakteristieken.

Landahl & Nagell (1978). Influence of the season and of preservation methods on wet- and dry weights of larvae of *Chironomus plumosus*. *L. Int. Revue. Ges. Hydrobiol.*, vol 63, pp 405-410.

Lappalainen & Kangas (1975). Littoral benthos of the Northern Baltic Sea, 2. Interrelationships of wet, dry and ash-free dry weights of macro-fauna in the Tvärminne area. *Int. Revue. Ges. Hydrobiol.*, vol 10, pp 297-312.

Leuven RSEW, Brock TCM, van Druten HAM. (1985). Effects of preservation on dry- and ash-free dry weight biomass of some common aquatic macro-invertebrates. *Hydrobiologia*, vol 127, pp. 151-159.

Magic-Knezev, & Kooij, D. van der. (2004). Optimisation and significance of ATP analysis for measuring active biomass in granular activated carbon filters used in water treatment. *Water Research*, 38, 3971-3979.

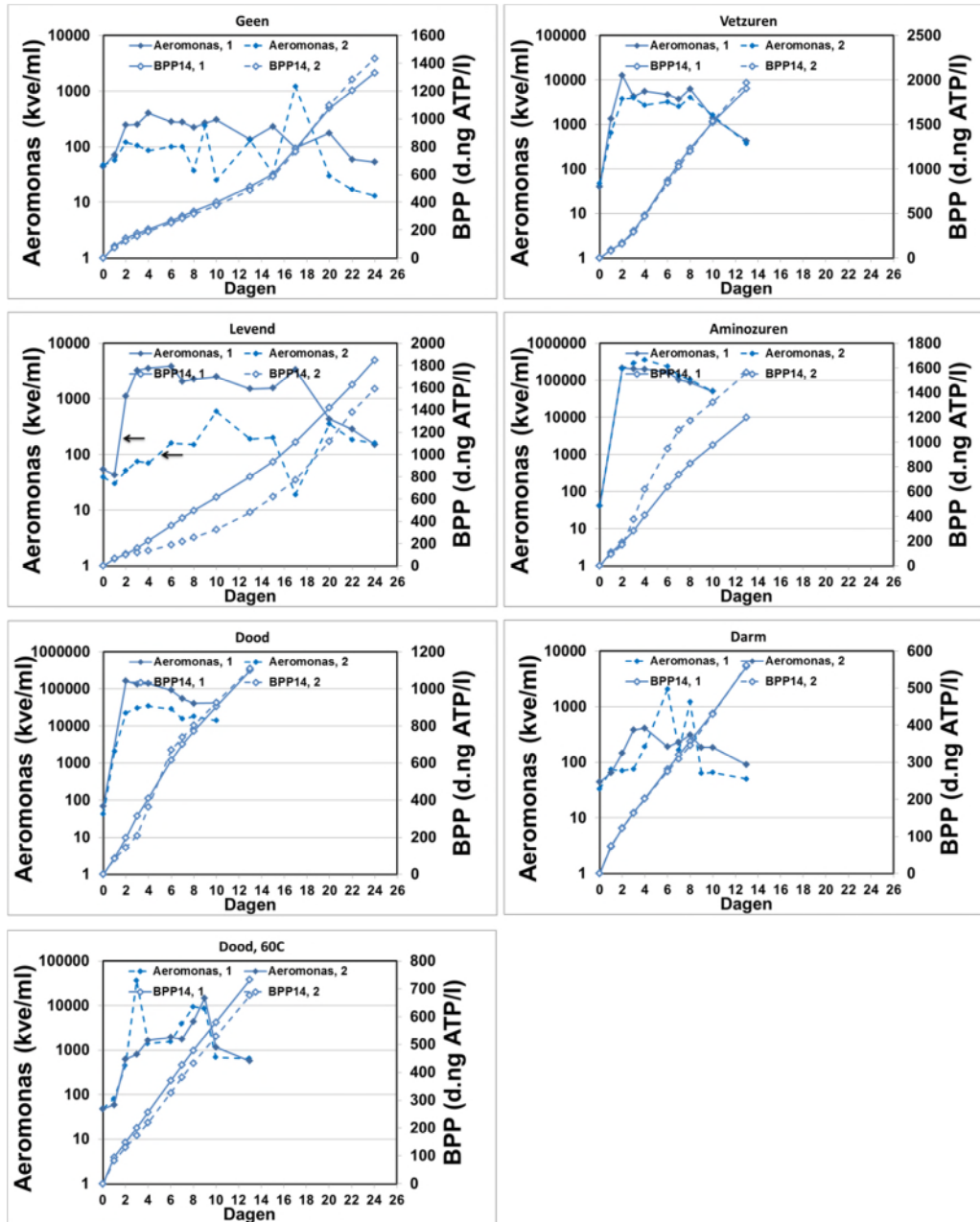
Van der Kooij, D. & Hijnen W.A. (1988). Nutritional versatility and growth kinetics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 54, nr 11, 2842-2851

Hijnen, W.A.M., Reijnen, G.K., Bos, R.H.M., Veenendaal, G. & van der Kooij D. (1992). Lagere *Aeromonas*-aantallen in het drinkwater van pompstation Zuidwolde door verbeterde ontgassing en vernieuwen van het filtergrind. *H₂O*, vol 25, nr 14, 370-375.

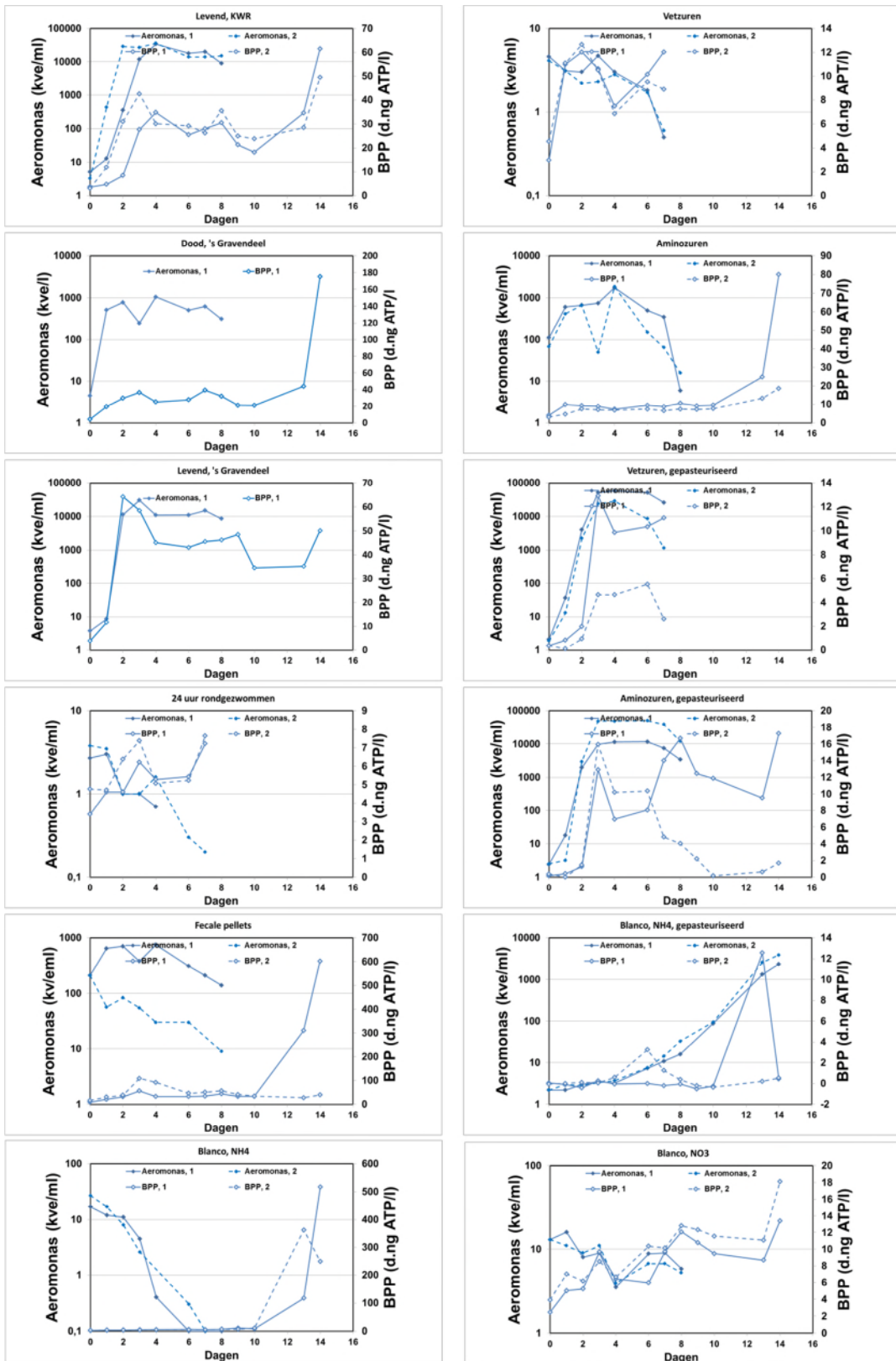
Lau DCP, Vrede T, Pickova J, Goedkoop W. (2012) Fatty acid composition of consumers in boreal lakes - variation across species, space and time. *Freshwater Biology*, vol 57, pp 24-38.

Lau DCP, Goedkoop W, Vrede T. (2013). Cross-ecosystem differences in lipid composition and growth limitation of a benthic generalist consumer. *Limnol. Oceanogr.*, vol 58, no 4, pp 1149-1164.

Bijlage I



FIGUUR 22. AEROMONAS EN ATP BEPALING PER GROEIEXPERIMENT. IN HET EXPERIMENT WAARIN EEN LEVENDE WATERPISSEBED IS TOEGEVOEGD IS DEZE TUSSEN DAG 1 EN 2 (LEVEND, 1) EN TUSSEN DAG 4 EN 6 (LEVEND, 2) OVERLEDEN. DIT IS MET EEN PIJL AANGEGEVEN.



FIGUUR 23. *AEROMONAS* EN ATP BEPALING PER GROEIEXPERIMENT. IN HET EXPERIMENT WAARIN EEN LEVENDE WATERPISSEBED IS TOEGEVOEGD IS DEZE TUSSEN DAG 0 EN 1 OVERLEDEN.