

KWR 2016.073 | Augustus 2016

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

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

KWR 2016.073 | Augustus 2016

Opdrachtnummer

400911-014

Projectmanager

Edwin Kardinaal

Opdrachtgever

DPWE bedrijven

Kwaliteitsborger

Paul van der Wielen

Auteurs

Nikki van Bel, Bart Wullings, Wim Hijnen

Verzonden aan

DPWE bedrijven

Samenvatting

De aanwezigheid van *Aeromonas* in drinkwater wordt beschouwd als een indicatie voor de mate van nagroei in het distributiesysteem. Bij een aantal DPWE bedrijven komen met enige regelmaat overschrijdingen van de wettelijke norm voor *Aeromonas* voor. Meer kennis over het gedrag van *Aeromonas*-stammen die in de waterdistributiesystemen voorkomen, verhoogt het inzicht in de betekenis van *Aeromonas* als wettelijke parameter voor het voorspellen van nagroei en maakt het mogelijk om beter in te schatten of, en zo ja welke, beheersmaatregelen in de zuivering en/of het leidingnet effectief zijn bij het verlagen van de *Aeromonas* nagroei tijdens distributie.

Recent onderzoek heeft laten zien dat typering met de klassieke biochemische methoden niet overeenkomt met typering met behulp van genetische technieken. Uit deze typering bleek dat de *Aeromonas*-soortensamenstelling verschilt per voorzieningsgebied. Eerder onderzoek heeft laten zien dat *Aeromonas* een voorkeur heeft voor ammonium als N-bron, al is dit gebaseerd op een uitgebreide beschrijving van één stam, *Aeromonas salmonicida* stam M800 (voorheen *A. hydrophila*, M800).

Dit leidt tot de volgende onderzoeksvragen: 1). Welke *Aeromonas* soorten domineren de drinkwater distributiesystemen van de DPWE bedrijven waar de norm regelmatig wordt overschreden en distributiesystemen waar dit niet gebeurt? 2).Gelden voor de belangrijkste en dominante *Aeromonas* stammen geïsoleerd uit verschillende DPWE voorzieningsgebieden dezelfde algemene groeikarakteristieken als voor stam *A. salmonicida* M800?

Voor dit onderzoek zijn in de zomer en het najaar van 2015 de dominant voorkomende *Aeromonas* bacteriën uit het gedistribueerde drinkwater van vijf productielocaties van DPWE-bedrijven met en zonder normoverschrijdingen geïsoleerd en is het genotype van deze stammen bepaald. Hieruit bleek dat de *Aeromonas* populatie verschilt tussen de voorzieningsgebieden. De reden hiervoor is niet onderzocht en zou in aanvullend onderzoek moeten worden vastgesteld. Eén mogelijkheid is de verschillen in lokale condities, zoals de watersamenstelling, tussen de voorzieningsgebieden. De meest voorkomende soorten zijn *A. rivuli*, *A. veronii* en *A. sobria*, al komen er in elk voorzieningsgebied meerdere *Aeromonas*-soorten voor (tussen de één en acht soorten). Ook is voor sommige voorzieningsgebieden de variatie tussen de jaren hoog, waarbij de soorten gevonden in dit onderzoek niet altijd overeen komen met de soorten die in een eerder BTO onderzoek werden gevonden (BTO 2013.228).

Van een tiental geïsoleerde stammen is met groei-experimenten aangetoond dat zowel het type stikstofbron als koolstofbron belangrijk is voor de verdubbelingssnelheid en de groeiopbrengst. Alle *Aeromonas* stammen groeien op citraat met ammonium als N-bron, terwijl alleen de *A. rivuli* stammen nitraat als N-bron kunnen gebruiken als ze met citraat als C-bron groeien. Alle geïsoleerde stammen hebben een relatief hoge verdubbelingssnelheid op de langketige vetzuur oleaat en het aminozuur arginine als C-bron. Opmerkelijk was het resultaat dat stikstof in het drinkwater met een hoge concentratie oleaat (10 mg C/l) groei limiterend is. Dit was vrijwel niet het geval wanneer arginine als C-bron werd toegevoegd. Arginine zelf bevat ook stikstof en blijkbaar gebruikt *Aeromonas* bij groei op arginine, arginine ook als N-bron. De conclusie over

geen groei op een mengsel van biopolymeren en specifiek chitine in dit onderzoek is gebaseerd op een groeiproef zonder ammonium. Op basis van de conclusie over de N-bron gevoeligheid van *Aeromonas* zouden deze proeven herhaald moeten om de groeimogelijkheid op biopolymeren definitief vast te kunnen stellen.

In het drinkwaterdistributiesysteem zijn ongewervelde dieren zoals invertebraten en protozoa, waarschijnlijk een belangrijke bron van ammonium. Er zijn echter meer mogelijke ammoniumbronnen. Wat in het drinkwaterdistributienet de belangrijkste ammoniumbron is voor *Aeromonas* zou in aanvullend onderzoek onderzocht moeten worden.

Inhoud

Samenvatting	2
1 Inleiding	6
2 Materialen & methoden	8
2.1 Isolatie van <i>Aeromonas</i> stammen	8
2.2 Identificatie van <i>Aeromonas</i> stammen	8
2.3 Groei op verschillende N-bronnen	8
2.4 Groei op een aantal geselecteerde C-bronnen	8
2.5 Groeioproeven met en zonder ammoniumlimitatie	9
3 Resultaten en Discussie	11
3.1 Soortidentificatie <i>Aeromonas</i> -stammen	11
3.2 Selectie van de stammen voor de groeioproeven	13
3.3 Groeioproeven	13
3.4 Groei van <i>Aeromonas</i> in het distributiesysteem	20
4 Conclusies en aanbevelingen	22
4.1 Conclusies	22
4.2 Aanbevelingen	22
5 Referenties	24

1 Inleiding

De aanwezigheid van *Aeromonas* in drinkwater wordt beschouwd als een indicatie voor de mate van nagroei in het distributiesysteem, maar heeft zover bekend geen gezondheidkundige betekenis. Zo zijn *Aeromonas* isolaten die geïsoleerd worden uit patiënten die last hebben van diarree, genetisch en fenotypisch anders dan *Aeromonas*-isolaten uit drinkwater (Havelaar et al. 1992; Moyer et al 1992; Hanninen and Siitonen 1995; Borchardt et al. 2003).

Bij een aantal DPWE bedrijven komen met enige regelmaat overschrijdingen voor van de wettelijke norm *Aeromonas*. Bij Evides is de afgelopen jaren een stijgende trend van de *Aeromonas*-aantallen in de voorzieningsgebieden waargenomen en zijn ook het aantal wettelijke overschrijdingen in de meeste van de voorzieningsgebieden toegenomen. Dit laatste is een onwenselijke situatie voor Evides en daarom bestaat de wens om de specifieke (groeif)factoren die van belang zijn bij de toename van *Aeromonas* aantallen in het distributiesysteem te achterhalen. Meer kennis over de samenstelling en het gedrag van de *Aeromonas* stammen die in het drinkwaterdistributiesysteem voorkomen, verhoogt waarschijnlijk het inzicht in de betekenis van de wettelijke parameter voor het voorspellen van nagroei en maakt het mogelijk om beter in te schatten of, en zo ja welke, beheersmaatregelen in zuivering en/of distributiesysteem effectief zijn bij het verlagen van de *Aeromonas* nagroei tijdens distributie.

Op grond van een uitgebreide evaluatie uitgevoerd in opdracht van Evides (Hijnen en Van der Wielen, 2013) is de huidige kennis over *Aeromonas* in drinkwater in kaart gebracht. Van der Wielen en Wullings (2013) hebben laten zien dat typering met de klassieke biochemische methoden niet overeenkomt met de soortentyping gebaseerd op genetische technieken. Uit de genotypering bleek dat de soortensamenstelling van het geslacht *Aeromonas* verschilt per voorzieningsgebied. De belangrijkste kennis over de invloed van nutriënten op de groei (in dit rapport weergegeven als groeikarakteristieken) van *Aeromonas* in drinkwater is gepubliceerd door Van der Kooij and Hijnen (1988). Het algemene beeld is dat *Aeromonas* groeit op organische verbindingen afkomstig van biomassa (aminozuren, vetzuren, polysacchariden, eiwitten) en een voorkeur heeft voor ammonium (in plaats van nitraat) als N-bron. Dit beeld is gebaseerd op een uitgebreide karakterisering van voornamelijk één *Aeromonas* stam: M800. Deze stam M800 is geïsoleerd uit drinkwater bereid uit grondwater en met biochemische testen geïdentificeerd als *A. hydrophila*, maar op basis van DNA-typing als *A. salmonicida*.

De volgende vragen zijn in de hier beschreven rapportage onderzocht:

1. Welke *Aeromonas* soorten, die zijn geïdentificeerd met DNA-technieken, worden gevonden in drinkwaterdistributiesystemen van de DPWE bedrijven waar de wettelijke norm *Aeromonas* regelmatig wordt overschreden en in distributiesystemen waar deze norm niet wordt overschreden?

2. Gelden voor de dominante *Aeromonas*-soorten die zijn gevonden in verschillende DPWE voorzieningsgebieden, dezelfde groeikarakteristieken als die zijn vastgesteld voor stam M800?

2 Materialen & methoden

2.1 Isolatie van *Aeromonas* stammen

In de zomer van 2015 zijn *Aeromonas*-stammen verzameld van drie voorzieningsgebieden waar de wettelijke norm *Aeromonas* wordt overschreden (Andijk, Berenplaat en Weeperkarspel) en van twee voorzieningsgebieden waar deze norm niet wordt overschreden (Braakman en Scheveningen). Hiervoor zijn door het Waterlaboratorium (HWL) en Aqualab-zuid (AQL) *Aeromonas* kweekplaten naar KWR opgestuurd. Deze kweekplaten komen uit het routinematige monitoringsprogramma van de drinkwaterbedrijven. Van deze kweekplaten zijn maximaal drie *Aeromonas* kolonies per kweekplaat geïsoleerd tot maximaal 50 stammen per voorzieningsgebied. Omdat van voorzieningsgebied Braakman in de zomer van 2015 niet voldoende kweekplaten waren aangeleverd om *Aeromonas* stammen van te isoleren, zijn in het najaar van 2015 extra kweekplaten opgestuurd naar KWR. Met de *Aeromonas*-stammen die hiervan zijn geïsoleerd, zijn voor iedere locatie 35 - 47 *Aeromonas*-stammen geïsoleerd. In totaal zijn 216 *Aeromonas*-stammen getypeerd met behulp van moleculaire DNA-technieken.

2.2 Identificatie van *Aeromonas* stammen

Aeromonas-stammen kunnen tot op soortniveau geïdentificeerd worden door het bepalen van de DNA volgorde van het *gyrB* gen. Dit gen is minder sterk geconserveerd dan het 16S rRNA gen, wat het geschikt maakt voor identificatie op soortniveau (Yáñez *et al.*, 2003). Hiervoor wordt van elke *Aeromonas* stam het DNA van het *gyrB* gen vermenigvuldigd, waarna van dit product de DNA volgorde wordt bepaald (Van der Wielen en Wullings, 2013). De geanalyseerde DNA sequentie wordt vervolgens vergeleken met een referentiedatabase dat *gyrB* sequenties bevat van alle beschreven *Aeromonas* soorten. Op basis van de overeenkomsten en verschillen tussen de geanalyseerde en referentiesequentie is het mogelijk de stammen tot op soortniveau te identificeren. Voorwaarde is natuurlijk dat de soort is beschreven en er een referentiesequentie in de database aanwezig is.

2.3 Groei opverschillende N-bronnen

Het onderzoek naar de specifieke N-bron is uitgevoerd zoals beschreven in Van der Kooij en Hijnen (1988). Hiervoor werd steriel mineraal medium gemaakt van gedemineraliseerd water met daaraan toegevoegd: 0,5 g NaHPO₄/l, 0,2 g citraat-C/l en 0,1 g NH₄-N/l (ammoniummedium) of 0,1 g NO₃-N/l (nitraatmedium). Per stam zijn twee buizen met het ammoniummedium en twee buizen met het nitraatmedium afgevuld. Deze buizen konden rechtstreeks in de spectrofotometer worden geplaatst. Elke stam werd geënt met materiaal van een entflesje en materiaal van een kolonie op een agarplaat. De groei bij 15°C werd met de spectrofotometer dagelijks gecontroleerd totdat een maximale extinctie was bereikt als maat voor de maximale biomassaopbrengst.

2.4 Groei op een aantal geselecteerde C-bronnen

Groeiproeven zijn uitgevoerd in het drinkwater van Tull en 't Waal bij 15°C om de groei op een aantal C-bronnen te bepalen. In alle groeiproeven is 0,1 g NO₃-N/l en 0,5 g NaHPO₄/l gedoseerd

aan het water. De standaard N-bron in groeiproeven is nitraat (NO_3) en niet ammonium (NH_4) wat wel in andere groeiproeven in dit onderzoek is gebruikt. Tevens is één van de volgende C-bronnen toegevoegd:

- 10 µg arginine-C/l
- 10 µg oleaat-C/l
- Mengsel van biopolymeren:
 - o 1 µg C/l Amylopectin
 - o 10 µg C/l Xyloglucan
 - o 1 µg C/l Pectin
 - o 1 µg C/l Laminarin
 - o 1 µg C/l Casein
 - o 1 µg C/l Gelatin
 - o 10 µg C/l Lectin
- 100 µg C/l Alfa-Chitine

De verbindingen Xyloglucan, Lectin en chitine bleken niet goed oplosbaar te zijn. Dit is opgelost door doseeroplossing waarin de stoffen zijn afgewogen een uur lang te koken, af te koelen en gedurende 5 minuten bij 45% met hoge energetische ultrasone trilling na te behandelen. Omdat hierna nog duidelijk deeltjes zichtbaar waren en daardoor onduidelijk was hoeveel van de verbinding in oplossing was gegaan, is van deze stoffen een factor 10 meer gedoseerd vergeleken met de overige C-bronnen. Dit is gedaan aangezien de niet-opgeloste stoffen zeer waarschijnlijk niet als C-bron gebruikt kunnen worden en de concentratie in de groeikolf anders te laag wordt.

De dosering van alle stoffen is uitgevoerd vóór pasteurisatie van de flessen. Na pasteurisatie zijn de flessen geënt met de verschillende reïncultures en geïncubeerd bij 15°C. De groei van de stammen is bepaald door de toename van het koloniegetal te bepalen op bouillon agar (LLA8.0). De 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.

2.5 Groeiproeven met en zonder ammoniumlimitatie

Groeiproeven zijn nogmaals uitgevoerd met stam M800 en een *A. veronii* stam (stam 11 uit Tabel 4) in Tull-en 't Waal waar 10 mg C/l oleaat en arginine aan toe zijn gevoegd zoals hierboven beschreven. Daarnaast zijn 0,1 g NO_3 -N/l en 0,5 g NaHPO_4 /l apart toegevoegd of samen met een overmaat aan ammonium (0,1 g NH_4 -N/l; allen in duplo).

De groeiproeven zijn uitgevoerd zoals beschreef in paragraaf 2.4, met een maximum duur van 4 weken (29 dagen).

3 Resultaten en Discussie

3.1 Soortidentificatie *Aeromonas*-stammen

In de zomer en het najaar van 2015 zijn er in totaal 216 *Aeromonas* stammen uit vijf distributiegebieden geïsoleerd en getypeerd aan de hand van de *gyrB* DNA-sequentie (Tabel 1).

TABEL 1. AANTAL GEÏSOLEERDE *AEROMONAS* STAMMEN PER DISTRIBUTIEGEBIED

Pompstation	Andijk	Berenplaat	Braakman	Scheveningen	Weesperkarspel
Aantal geïsoleerde <i>Aeromonas</i> stammen	47	35	46	46	42

De resultaten laten zien dat de soortensamenstelling van *Aeromonas* sterk verschilt per distributiegebied (Tabel 3). *A. rivuli* en *A. veronii* zijn hierbij het vaakst aangetroffen met 67 respectievelijk 72 van het totale aantal geïsoleerde *Aeromonas* stammen. Er is geen enkele *Aeromonas*-soort die in alle vijf de distributiegebieden is geïdentificeerd. Drie soorten komen in vier van de vijf distributiegebieden voor: *A. rivuli*, *A. sobria* en *A. veronii*. *A. salmonicida* en *A. hydrophila* zijn slechts in één distributiegebied (Andijk) aangetroffen. Andijk is het distributiegebied waar de grootste variatie in *Aeromonas*-soorten (zeven bevestigde en vier onbekende soorten) werd waargenomen. In tegenstelling hiermee is het distributiegebied van Berenplaat waar slechts twee *Aeromonas*-soorten zijn aangetroffen. In totaal zijn er acht onbekende *Aeromonas*-soorten geïsoleerd die met geen enkele *Aeromonas*-soort uit de referentiedatabase overeenkwam. De hoge diversiteit in *Aeromonas*-soortensamenstelling per voorzieningsgebied en de verschillen in soortensamenstelling tussen de voorzieningsgebieden bevestigen eerder onderzoek waarin dit eerder is waargenomen (Van der Wielen en Wullings, 2013).

TABEL 2. SOORTSIDENTIFICATIE VAN DE *AEROMONAS* STAMMENCOLLECTIE OP BASIS VAN HET *gyrB*-GEN. DEZE STAMMEN ZIJN VERZAMELD IN DE ZOMER EN HET NAJAAR VAN 2015 BINNEN DIT DPWE ONDERZOEK.

Soort/ Pompstation	Andijk	Scheveningen	Berenplaat	Braakman	Weesperkarspel	Totaal
<i>A. bestiarum</i>	4	2		11		17
<i>A. hydrophila</i>	1					1
<i>A. media</i>	1	6			15	22
<i>A. rivuli</i>	24	35	1		7	67
<i>A. salmonisida</i>	3					3
<i>A. sobria</i>	5	3		17	1	26
<i>A. veronii</i>	5		34	15	18	72
Onbekend (geen match)	4			3	1	8

In het BTO onderzoek uit 2012 zijn van de distributiegebieden van Andijk, Berenplaat, Braakman en Weesperkarspel eerder *Aeromonas* stammen geïdentificeerd door het bepalen van de DNA volgorde van het *gyrB* gen (Tabel 3). Uit deze vergelijking blijkt dat de soortensamenstelling in het distributiesysteem van Andijk of Braakman redelijk overeen te komen tussen 2012 en 2015, maar de soortensamenstelling in het distributiesysteem van Berenplaat of Weesperkarspel was in 2015 anders dan in 2012. De verschillen duiden op veel variatie in de *Aeromonas* populatie tussen de verschillende distributiegebieden en dat er tussen de jaren verschillen kunnen optreden in de aanwezige *Aeromonas*-soorten.

TABEL 3. SOORTSIDENTIFICATIE VAN DE *AEROMONAS* STAMMENCOLLECTIE. DEZE STAMMEN ZIJN VERZAMELD IN DIT DPWE ONDERZOEK EN IN EEN EERDER BTO ONDERZOEK (BTO 2013.228). DE *AEROMONAS* POPULATIE VAN HET DISTRIBUTIEGEBIED SCHEVENINGEN IS ALLEEN IN DIT ONDERZOEK GEANALYSEERD.

Soort/ Pompstation	Andijk		Berenplaat		Braakman		Weesperkarspel		Scheveningen
	DPWE	BTO	DPWE	BTO	DPWE	BTO	DPWE	BTO	
<i>A. bestiarum</i>	4	8			11			3	2
<i>A. hydrophila</i>	1								
<i>A. media</i>	1			4			15		6
<i>A. punctata</i>				2					
<i>A. rivuli</i>	24	13	1				7	18	35
<i>A. salmonicida</i>	3			1					
<i>A. sobria</i>	5	7			17	8	1	5	3
<i>A. veronii</i>	5		34	4	15	5	18	4	
Onbekend (geen match)	4	2		3	3		1	1	

3.2 Selectie van de stammen voor de groeiproeven

Op basis van de hierboven beschreven stammencollectie is een selectie gemaakt van stammen (Tabel 4) die zijn getest op de verdubbelingssnelheid en het groeimaximum bij toediening van verschillende C- en N-bronnen. Uit het voorzieningsgebied van Andijk zijn één *A. salmonicida*, één *A. hydrophila* en één *A. bestiarum* stam getest. Van *A. rivuli* en *A. sobria* (beiden geïsoleerd uit de voorzieningsgebieden van Berenplaat en Scheveningen) en *A. veronii* (geïsoleerd uit Weesperkarspel en Beerenplaat) zijn twee stammen als mengculturen getest. Als referentiestam is *Aeromonas salmonicida* M800, die in eerder onderzoek is gekarakteriseerd (van der Kooij en Hijnen, 1988), getest. Bij het maken van deze stammeselectie is er geen rekening mee gehouden of de geselecteerde stam uit een distributiegebied is geïsoleerd waar regelmatig *Aeromonas* overschrijdingen plaats vinden of dat er geen overschrijdingen zijn.

TABEL 4. SELECTIE VAN DE *AEROMONAS* STAMMEN, GEÏSOLEERD UIT DE VIJF VERSCHILLENDE VOORZIENINGSGEBIEDEN IN DE ZOMER VAN 2015 (BRAAKMAN INCLUSIEF NAJAAR), WAARVAN DE GROEIEIGENSCHAPPEN ZIJN BEPAALD.

Soort (nummer)	Locatie	<i>Aeromonas</i> nagroei	Monstercode	Getest ^a
<i>A. bestiarum</i> (1)	Andijk	+	875850	+
<i>A. hydrophila</i> (2)	Andijk	+	873282	+
<i>A. rivuli</i> (3)	Beerenplaat	+	1461989	Mengsel 1
<i>A. rivuli</i> (4)	Scheveningen	-	872916	Mengsel 1
<i>A. media</i> (5)	Weesperkarspel	+	871768	+
<i>A. salmonicida</i> (6)	referentiestam M800	(+)		+
<i>A. salmonicida</i> (7)	Andijk	+	873292	+
<i>A. sobria</i> (8)	Braakman	-	1453325	Mengsel 2
<i>A. sobria</i> (9)	Scheveningen	-	872991	Mengsel 2
<i>A. veronii</i> (10)	Weesperkarspel	+	871769	Mengsel 3
<i>A. veronii</i> (11)	Beerenplaat	+	1461461	Mengsel 3

^a Mengsel betekent dat in de groeiproeven om de C-bron te bepalen, beide stammen in een mengsel aan de flessen zijn gedoseerd. Bij het bepalen van de N-bron zijn de stammen afzonderlijk getest.

3.3 Groeiproeven

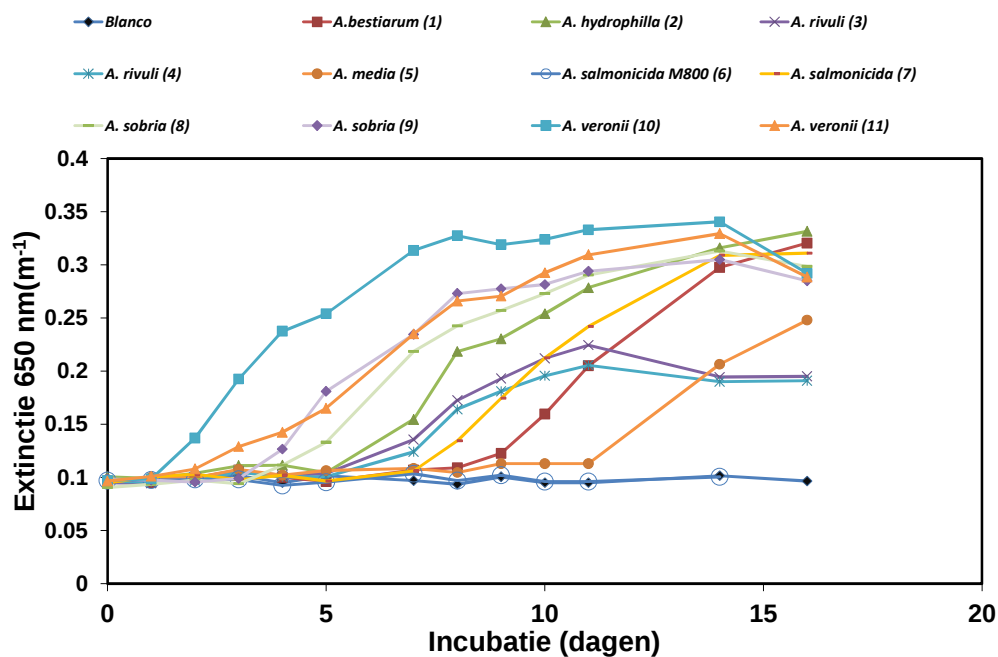
3.3.1 Ammonium en nitraat als stikstofbron

In een steriel medium met een relatieve hoge concentratie citraat werd of ammonium of nitraat aangeboden als N-bron. Na inoculatie met de verschillende *Aeromonas*-stammen werd de groei gevolgd aan de hand van de extinctie van het medium met een spectrofotometer.

De blanco en referentiestam *A. salmonicida* M800 groeiden niet met citraat als C-bron en ammonium of nitraat als N-bron. De overige stammen groeiden wel bij toediening van ammonium, maar niet bij dosering van nitraat (Figuur 1). *A. rivuli* is de enige stam die wel op nitraat groeit, al

is de groeiopbrengst lager dan op ammonium (Tabel 5). Hieruit blijkt dat de meeste stammen ammonium nodig hebben om op citraat als C-bron te kunnen groeien. De lagfase was voor de meeste *Aeromonas*-stammen relatief lang (2 tot 9 dagen), maar de groeimaxima komen wel overeen. Dit suggereert dan de affiniteit van de *Aeromonas*-stammen voor citraat verschilt. De aan- of afwezigheid van deze lag fase lijkt samen te hangen met het type C-bron, aangezien in groeiproeven waarin oleaat of arginine is gedoseerd als C-bron, er geen lag fase aanwezig is (Figuur 2).

De belangrijke rol van ammonium is eerder gevonden (van der Kooij en Hijnen, 1988). In deze studie was de lagfase korter en de groeiopbrengst hoger (factor 3 tot 5) vergeleken met het huidige onderzoek. Mogelijke oorzaken hiervoor zijn dat het inoculum van bacteriën al actiever was of al aangepast was aan citraat, wat de lagfase verkort. Een andere mogelijkheid is dat in het experiment van 1988 een hogere citraat concentratie is getest (huidige concentratie was correct). De waterkwaliteit zou ook van invloed kunnen zijn geweest. In de proeven van 1988 is drinkwater van Den Haag (duininfiltraat na langzame zandfiltratie) gebruikt waaraan EDTA is toegevoegd (dit i.v.m. met mogelijk toxisch effect van koper of andere metalen) en dat de huidige proeven zijn uitgevoerd in Tull-en 't Waal water dat is getapt van een monsterpunt zonder invloed van zware metalen.



FIGUUR 1. DE GROEICURVEN VAN DE VERSCHILLENDE STAMMEN OP 0,2 G CITRAAT-C/L MET AMMONIUM

TABEL 5. GROEI VAN DE VERSCHILLENDE STAMMEN OP 0,2 G CITRAAT-C/L, BIJ 15°C, OP AMMONIUM OF NITRAAT ALS N-BRON. WEERGEGEVEN IS DE GEMETEN EXTINCTIE IN DE SPECTROFOTOMETER BIJ 650 NM.

	Lag fase (dagen)	Maximum na 16 dagen	
	Ammonium (NH ₄)	Ammonium (NH ₄)	Nitraat (NO ₃)
<i>A. salmonicida</i> M800	Geen groei	0,104	0,103
Blanco	Geen groei	0,102	0,104
<i>A. bestiarum</i>	7	0,321	0,110
<i>A. hydrophilla</i>	4	0,332	0,104
<i>A. rivuli</i>	7	0,225	0,170
<i>A. rivuli</i>	7	0,206	0,156
<i>A. media</i>	9	0,248	0,101
<i>A. salmonicida</i>	9	0,311	0,097
<i>A. sobria</i>	4	0,313	0,099
<i>A. sobria</i>	4	0,305	0,099
<i>A. veronii</i>	2	0,341	0,105
<i>A. veronii</i>	2	0,330	0,095

Ondanks het verschil met het eerdere onderzoek, bevestigen deze resultaten dat alle stammen in het medium met ammonium als N-bron groeien en, vergeleken met de blanco, niet groeien wanneer nitraat als N-bron wordt gedoseerd. Uitzondering hierop is de stam *A. rivuli* die in de aanwezigheid van nitraat wel groeit (Tabel 5, Figuur 1), maar de groeiopbrengst voor *A. rivuli* was lager dan op ammonium. De verschillen in groei maxima tussen de verschillende *Aeromonas* stammen bij groei op ammonium zijn klein. Dit bevestigt de resultaten van 1988 dat de voorkeur van *Aeromonas* voor ammonium als N-bron een algemeen kenmerk is van de soort.

3.3.2 Groei op diverse koolstofbronnen

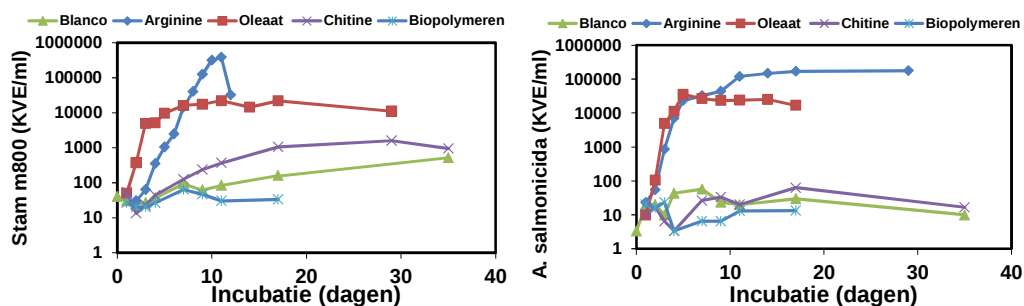
De stammen zijn getest op een lage concentratie (10 µg C/l) van twee eenvoudige stoffen waarvan in het onderzoek van 1988 was gebleken dat stam M800 daar gevoelig voor was: het aminozuur arginine en de langketige vetzuur oleaat. Daarnaast is chitine en een mengsel van biopolymeren (polysacchariden en eiwitten) gedoseerd, ook in relatief lage concentraties. Er is gekozen om de groei op chitine te testen, aangezien chitine het hoofdbestanddeel is van *Asellus aquaticus* en het vermoeden bestaat dat er een mogelijk verband is tussen *Aeromonas* groei en de aanwezigheid van *Asellus aquaticus* in het voorzieningsgebied.

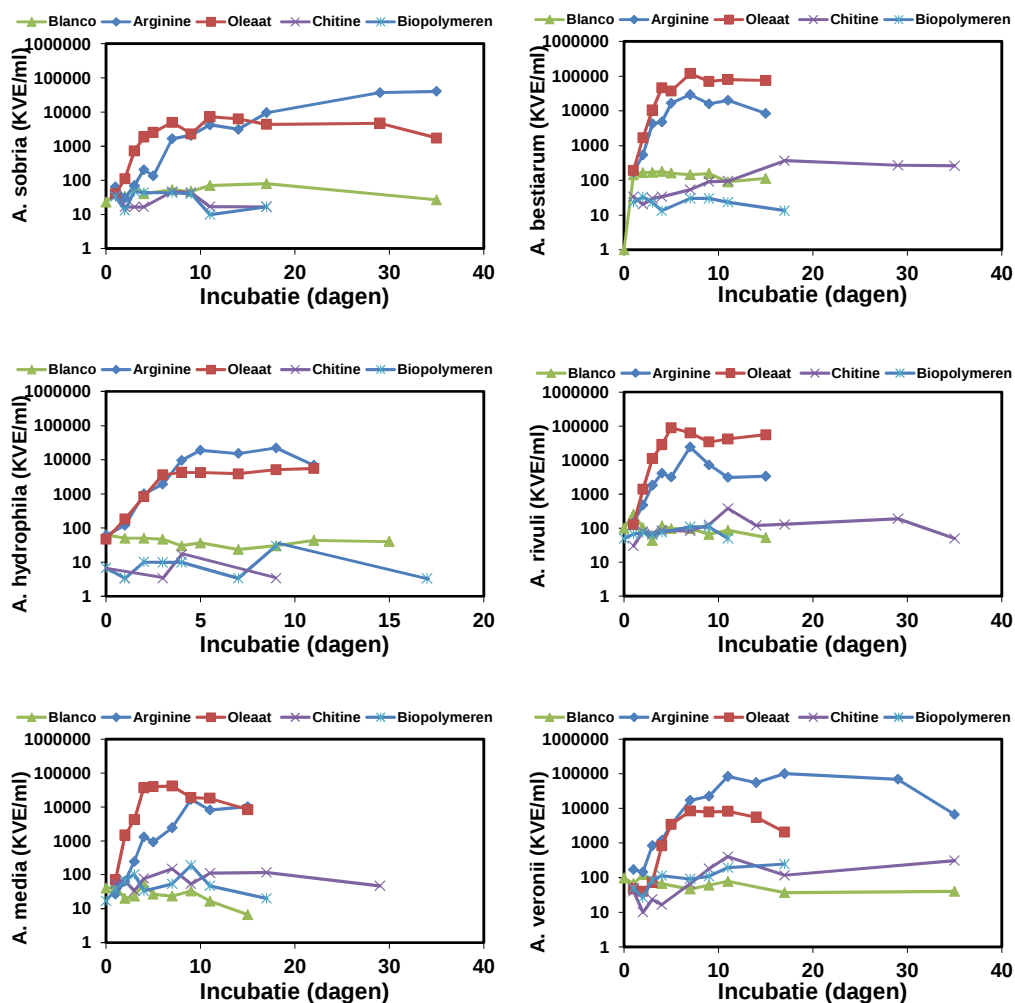
De resultaten tonen aan dat het gedrag van de verschillende stammen in de groeiproeven overeen komt (Figuur 2). Er vond nauwelijks tot geen groei plaats in de blanco groeiproef en bij alle *Aeromonas* stammen bij dosering van biopolymeren of chitine. Alleen de stam *A. salmonicida* (M800) toonde enige groei op chitine, en zowel *A. media* en *A. veronii* groeien licht op chitine en biopolymeren. In deze groeiproeven is nitraat gebruikt als N-bron wat mogelijk de beperkte of afwezigheid van groei kan veroorzaken. Nitraat wordt niet goed benut als N-bron zoals uit de proef met citraat blijkt. Het is mogelijk dat bij dosering van ammonium er meer groei op chitine en de biopolymeren optreedt.

Alle stammen groeiden wel op oleaat en arginine bij lage concentraties met nitraat als N-bron. De groeiopbrengst op deze verbindingen verschilde tussen de stammen (Tabel 6). Het aminozuur arginine bevat ook stikstof, wat de mogelijke moeilijke afbraak van nitraat kan opvangen door zowel als N- als C-bron te dienen. De *Aeromonas*-stammen groeien wel goed op het langketige vetzuur oleaat in aanwezigheid van nitraat. De groei in dit onderzoek laat echter een lagere verdubbelingssnelheid met een lagere opbrengst zien in vergelijking tot het eerdere onderzoek met de verbinding (van der Kooij en Hijnen, 1988). Deze verbinding bevat geen stikstof waardoor een mogelijke verklaring voor deze groei is dat nitraat selectief wordt benut door *Aeromonas*, bijvoorbeeld in combinatie met een C-bron waarvoor de bacterie een zeer hoge affiniteit heeft, maar dat leidt tot een lagere verdubbelingssnelheid en groeiopbrengst. De afwezigheid van een ammonium dosering heeft het voordeel dat de stammen op deze stoffen zijn getest onder drinkwater condities waarin de ammonium-gehalten normaal laag zijn.

Uit de groeiproeven zijn per stam de verdubbelingssnelheden V (h^{-1}) en de groeiopbrengst N_{max} (kve/ml) op oleaat en arginine berekend (Tabel 6). Alle stammen groeien op arginine en oleaat als C-bron. De verdubbelingssnelheden (V), en dus de groeikinetieken, op oleaat en arginine zijn vergelijkbaar tussen de stammen. De groei maxima verschillen wel tussen de *Aeromonas*-stammen (Tabel 6). Deze verschillen konden niet worden gekoppeld aan de herkomst van de stammen. Een mogelijke verklaring is de dosering van (moeilijk afbreekbare) nitraat en niet ammonium. Om dit uit te sluiten zijn vervolgprouwen gedaan waarin zowel nitraat als ammonium zijn gedoseerd om de effecten op verdubbelingssnelheid en groei maximum te kunnen vergelijken (paragraaf 3.3.3).

Met deze resultaten van dit onderzoek blijkt dat groei-eigenschappen van één *Aeromonas* stam M800 geïsoleerd uit drinkwater ten aanzien van een hoge affiniteit voor arginine en oleaat wordt bevestigd voor meerdere *Aeromonas*-stammen uit drinkwater en die tot verschillende *Aeromonas*-soorten behoren. Dit maakt het aannemelijk dat deze stammen aminozuren en langketige-vetzuren als bestanddelen van biomassa in het milieu bij lage concentraties benutten. De rol van de N-bron is in dit onderzoek ook naar voren gekomen en behoeft nader onderzoek.





FIGUUR 2. DE GROEICURVEN VAN DE *AEROMONAS* STAMMEN OP VERSCHILLENDE C-BRONNEN. DE GROEI-PROEVEN ZIJN UITGEVOERD BIJ 15°C EN IN DRINKWATER VAN TULL EN 'T WAAL.

TABEL 6. HET GROEI-MAXIMUM EN DE VERDUBBELINGSSNELHEID VAN DE VERSCHILLENDE *AEROMONAS* STAMMEN IN DE FLESSEN MET OLEAAT EN ARGININE BIJ 15°C, GERANGSCHIKT NAAR MAXIMALE OPBRENGSTEN.

Stammen Oleaat	Groeisnelheid Verdubbeling V (h ⁻¹)	Groeimaximum		Distributie ^a	
		Nmax (KVE/ml)	SD (KVE/ml)	Nagroeï	Locatie
<i>A. salmonicida</i> M800 '88	0,2	1,2×10 ⁵		?	GW
<i>A. salmonicida</i> M800 '15	0,14	2,4×10 ⁴	4,0×10 ³	?	GW
<i>A. salmonicida</i>	0,19	3,6×10 ⁴	3,5×10 ³	+	AND
<i>A. media</i>	0,13	5,0×10 ⁴	9,6×10 ³	+	WPK
<i>A. veronii</i>	0,12	1,0×10 ⁴	1,1×10 ³	+	WPK,BEP

<i>A. bestiarium</i>	0,11	1,2x10 ⁵	1,9x10 ³	+	AND
<i>A. rivuli</i>	0,11	9,6x10 ⁴	2,7x10 ⁴	+/-	BEP,SCH
<i>A. sobria</i>	0,09	9,0x10 ³	2,9x10 ³	-	SCH,BRA
<i>A. hydrophila</i>	0,09	5,8x10 ³	3,1x10 ²	+	AND
Stammen Arginine	V (h ⁻¹)	Nmax (KVE/ml)	SD (KVE/ml)	Nagroe	Locatie
<i>A. salmonicida</i> M800 '88	0,06	5,9x10 ⁴		?	GW
<i>A. salmonicida</i> M800 '15	0,06	3,8x10 ⁵	2,9x10 ⁴	?	GW
<i>A. salmonicida</i>	0,07	1,7x10 ⁵	2,0x10 ⁵	+	AND
<i>A. media</i>	0,08	2,0x10 ⁴	1,2x10 ⁴	+	WPK
<i>A. veronii</i>	0,05	1,2x10 ⁵	8,3x10 ³	+	WPK,BEP
<i>A. bestiarium</i>	0,07	3,2x10 ⁴	2,6x10 ³	+	AND
<i>A. rivuli</i>	0,07	2,4x10 ⁴	1,6x10 ⁴	+/-	BEP,SCH
<i>A. sobria</i>	0,05	4,1x10 ⁴	2,3x10 ⁴	-	SCH,BRA
<i>A. hydrophila</i>	0,10	2,3x10 ⁴	9,4x10 ³	+	AND

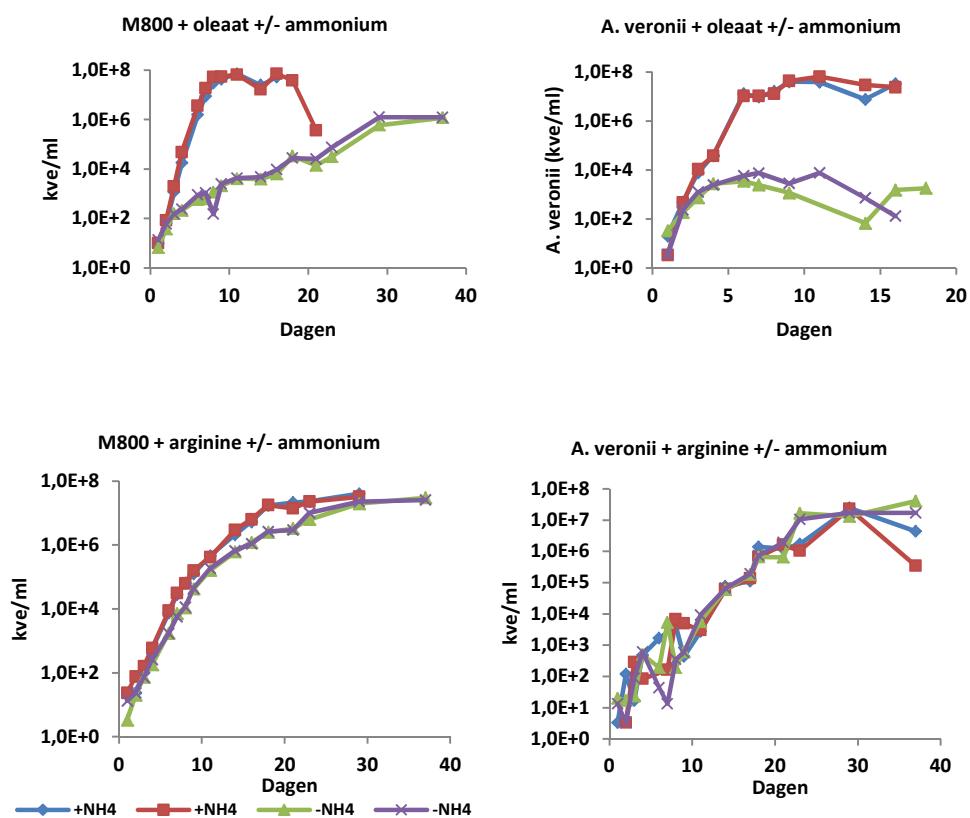
^a Wel of geen *Aeromonas* nagroe (overschrijdingen); GW= grondwater; AND = Andijk; WPK = Weesperkarspel; BEP = Berenplaat; SCH = Scheveningen; BRA = Braakman

3.3.3 Ammoniumlimitatie

Om de rol van ammonium als stikstofbron nader te onderzoeken zijn groeiproeven uitgevoerd met arginine of oleaat als C-bron en nitraat als N-bron waaraan wel of niet ammonium is gedoseerd. Hierbij is onbedoeld een hogere concentratie C-bron (waarschijnlijk een factor 1000 hoger) gedoseerd dan in de eerste proef (10 mg C/l).

A. hydrophila M800 en *A. veronii* hebben een relatief hoge verdubbelingssnelheid op oleaat in aanwezigheid van ammonium (Figuur 3, Tabel 7; V: 0,15 h⁻¹ respectievelijk 0,16 h⁻¹). Als alleen nitraat aanwezig is, en geen ammonium wordt gedoseerd, is de verdubbelingssnelheid lager (M800: 0,03 h⁻¹ en *A. veronii*: 0,12 h⁻¹). Het effect van de ammoniumdosering blijkt uit zowel de lagere verdubbelingssnelheid als uit de lagere opbrengst voor beide stammen op oleaat zonder ammonium (maar met nitraat) (Tabel 7): in afwezigheid van ammonium ligt de maximale groei voor M800 1,8 logeenheid en voor *A. veronii* ondanks de hogere groeisnelheid 4 logeenheden lager (Tabel 7). Hieruit kan worden geconcludeerd dat ammonium als N-bron de groei limiteert.

Op basis van deze verschillen in opbrengst op oleaat in het water kan worden berekend wat het N-verbruik in de flessen is in de flessen zonder en met ammonium-N dosering (Tabel 8). Hierbij is gebruik gemaakt van het C-gehalte van een bacteriecel, de C:N verhouding (Redfield *et al.*, 1934) en de celopbrengsten van de groeiproeven. In aanwezigheid van ammonium is door stam M800 495 en door *A. veronii* 364 µg NH₄-N/l gebruikt. Op basis van de opbrengsten in de flessen zonder ammoniumdosering kan worden geschat dat het natuurlijke N-gehalte dat stam M800 heeft benut 8,2 µg N/l is en dat voor *A. veronii* slechts 0,04 µg natuurlijk N/l ter beschikking was.



FIGUUR 3. GROECURVEN VAN *AEROMONAS* M800 (LINKS) EN *A. VERONII* (RECHTS), MET OLEAAT (BOVEN) OF ARGININE (ONDER) ALS C-BRON EN IN DE AAN- OF AFWEZIGHEID VAN AMMONIUM ALS N-BRON. DE GROEIPROEVEN ZIJN UITGEVOERD IN TWEEVOUD, BIJ 15°C EN IN DRINKWATER VAN TULL EN 'T WAAL.

TABEL 7. VERDUBBELINGSSNELHEID EN GROEIMAXIMUM VAN *A. HYDROPHILA* M800 EN *A. VERONII* MET OF ZONDER AMMONIUM ALS N-BRON

<i>A. salmonicida</i> M800	Verdubbelingssnelheid	Groeimaximum	
	V (h^{-1})	Nmax (kve/ml)	SD
+ oleaat + NH_4	0,15	$7,2E+07$	$2,4E+05$
+ oleaat - NH_4	0,03	$1,2E+06$	$1,3E+06$
+ arginine + NH_4	0,08	$4,0E+07$	$3,2E+07$
+ arginine - NH_4	0,06	$3,0E+07$	$2,6E+07$
<i>A. veronii</i>	V (h^{-1})	Nmax (kve/ml)	SD
+ oleaat + NH_4	0,16	$5,3E+07$	$1,8E+07$
+ oleaat - NH_4	0,12	$5,6E+03$	$2,9E+03$
+ arginine + NH_4	0,05	$2,4E+07$	$1,2E+06$
+ arginine - NH_4	0,04	$1,7E+07$	$2,4E+05$

TABEL 8. BEREKENING VAN NATUURLIJK STIKSTOFGEHALTE IN HET WATER VERRIJKT MET OLEAAT OP BASIS VAN DE GROEI PROEVEN MET EN ZONDER AMMONIUMDOSERING

		Zonder NH ₄		Met NH ₄	
		M800	<i>A. veronii</i>	M800	<i>A. veronii</i>
Literatuur	g C per cell	3,90E-14	3,90E-14	3,90E-14	3,90E-14
Gemeten	cells/ml	1,20E+06	5,60E+03	7,20E+07	5,30E+07
	cells/l	1,20E+09	5,60E+06	7,20E+10	5,30E+10
Biomassa berekeningen	g C biomassa/l	4,68E-05	2,18E-07	2,81E-03	2,07E-03
	mol C/l	3,9E-06	1,82E-08	2,34E-04	1,72E-04
Literatuur	C:N (Redfield)	0,15	0,15	0,15	0,15
Biomassa berekeningen	mol N/l	5,89E-07	2,75E-09	3,53E-05	2,6E-05
	g N/l	8,24E-06	3,85E-08	4,94E-04	3,64E-04
Berekend N-verbruik	µg N/l	8,2	0,04	495	364

Als arginine als C-bron wordt gedoseerd, zijn de verschillen in verdubbelingstijd en groeioptbrengst tussen de aan- en afwezigheid van ammonium gering. De verdubbelingsnelheden van M800 en *A. veronii* met of zonder ammonium liggen dicht bij elkaar (0,08 vs 0,06 h⁻¹ en 0,05 vs 0,03 h⁻¹). Ook de maximale opbrengsten van de groeiproef met arginine zijn zonder ammonium-dosering voor beide stammen in geringe mate lager dan met ammoniumdosering. De geringere verschillen worden veroorzaakt doordat arginine ook als N-bron wordt gebruikt, zoals eerder ook het geval was (paragraaf 3.3.2).

Bij gebruik van arginine als C-bron zijn er niet of nauwelijks verschillen in groei tussen aan- en afwezigheid van ammonium zoals dat in aanwezigheid van oleaat als C-bron wordt waargenomen (Figuur 3). Dit verschil tussen arginine en oleaat wordt veroorzaakt doordat arginine ook stikstof bevat en de geteste *Aeromonas*-stammen arginine blijkbaar ook als N-bron kunnen gebruiken. De groeimaxima van beide stammen op arginine zonder ammonium voor M800 en *A. veronii* zijn 26 en 29% log lager dan de groeimaxima met ammonium. Dit maximum wordt voor stam M800 dagen later bereikt. Dit toont dat stikstof in arginine zowel door M800 als *A. veronii* efficiënt kunnen worden gebruikt, maar dat dit wel een lagere celopbrengst oplevert.

Doordat in deze proef te hoge concentraties C-bron is gedoseerd is een vergelijking van deze gegevens met het onderzoek uit 1988 niet mogelijk. De gevoeligheid van de *Aeromonas*-stammen voor de aan- of afwezigheid van ammonium kan een de eerdere groeiproeven uit paragraaf 3.3.2 hebben beïnvloed. Deze groeiproeven zijn ingezet zonder ammonium, waardoor niet met zekerheid is te zeggen dat chitine en biopolymeren geen goede C-bron zijn voor *Aeromonas*. Idealiter moeten deze groeiproeven herhaald worden om betrouwbare conclusies over deze C-bronnen te kunnen trekken.

3.4 Groei van *Aeromonas* in het distributiesysteem

Genotypische karakterisering laat zien dat de soortensamenstelling van *Aeromonas* verschilt tussen de vijf voorzieningsgebieden. Binnen een voorzieningsgebied kan de soortensamenstelling

van *Aeromonas* tussen de jaren vergelijkbaar zijn maar ook verschillen. Blijkbaar verschillen de condities tussen de voorzieningsgebieden zowel in ruimte als in de tijd dusdanig dat dit leidt tot een specifieke *Aeromonas* soortensamenstelling. Onbekend is nog welke factoren hierbij van belang zijn. De resultaten suggereren dat hierbij het soort C- en N-bron en de concentraties hiervan een rol kunnen spelen. In de voorzieningsgebieden waarvan de *Aeromonas*-soortensamenstelling verschilt tussen de jaren, zou dit mogelijk veroorzaakt kunnen worden door bijvoorbeeld een verandering in de zuivering waardoor de waterkwaliteit is veranderd. Om te bepalen of dit ook daadwerkelijk het geval is, is aanvullend onderzoek nodig.

Er zijn geen overeenkomsten in soortensamenstelling tussen voorzieningsgebieden die wel *Aeromonas* overschrijdingen hebben en de gebieden die dat niet hebben. Dit suggereert dat er géén specifieke *Aeromonas*-stam is die in gebieden met sterkere nagroeicondities prevaleert.

Voor *Aeromonas* nagroei in het distributienet zijn het type C-bron én N-bron belangrijk. Het onderzoek heeft geen duidelijke aanwijzingen opgeleverd voor grote en systematische verschillen in groeikarakteristieken tussen de verschillende *Aeromonas* soorten die in de distributiegoedebieden van de Nederlandse drinkwaterbedrijven worden gevonden. Tevens worden de resultaten van het eerdere onderzoek in 1988 bevestigd dat *Aeromonas* kan groeien op langketige vetzuren en aminozuren, componenten die afkomstig zijn van biomassa. Tot slot blijkt ammonium onder zowel hoge als lage substraatcondities als N-bron van belang voor de groei van *Aeromonas*. Deze resultaten zijn indirecte aanwijzingen voor een mogelijke relatie van *Aeromonas* nagroei met de aanwezigheid van waterpissebedden (*Asellus aquaticus*) in het drinkwatersysteem. Olea is een belangrijk bestanddeel van *Asellus aquaticus* (Lau et al., 2013) die in het distributiesysteem voorkomt en het is bekend dat ongewervelde dieren (protozoa en invertebraten) een bron zijn van ammonium-productie in het distributienet. Protozoa maken ammonium vrij door 'sloppy feeding' waarbij de protozoa de voedselbronnen afbreken, maar niet geheel opnemen. Andere mogelijke ammoniumbronnen zijn bacteriofagen of grazende bacteriën (*Bdellovibrio*) die ammonium vrijmaken en de bacteriële afbraak van eiwitten en/of aminozuren die tot een overmaat stikstof leiden in de cel en wat mogelijk uitgescheiden kan worden als ammonium. Wat de bron van ammonium in het drinkwaterdistributienet is, moet worden vastgesteld in aanvullend onderzoek. De groei van *Aeromonas* op arginine met en zonder ammonium laat echter zien dat stikstof ook wordt benut uit organische stoffen zoals aminozuren (en eiwitten).

De resultaten van dit onderzoek zijn van belang om te begrijpen onder welke condities in het leidingnet er vermeerdering van *Aeromonas*-bacteriën mogelijk is. Van der Kooij (1992) heeft eerder resultaten getoond waaruit werd geconcludeerd dat directe vermeerdering van *Aeromonas* in water in aanwezigheid van de autochtone flora niet te verwachten valt. In diverse groeiproeven in drinkwater met sediment (spuiwater) aangevuld met een waterpissebed is echter aangetoond dat dit onder specifieke condities wel mogelijk is (Hijnen et al., 1992; Hijnen en Bahlman, 2016).

4 Conclusies en aanbevelingen

4.1 Conclusies

De mate van groei van *Aeromonas* verschilt per type C-bron. Op een lage concentratie langketige vetzuur als oleaat en het aminozuur arginine in drinkwater met nitraat-N en fosfaat-dosering, bleken alle geteste stammen te groeien. De resultaten laten zien dat voornamelijk de groeiopbrengst verschilt, terwijl de verdubbelingssnelheden vergelijkbaar zijn tussen de stammen. De verschillen zijn niet te relateren aan de herkomst van de stammen.

Niet alleen de C-bron is van belang voor *Aeromonas* groei, ook het type N-bron blijkt een belangrijke rol te spelen in de verdubbelingssnelheid en de groeiopbrengst. Alle *Aeromonas* stammen groeien op een hoge concentratie citraat met ammonium als N-bron maar niet als nitraat als N-bron wordt gedoseerd. Slechts één van de zes geteste stammen (*A. rivuli*) was in staat om in beperkte mate te groeien op citraat met nitraat als N-bron. Ook bij de lage concentraties in drinkwater bleek dat ammonium de groei van *Aeromonas* op oleaat ook beïnvloedde, terwijl dit op arginine vrijwel niet het geval was. De verschillen in verdubbelingssnelheid en groeimaximum tussen de *Aeromonas* stammen zijn het grootst voor oleaat en minder groot bij dosering van arginine als C-bron. In tegenstelling tot oleaat bevat arginine ook stikstof, waardoor wordt geconcludeerd dat de *Aeromonas*-stammen arginine als C- en N-bron kunnen gebruiken.

De conclusie over de groei op een mengsel van biopolymeren en specifiek chitine in dit onderzoek is gebaseerd op een groeiproef zonder ammonium. Op basis van de conclusies over de N-bron gevoeligheid van *Aeromonas* zouden deze proeven herhaald moeten worden om de groeimogelijkheid op biopolymeren definitief vast te kunnen stellen.

4.2 Aanbevelingen

- Achterhaal welke factoren van invloed zijn op de soortensamenstelling van *Aeromonas* in het drinkwaterdistributiesysteem.
- Groeiproeven uit paragraaf 3.3.2. herhalen met ammonium (i.p.v. nitraat) als N-bron.
- Groeikinetiek van een aantal stammen bepalen, zodat ook de affiniteit (en eventuele verschillen daartussen) duidelijk wordt.
- Achterhalen wat de ammoniumbron in het drinkwaterdistributienet is voor *Aeromonas*, zoals beschreven in paragraaf 3.4.
- Groeiproeven uitvoeren van *Aeromonas*-stammen op oleaat van ongewervelde dieren, als mogelijke belangrijke C-bron. Anticiperend hierop is in 2016 een onderzoek gestart naar het verband tussen *Aeromonas* en *Asellus aquaticus*. De mogelijke rol van andere ongewervelde dieren is hier nog niet in meegenomen.
- Groei op andere stoffen bepalen die mogelijk ook aanwezig zijn in het distributiesysteem. Eerder onderzoek heeft laten zien dat de soortensamenstelling die aanwezig is in de biofilm van een biofilmmonitor meer aangepast lijkt aan afbraak van eiwitten dan van

suikers en/of kortketige vetzuren. Aangezien *Aeromonas* ook aminozuren kan gebruiken is het belangrijk om meerdere aminozuren, polypeptiden en eiwitten te onderzoeken.

5 Referenties

Borchardt MA, Stemper ME and Standridge JH (2003). *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis. *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 224–228.

Figueras MJ, Alperi A, Beaz-Hidalgo R, Stackebrandt E, Brambilla E, Monera A and Martínez-Murcia AJ (2011). *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. *Int J Syst Evol Microbiol* 62(Pt2): 242-248

Hanninen ML and Siitonen A (1995). Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples. *Epidemiol. Infect.*, 115, 39–50.

Havelaar AH, Schets FM, van Silfhout A, Jansen WH, Wieten G and van der Kooij D (1992). Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water. *J. Appl. Bacteriol.*, 72, 435–444.

Hijnen WAM, Reijnen GK, Bos RMH, Veenendaal G and Van der Kooij D (1992) Lagere *Aeromonas*-aantallen in het drinkwater van pompstation Zuidwolde door verbeterde en vernieuwen van het filtergrind. *H2O* 25(14), 370-375.

Hijnen WAM en JA Bahlman (2016). Biologische stabiliteit van het water van bron tot in het leidingnet en het verband met *Aeromonas* nagroei bij twee Evides productielocaties gemeten in 2015. BTO 2016 in voorbereiding.

Kupfer M, Kuhnert P, Korczak BM, Peduzzi R and Demarta A (2006). Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2743-2751

Lau DCP, Goedkoop W, Vrede T (2013). Cross-ecosystem differences in lipid composition and growth limitation of a benthic generalist consumer. *Limnol. Oceanogr* 58(4):1149-1164.

Moyer NP, Luccini GM, Holcomb LA, Hall NH and Altwegg M (1992). Application of ribotyping for differentiating aeromonads isolated from clinical and environmental sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1940–1944.

Redfield AC (1934). On the proportions of organic derivations in sea water and their relation to the composition of plankton. In James Johnstone Memorial Volume. (ed. R.J. Daniel). University Press of Liverpool, pp. 176–192.

Van der Kooij D and Hijnen W (1988). Nutritional versatility and growth kinetics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from drinking water. Appl Environ Microbiol 55(11):2842-2851.

Van der Kooij D (1992) *Aeromonas* in drinkwater, vóórkomen, bestrijding, betekenis, Kiwa Onderzoek en Advies, Nieuwegein, Netherlands.

Van der Wielen P and Wullings B (2013). Moleculaire methoden voor de kwantificatie en identificatie van *Aeromonas* in drinkwater. BTO 2013.228 (s).

Yáñez MA, Catalán V, Apráiz D, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol 53: 875-883