

De rol van waterpissebedden bij de vermeerdering van *Aeromonas* in het drinkwaterdistributiesysteem

Nikki van Bel, Annemieke Kolkman, Paul van der Wielen (KWR Watercycle Research Institute), Jan Bahlman (Evides), Wim Hijnen (KWR Watercycle Research Institute, Evides)

In dit onderzoek is de rol van waterpissebedden bij de groei van *Aeromonas*-bacteriën in het drinkwaterdistributiesysteem bestudeerd. In onderzoek van KWR in samenwerking met de drinkwaterbedrijven Dunea, PWN, Waternet en Evides is vastgesteld dat in waterpissebedden uit het distributiesysteem grote aantallen *Aeromonas*-bacteriën kunnen voorkomen. In groeiexperimenten in aanwezigheid van andere waterbacteriën, blijkt dat *Aeromonas* snel groeit op deze organismen en op vetzuren en aminozuren die in hoge concentraties in waterpissebedden uit het distributienet voorkomen. Sediment blijkt bij deze groei een belangrijke rol te spelen.

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 (bijvoorbeeld *Legionella pneumophila*) en esthetische problemen (bijvoorbeeld geur/smaakproblemen en groei van waterpissebedden die het menselijk oog kunnen waarnemen). Vanwege de mogelijke nagroeiproblematiek zijn de bacteriën KG22 en *Aeromonas* in het Drinkwaterbesluit opgenomen als indicatororganismen voor nagroei en de biologische stabiliteit van het drinkwater. Deze parameters worden periodiek door drinkwaterbedrijven bepaald in drinkwatermonsters uit het distributiesysteem. Een *Aeromonas*-aantal in het distributiesysteem van maximaal 1.000 kolonievormende eenheden (kve) per 100 ml is daarbij de wettelijke norm waaraan de drinkwaterbedrijven moeten voldoen. In sommige distributiegebieden wordt deze norm echter, met name in de zomer, overschreden.

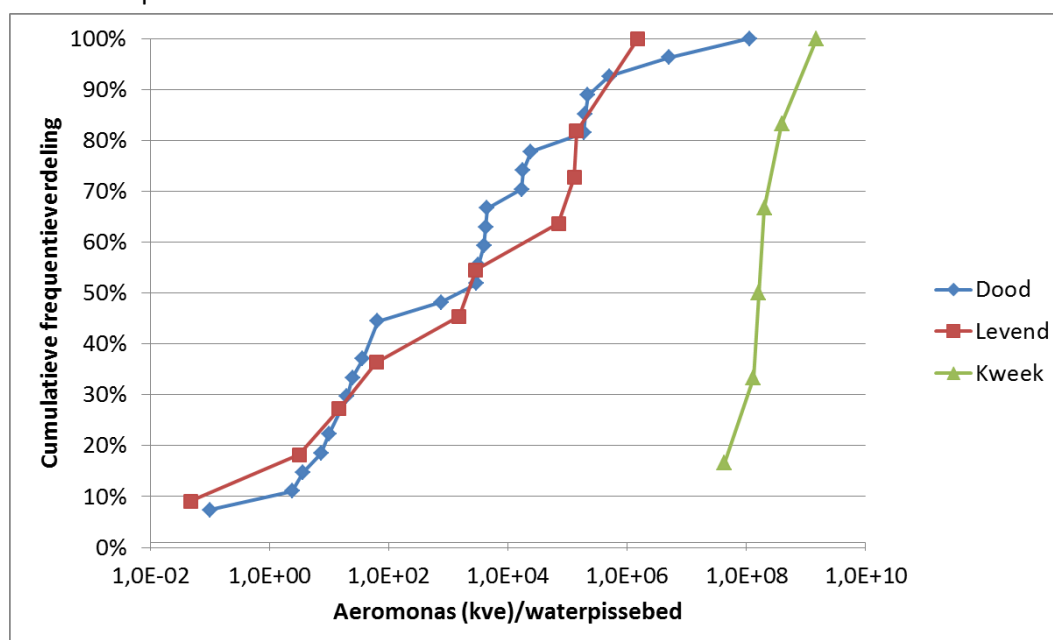
De betekenis van *Aeromonas* als nagroei-indicator staat ter discussie in de bedrijfstak. Er zijn namelijk geen directe verbanden gevonden tussen *Aeromonas* en aan nagroei gerelateerde gezondheidskundige of esthetische problemen (opportunistische pathogenen zoals *L. pneumophila*, geur/smaak, bruin 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 het is onduidelijk hoe en in hoeverre de groei van *Aeromonas* en de aanwezigheid van 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 Watercycle Research Institute in een samenwerkingsverband met de drinkwaterbedrijven Dunea, PWN, Waternet en Evides (DPWE).

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 en 7,2 mm. De *Aeromonas*-aantallen variëren sterk per waterpissebed ($< 5 - 1,5 \times 10^9$ kve per waterpissebed; afbeelding 1) en vertonen 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 exemplaren. 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 gedurende zeven weken niet afstierven, maken het aannemelijk dat *Aeromonas* niet schadelijk is voor waterpissebedden.



Afbeelding 1. *Aeromonas*-aantallen in waterpissebedden

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 er verschillende concentraties vetzuren en aminozuren 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 bevat één dode

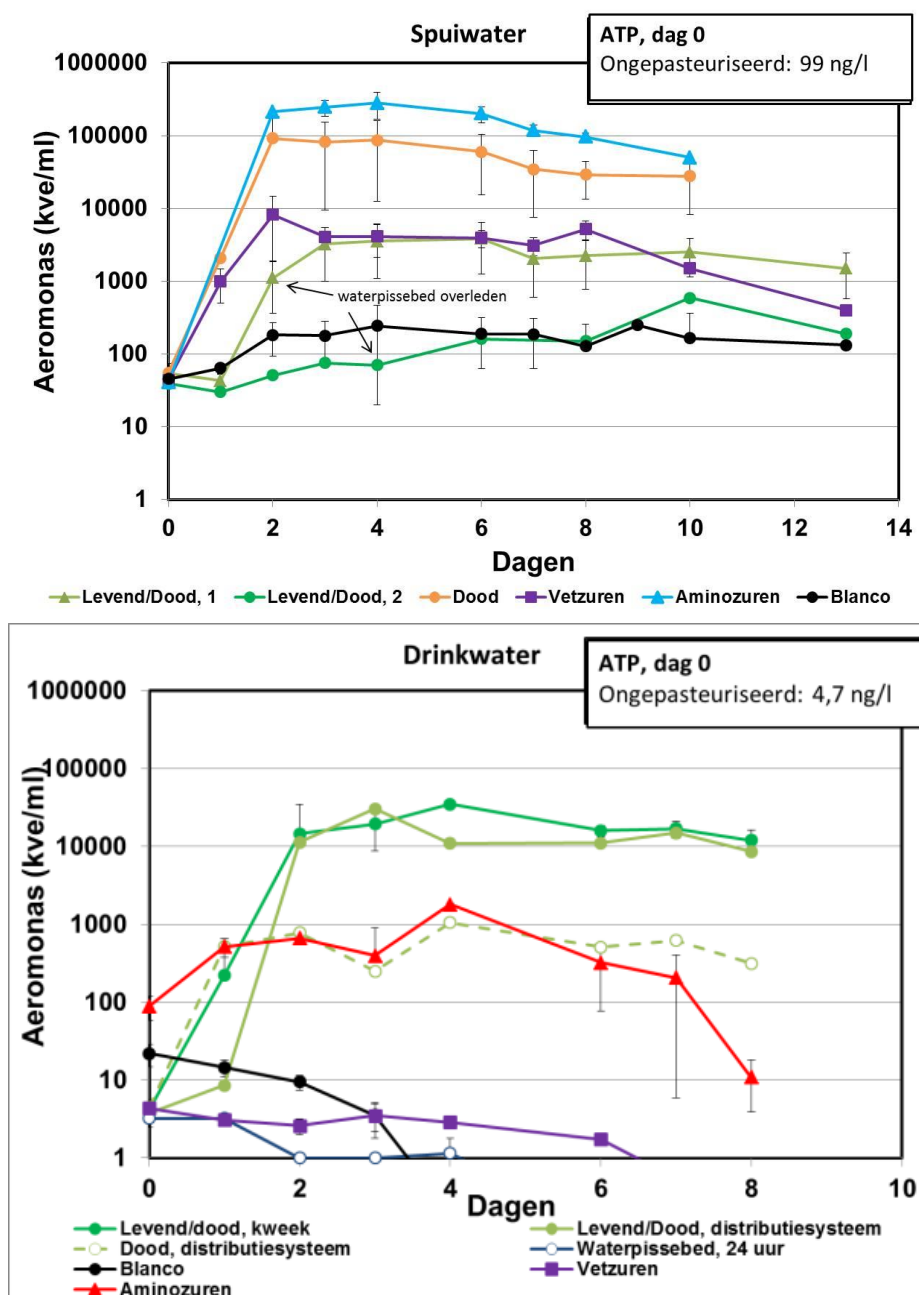
waterpissebed, gebaseerd op een gemiddeld drooggewicht van 1,6 mg per individu, een gemiddelde vetzuurconcentratie van $24,3 \pm 0,16 \mu\text{g}$, terwijl een levende waterpissebed gemiddeld $5,9 \pm 0,01 \mu\text{g}$ vetzuren bevat. De aminozuren arginine, lysine, glutamine en histidine zijn in de hoogste concentraties in levende individuen aangetroffen, terwijl de concentratie van deze aminozuren een factor 23,4 – 80,8 lager is in dode waterpissebedden. De gemiddelde aminozuurconcentratie (de som van alle gevonden aminozuren) in een levende waterpissebed is $21,3 \mu\text{g}$, terwijl in een dode waterpissebed $0,9 \pm 0,02 \mu\text{g}$ aminozuren is gevonden.

Dat dode waterpissebedden meer vrije vetzuren bevatten dan levende wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de afbraak die in dode exemplaren 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 de aminozuren na afbraak vrijkomen en gemakkelijker of sneller oplossen in water. Vervolgens kunnen ze door *Aeromonas* en andere micro-organismen voor hun groei worden benut.

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 onpasteuriseerd drinkwater. Hierdoor is de autochtone microbiële flora nog aanwezig in het water. Deze concurreert met *Aeromonas* om de beschikbare voedingsstoffen, net als in het echte drinkwaterdistributiesysteem.

In de proef waarbij de levende waterpissebedden zijn getest in spuiwater (afbeelding 2, boven), was het initiële biomassagehalte relatief hoog (99 ng ATP/l), maar de groei van *Aeromonas* gering (tot maximaal 385 keer de norm van 1.000 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. In spuiwater met een levende waterpissebed die na twee dagen stierf (lichtgroen) en bij dosering van een vetzurenmengsel (paars) is groei van *Aeromonas* zichtbaar. De maximaal 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 zorgen voor verhoogde groei van *Aeromonas* ten opzichte van de 'blanco' situatie waarin geen toevoegingen zijn gedoseerd. Dit wijst erop dat de bacterie groeit op stoffen die aanwezig zijn in de 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 *Aeromonas* kan afbreken, maar die geen onderdeel waren van deze studie.



Afbeelding 2. Groei van *Aeromonas* in spuiwater (boven) en drinkwater (onder) zonder toevoeging (blanco) of met verrijking van waterpissebedden of mengsels van aminozuren en vetzuren. Groeiproeven zijn in tweevoud uitgevoerd. Het gemiddelde met standaarddeviatie 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 groeiproef is de waterpissebed levend toegevoegd, maar 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 van 14 dagen constant, terwijl in drinkwater zonder toevoegingen de concentratie binnen twee weken is afgenomen tot onder de detectiegrens (afbeelding 2). Uit deze resultaten valt te concluderen dat voedingsstoffen uit het sediment (waarvan een hogere concentratie aanwezig is in het spuiwater dan in drinkwater) door *Aeromonas* worden opgenomen, zodat de bacterie niet afsterft tijdens de incubatieperiode. 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, onder), 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, waarbij voor de levende individuen een maximumwaarde van circa 2×10^4 kve/ml werd bereikt. Dit is vijf keer zo laag als het groeimaximum op dode waterpissebedden in de groeiproeven met spuiwater. De herkomst van de waterpissebedden had geen effect op de *Aeromonas*-toename in de groeiproeven. In drinkwater met het vetzurenmengsel werd geen toename van de *Aeromonas*-aantallen waargenomen. Amino-zuren zorgen wel voor verhoging van het aantal in drinkwater, maar de respons is meer dan honderd keer lager dan in spuiwater. Amino-zuren en vetzuren spelen in drinkwater waarschijnlijk wel een rol als deze samen voorkomen met een dode waterpissebed. Verhoogde groei van *Aeromonas* in spuiwater met en zonder waterpissebedden, en met amino-zuren 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.

Waterpissebedden als voedsel voor *Aeromonas*

De groeiproeven laten zien dat de *Aeromonas*-aantallen in 600 ml drinkwater met een levende of dode waterpissebed (gelijk aan 1.700 individuen per m³) in aanwezigheid van de autochtone microflora binnen twee dagen tot ruim (1.000 – 10.000 keer) boven de norm van 1.000 kve/100 ml 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 maximaal-aantallen in het distributiesysteem zijn echter voldoende om tot overschrijding van de norm voor *Aeromonas* te leiden. Aangezien het onderzoek is uitgevoerd onder gecontroleerde laboratoriumcondities (b.v. stilstaand water, constante temperatuur, etc.) kan de praktijk mogelijk verschillen. Hoewel 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.

Conclusies

De resultaten van deze studie 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.

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

Referenties

1. Wielen, P.W.J.J. van der (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. & Kooij D. van der (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. en Michels, U. (2015) Invertebrates in drinking water distribution systems. *GWF-Wasser/Abwasser International* issue (1), 52 - 55.
4. Lieverloo, J.H.M. van, Hoogenboezem, W., Veenendaal, G. en Kooij, D. van der (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.