

A network diagram consisting of various sized circles (nodes) connected by thin lines (edges). The nodes are arranged in a complex, interconnected pattern across the entire page. The circles are light blue with a darker blue outline, and the lines are a very light blue color. The background is a solid, vibrant blue.

KWR | November 2020

**Waterkwaliteit snel in  
Beeld: resultaten  
microbiologie**



## Samenwerkingspartners

Dit onderzoek is uitgevoerd in het project Waterkwaliteit Snel in Beeld: Real time metingen voor waterkwaliteit in opkweek en teelt, tot stand gekomen in het kader van het innovatieprogramma Glastuinbouw Waterproof en mede gefinancierd door de Stichting Kennis in je Kas, TKI Tuinbouw & Uitgangsmaterialen, TKI Water & Maritiem.



# Rapport

## Waterkwaliteit snel in Beeld: resultaten microbiologie

**KWR | November 2020**

### Opdrachtnummer

402794

### Projectmanager

Joep van den Broeke

### Opdrachtgever

TKI Watertechnologie, TKI Tuinbouw & Uitgangsmaterialen, Innovatieprogramma Glastuinbouw Waterproof

### Auteur(s)

Anthony Verschoor, Afnan Suleiman, Joep van den Broeke

### Kwaliteitsborger(s)

Paul van der Wielen, Gertjan Medema

Werkwijzen, rekenmodellen, technieken, ontwerpen van proefinstallaties, prototypen en door KWR gedane voorstellen en ideeën alsmede instrumenten, waaronder software, die in het onderzoeksresultaat zijn opgenomen, zijn en blijven het eigendom van KWR. Ook alle rechten die voortvloeien uit intellectuele- en industriële eigendom, alsmede de auteursrechten, blijven bij KWR berusten en derhalve eigendom van KWR.

### Keywords

waterkwaliteit, microbiologie, ATP, flowcytometrie, glastuinbouw, desinfectie

Jaar van publicatie  
2020

Meer informatie  
dr. Joep van den Broeke  
T +31 30 60 69 658  
E [joep.van.den.broeke@kwrwater.nl](mailto:joep.van.den.broeke@kwrwater.nl)

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511  
E [info@kwrwater.nl](mailto:info@kwrwater.nl)  
I [www.kwrwater.nl](http://www.kwrwater.nl)

**KWR**

November 2020 ©

Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - 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.

## Samenvatting

Bij het project Waterkwaliteit snel in Beeld is het belangrijk dat tuinders snel informatie kunnen krijgen over de fysisch/chemische en biologische waterkwaliteit. In het project Waterkwaliteit snel in Beeld is onderzocht welke methodes gebruikt kunnen worden om de microbiologische kwaliteit te bepalen van watermonsters op verschillende locaties bij een tuinbouwbedrijf.

In de periode april-juni 2020 zijn metingen gedaan met enkele geselecteerde methodes bij een praktijkbedrijf in de orchideeënteelt (Levoplant): het koloniegetal bij 22°C (KG22), celtellingen met behulp van flowcytometrie (FCM) en bepaling van het ATP-gehalte. Het KG22-getal liet duidelijk de veranderende waterkwaliteit in het systeem zien als gevolg van desinfectie en groei van micro-organismen in het water. De grootste nadelen van de KG22-methode zijn dat het koloniegetal geen beeld geeft van alle micro-organismen die in het water aanwezig zijn, en dat het drie dagen duurt voordat het resultaat binnen is. Daarom lijkt KG22 vooralsnog vooral waardevol als referentiemethode om microbiologische activiteit in tuinbouwsystemen te bepalen.

Celtellingen met behulp van FCM en bepaling van het ATP-gehalte geven daarentegen binnen enkele minuten resultaat over de microbiologische waterkwaliteit. Celtellingen met FCM zijn echter niet goed in staat om het effect van desinfectie, met name UV-desinfectie, op micro-organismen te meten. Daarnaast is de methode ook nog altijd relatief complex en duur om in de tuinbouw-praktijk toe te passen. ATP-Metingen met lijken wel geschikt om de microbiologische waterkwaliteit in de tuinbouw te volgen van bron tot druppelaar. Daarnaast laat de celgebonden ATP-concentratie een goede correlatie zien met het KG22-getal, waarmee celgebonden ATP-concentraties van het water voorspellend zijn voor KG22 in de onderzochte watertypen. ATP-metingen zijn daarnaast betaalbaar en kunnen op locatie worden uitgevoerd, waardoor dit een veelbelovende methode is om de microbiologische waterkwaliteit snel in beeld te kunnen brengen. Het is wel aan te bevelen om aanvullende ATP- en KG22-metingen uit te voeren op watermonsters afkomstig van andere tuinbouwbedrijven, zodat duidelijk wordt of ATP-metingen over een brede linie van tuinbouwbedrijven kan worden gebruikt om de waterkwaliteit snel in beeld te brengen.

# Inhoud

<b>Samenwerkingspartners</b>	<b>2</b>
<b>Rapport</b>	<b>3</b>
<b>Samenvatting</b>	<b>4</b>
<b>Inhoud</b>	<b>5</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>7</b>
<b>2 Materiaal en methoden</b>	<b>8</b>
2.1 Bemonstering	8
2.2 Uitgevoerde analyses	8
2.2.1 Koloniegetal bij 22°C (KG22)	8
2.2.2 Flowcytometrie	9
2.2.3 Adenosinetrifosfaat (ATP)	9
2.2.4 Correlatieanalyse	9
<b>3 Resultaten</b>	<b>10</b>
3.1 Koloniegetal bij 22°C (KG22)	10
3.2 Directe celtellingen m.b.v. flowcytometrie (FCM)	11
3.3 Adenosinetrifosfaat (ATP)	13
3.4 Correlatieanalyse	15
3.4.1 Voorspelling van KG22	15
3.4.2 Voorspelling microbiologische activiteit o.b.v. sensing	15
<b>4 Discussie en conclusies</b>	<b>19</b>
4.1 Discussie: voors en tegens van de gebruikte methoden	19
4.1.1 Koloniegetal	19
4.1.2 Celtellingen met behulp van flowcytometrie	19
4.1.3 ATP-gehalte	20
4.2 Conclusies en aanbevelingen	20

Tabel 1. Gebruikte begrippen/afkortingen

Begrip/afkorting	Volledige term	Uitleg
ATP	Adenosinetrifosfaat (Adenosine Tri Phosphate)	ATP komt voor in iedere levende cel. Het gehalte adenosinetrifosfaat (ATP) wordt gebruikt als maat voor de hoeveelheid actieve biomassa.
DCT	Directe celtellingen	Methode om (optisch) cellen te tellen, bijvoorbeeld met een microscoop of met een flowcytometer, zoals in deze studie is gedaan.
FCM	FlowCytoMeter of FlowCytoMetrie.	Methode voor het tellen van microscopisch kleine deeltjes in een vloeistof.
KG22	Koloniegetal bij 22°C	Koloniegetal op glucosegistextractagar, bepaald na drie dagen incubatie bij 22°C
UV	Ultraviolet	Ultraviolette straling ('licht') wordt toegepast als methode om micro-organismen in water af te doden (water te desinfecteren).

# 1 Inleiding

Waterkwaliteit is momenteel voor tuinders een 'zwarte doos': als er al iets gemeten wordt dan is het vaak alleen maar geleidbaarheid. Om beter zicht te krijgen op de waterkwaliteit is er een grote behoefte aan nieuwe methodes om de biologische en chemische waterkwaliteit te kunnen bepalen, om op basis hiervan de waterkwaliteit te kunnen bijsturen. Momenteel is er nog weinig monitoringstechnologie beschikbaar om tegemoet te komen aan deze behoefte, en als deze al bestaat dan betreft het zeer kostbare technologie of methodes die te langzaam zijn om hier in de praktijk mee te kunnen werken. Een belangrijk doel van het project is te komen tot een selectie van een of enkele methodieken om snel de mate van desinfectie van water vast te kunnen stellen.

Fysisch-chemische parameters zoals bijvoorbeeld pH, geleidbaarheid, temperatuur zijn doorgaans vrij eenvoudig en snel te meten met behulp van sensoren. Voor microbiologische parameters ligt dat anders: de gangbare manier om een indruk te krijgen van de microbiologische waterkwaliteit is door bepaling van het koloniegetal (ook wel kiemgetal genoemd). Hierbij wordt een watermonster genomen en opgestuurd naar het laboratorium, die het monster op een agarplaat met voeding brengt. Na incubatie van enkele dagen wordt het aantal kolonies geteld (waarbij elke kolonie is veroorzaakt door één bacterie in het watermonster) en krijgt de tuinder de uitslag terug. Op zich is dit een nauwkeurige methode, maar de wachttijd van enkele dagen (soms meer dan een week) maakt het niet mogelijk om snel te kunnen reageren als er veranderingen ontstaan in de waterkwaliteit of in de waterbehandeling. Daarnaast is slechts een beperkt deel van de aanwezige bacteriën in staat om op deze agarplaat te groeien. Daarom zijn twee alternatieve methodes onderzocht: flowcytometrie (FCM) en bepaling van het gehalte adenosinetrifosfaat (ATP):

- Met flowcytometrie worden alle bacteriecellen in het water middels een automatische manier geteld.
- ATP is aanwezig in alle levende cellen en het ATP-gehalte in water is daarom een maat voor de hoeveelheid actieve biomassa).

Met beide methodes kan in korte tijd (enkele minuten) een beeld gevormd worden van de microbiologische waterkwaliteit. Door deze variabelen te meten op verschillende punten in de waterketen van een praktijkbedrijf, en op verschillende tijdstippen, kan worden achterhaald in hoeverre deze methodes in staat zijn om verschillen in waterkwaliteit afdoende te beschrijven. Door deze resultaten vervolgens te vergelijken met het koloniegetal kan ook beoordeeld worden of deze variabelen de microbiologische waterkwaliteit vergelijkbaar voorspellen als het koloniegetal. Uiteindelijk zal dit een indruk geven van de geschiktheid van de nieuwere methodes voor snellere beoordeling van de microbiologische waterkwaliteit.



## 2 Materiaal en methoden

### 2.1 Bemonstering

Bij Levoplant (locatie Herenwerf Maasland) zijn watermonsters genomen van verschillende stappen in de waterketen van de orchideeënteelt. Bij het bedrijf wordt gebruik gemaakt van twee waterbronnen: hergebruikt drainwater en opgevangen hemelwater, soms aangevuld met hemelwater afkomstig uit omgekeerde osmose. Zowel het drainwater als het regenwater worden met UV ontsmet, waarna dit wordt opgeslagen in silo's. De nutriëntconcentraten worden opgeslagen in twee bakken, de A-bak en de B-bak. Gietwater wordt bereid door de concentraten vanuit de A-en B-bak te mengen met het opgeslagen drain- en hemelwater, al dan niet aangevuld met osmosewater. Dit aangemaakte gietwater kan vervolgens opnieuw ontsmet worden door het door een chloreringseenheid te leiden. Hierna wordt het gietwater door leidingen naar de planten getransporteerd, waar het via druppelaars wordt toegediend. Het overtollige drainwater wordt ten slotte weer opgevangen om opnieuw gebruikt te kunnen worden.

In totaal zijn er maandelijks 13 punten bemonsterd (tabel 2), op 7 april, 11 mei en 8 juni 2020. Deze monsters zijn binnen 24 uur geanalyseerd in het laboratorium van KWR.

Tabel 2. Bemonsterde punten, gerangschikt naar volgorde in de waterketen

Monsterpunt
Opvang (vuil) drainwater(1)
Opvang hemelwater(2)
Ontsmet drainwater direct na UV(6)
Ontsmet hemelwater direct na UV(8)
Opslag ontsmet drainwater(3)
Opslag ontsmet hemelwater(5)
Omgekeerde - osmosewater(7)
A-BAK (9)
B-BAK (10)
Gietwater + chloor achter unit(11)
Gietwater zonder chloor(13)
Gietwater bij druppelaar + chloor(12)
Gietwater bij druppelaar zonder chloor (4)

### 2.2 Uitgevoerde analyses

#### 2.2.1 Koloniegetal bij 22°C (KG22)

Dit onderzoek is bedoeld om het aantal kolonievormende micro-organismen te bepalen in watermonsters. Bij deze kweekmethode komt slechts een gedeelte van de in het water aanwezige kiemen tot kolonievorming. Het koloniegetal bij 22°C (KG22) is een maat voor het aantal heterotrofe bacteriën (dit zijn bacteriën die in staat zijn te groeien met een organisch substraat) en/of schimmels die in staat is te groeien op glucosegistextractagarmedium. KG22 werd bepaald volgens KWR Huisvoorschrift LMB-032, gelijkwaardig aan NEN-EN-ISO 6222. Hierbij werd in duplo 1 mL van het monster in een petrischaal gebracht waarna het gemengd werd met een vloeibare

agarvoedingsbodem. Nadat de agarvoedingsbodem gestold was, werd deze geïncubeerd bij 22°C. Na 3 dagen werden alle hierop ontstane kolonies geteld.

### 2.2.2 Flowcytometrie

Flowcytometrie is een techniek voor het tellen en bestuderen van in een stromende vloeistof voorkomende microscopisch kleine deeltjes. Hiervoor wordt een flowcytometer gebruikt. Deze kan uitgebreid worden met een sorteermodule om de geïdentificeerde deeltjes te selecteren (FACS-sorter genaamd). Bacteriële celtellingen werden uitgevoerd door middel van flowcytometrie volgens huisvoorschrift LMB-013 (Becton Dickinson FACSCalibur flowcytometer), waarbij door middel van aankleuren met verschillende fluorescerende kleurstoffen, cellen met en zonder intacte membranen (levend/dood) onderscheiden konden worden (rapportagegrens 1000 cellen mL<sup>-1</sup>).

### 2.2.3 Adenosinetrifosfaat (ATP)

Het ATP-gehalte is een maat voor de actieve biomassa in het monster. Analyses van adenosinetrifosfaat (ATP) werden uitgevoerd volgens KWR huisvoorschrift LMB-002, gelijkwaardig aan NEN-EN 16421:2014. Dit is gedaan na enzymatische reactie (luciferine, luciferase) in een zeer gevoelige fotometer (Celsis Advance luminometer), waarbij onderscheid gemaakt werd tussen celgebonden en vrij ATP.

ATP is een energiedrager die aanwezig is in alle levende organismen. ATP wordt in de cel gevormd bij de oxidatie van energiebronnen en vervolgens weer gebruikt bij de synthese van nieuw celmateriaal. De ATP bepaling berust op de luciferine-luciferase reactie, waarbij ATP onder vorming van licht (een foton per molecuul ATP) overgaat in adenosinedifosfaat (ADP). Met behulp van lichtgevoelige apparatuur kan de lichtproductie nauwkeurig worden gemeten. De werkwijze levert binnen enkele minuten een resultaat op. De detectiegrens van de bepaling bij direct onderzoek van drinkwater bedraagt ca. 1 ng ATP l<sup>-1</sup>. Op basis van gemiddelde waarden voor het ATP-gehalte per bacteriecel kan met het ATP-gehalte een schatting worden gemaakt van de concentratie aan actieve (levende) bacteriën. Elke bacteriële cel bevat ca 5x10<sup>-15</sup> gram ATP.

De ATP-bepaling wordt gebruikt voor de bepaling van de biomassaconcentratie in leidingwater en in biofilms en in testen voor de bepaling van de biologische (in)stabiliteit van water en de groeibevorderende eigenschappen van materialen in contact met leidingwater.

### 2.2.4 Correlatieanalyse

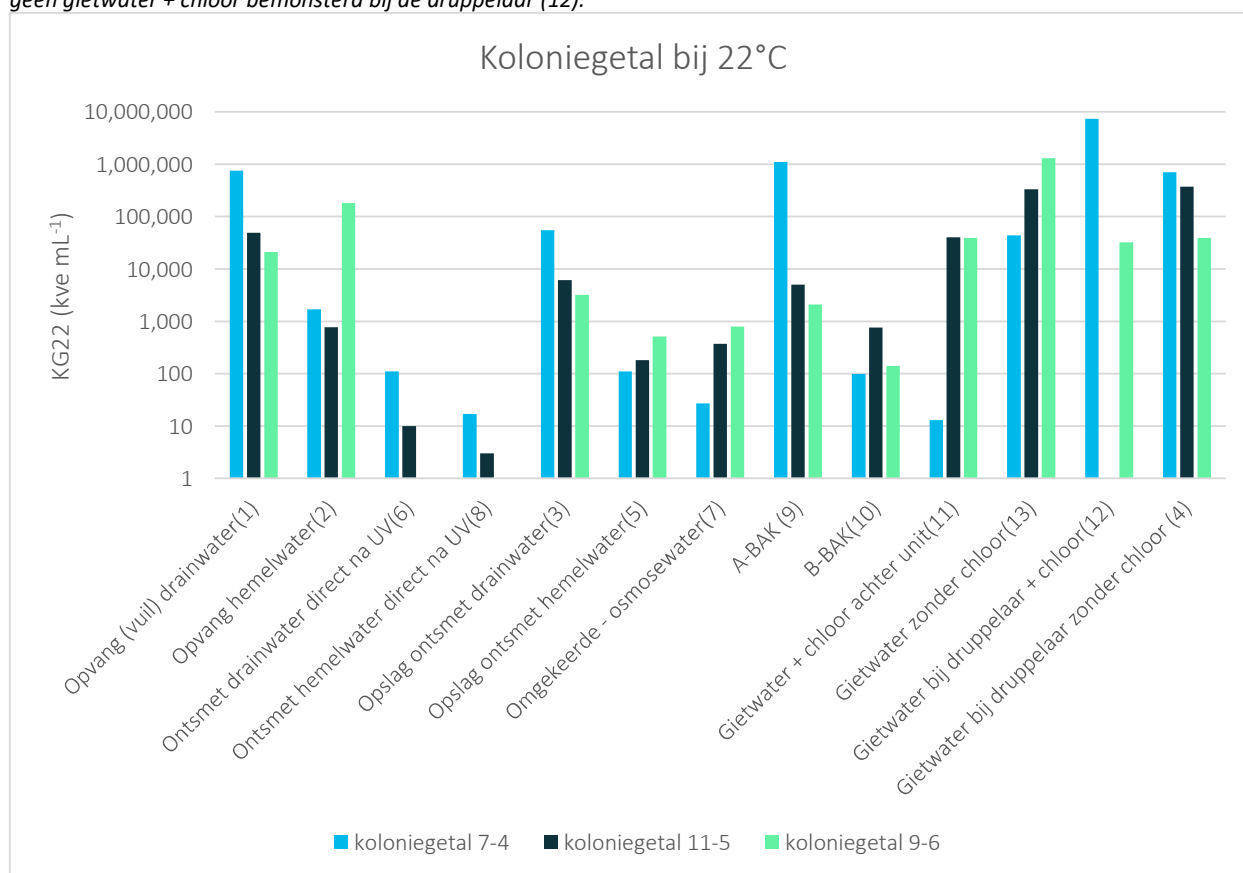
Door middel van lineaire correlatie volgens Pearson is onderzocht in hoeverre het koloniegetal KG22 gecorreleerd is met het totaal aantal cellen of het aantal cellen met een intacte membraan, zoals bepaald met flowcytometrie, en met de concentratie totaal en/of deeltjesgebonden ATP. Een voorwaarde voor het toepassen van Pearson correlatie is dat de spreiding in de biomassagetallen laag is. Daarom zijn alle waarden log-getransformeerd voordat de correlatieanalyse werd uitgevoerd. Verder zijn getallen die onder de detectiegrens vielen niet meegenomen in de correlatie, omdat hiervan niet goed achterhaald kan worden wat de werkelijke waardes waren. De correlatiecoëfficiënt R<sup>2</sup> geeft aan hoe sterk het verband tussen de parameters is.

## 3 Resultaten

### 3.1 Koloniegetal bij 22°C (KG22)

In figuur 1 staan de kolonievormende eenheden (kve) van KG22 per ml weergegeven voor de verschillende watermonsters genomen op 7 april, 11 mei en 8 juni 2020. Het drainwater bevat, zoals valt te verwachten, hoge koloniegetallen (21.000-750.000 kve mL<sup>-1</sup>). Direct na UV neemt het KG22-getal fors af tot net boven de 100 of niet detecteerbaar (< 1 kve mL<sup>-1</sup>). Tijdens de opslag van het UV-ontsmette drainwater neemt het KG22-getal weer toe (3.200-55.000 kve mL<sup>-1</sup>). In het opgevangen hemelwater is het KG22-getal over het algemeen wat lager dan in drainwater (770-18.000 kve mL<sup>-1</sup>), maar de aantallen nemen ook sterk af na UV (1-17 kve mL<sup>-1</sup>). Tijdens de regenwateropslag neemt het KG22-getal in het water weer toe (110-510 kve mL<sup>-1</sup>). Het KG22-getal van het omgekeerde-osmosewater is relatief laag, maar relatief hoog in de A-bak (2.100-1,1 miljoen) en weer wat lager in de B-bak (99-760 kve mL<sup>-1</sup>). Opvallend was dat het overgrote deel van de kolonies (>90%) in het watermonster uit de B-bak uit schimmels bestond. De KG22 van het gietwater direct achter de unit met chloor varieert sterk tussen april (13 kve mL<sup>-1</sup>) en mei-juni (39.000-40.000). Deze aantallen nemen toe wanneer geen chloor is gedoseerd (44.000-1,3 miljoen kve mL<sup>-1</sup>). Het KG22-getal in gietwater bij de druppelaar lijkt niet te verschillen tussen behandeling met chloor (32.000-7,3 miljoen kve mL<sup>-1</sup>) en zonder chloor (4) (39.000-700.000 kve mL<sup>-1</sup>).

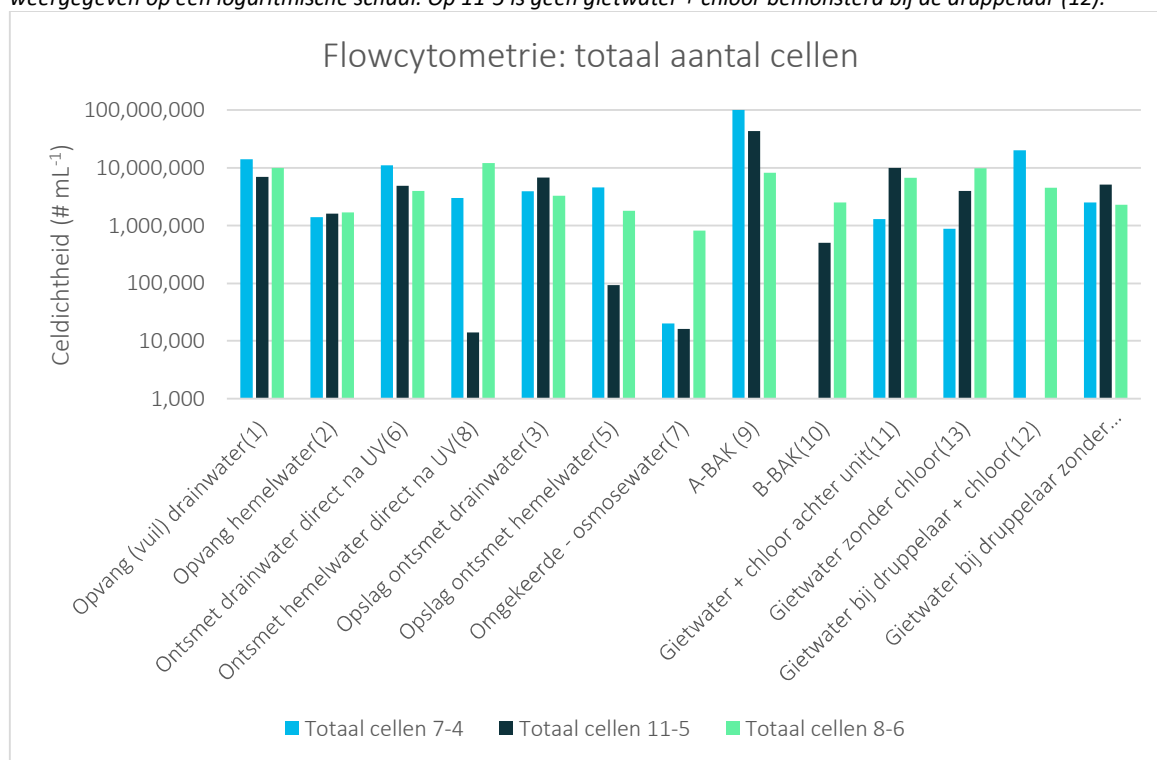
*Figuur 1. Koloniegetal bij 22°C (KG22) op verschillende monsterpunten bij Levoplant, en op verschillende monsterdata (7 april, 11 mei, 8 juni). Vanwege grote verschillen in hoeveelheden staat KG22 weergegeven op een logaritmische schaal. Op 11-5 is geen gietwater + chloor bemonsterd bij de druppelaar (12).*



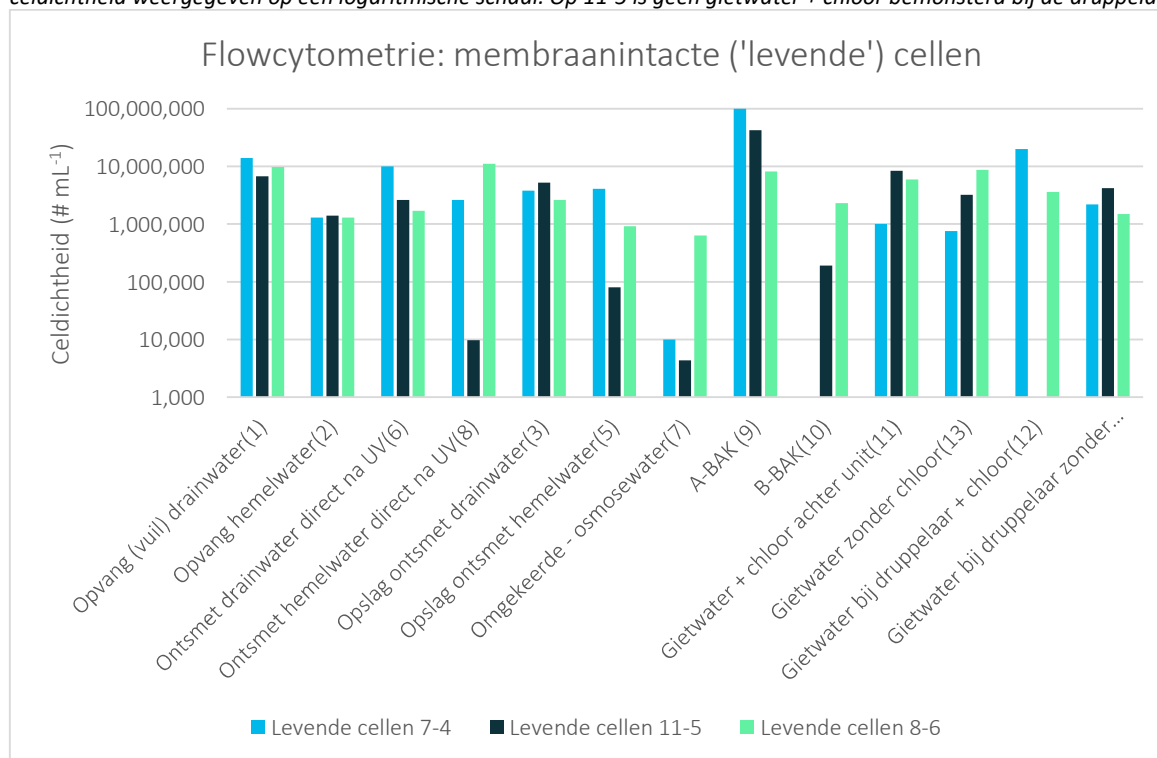
### 3.2 Directe celtellingen m.b.v. flowcytometrie (FCM)

In figuur 2 staan de gegevens weergegeven voor de bacteriële celtellingen m.b.v. flowcytometrie (FCM) voor het totaal aantal cellen, en in figuur 3 voor de membraanintacte ('levende') cellen. Het aandeel membraanintacte cellen was over het algemeen hoog (gemiddeld 79%); alleen in omgekeerde-osmosewater was dit lager (51%). In de opvang van drainwater zijn de aantallen bacteriecellen hoog (totaal aantal cellen  $7 - 14 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ , levende cellen  $6,7 - 14 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ ); in de opvang hemelwater zijn deze aantallen een ordegrrootte lager (totaal aantal cellen  $1,4 - 1,7 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ , levende cellen  $1,3 - 1,4 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ ). Direct na UV zijn de aantallen bacteriecellen licht afgenomen in drainwater (totaal aantal cellen  $4 - 11 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ , levende cellen  $1,7 - 10 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ ). In hemelwater na UV waren de aantallen cellen ook lager, waarbij een grote variatie werd gezien tussen de monsterdagen (totaal aantal cellen  $1,4 \times 10^4 - 1,7 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ , levende cellen  $9,7 \times 10^3 - 11 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ ). De aantallen bacteriecellen in het opgeslagen drainwater en hemelwater zijn vergelijkbaar met de aantallen in deze watertypen direct na UV. Voor het opgevangen drainwater lag het totaal aantal cellen tussen de  $3,3-6,8 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$  en de aantallen intacte cellen tussen de  $2,6 - 5,2 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ . Voor het opgevangen hemelwater lag het totaal aantal cellen tussen de  $9,3 \times 10^4 - 4,6 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ , en het aantal intacte cellen tussen de  $8,0 \times 10^4 - 4,1 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ . De relatieve afname van het totaal aantal bacteriecellen en membraanintacte cellen na UV en de toename in het water tijdens de opslag zijn dus een stuk minder groot dan bij KG22. Dit wordt veroorzaakt doordat UV-desinfectie ingrijpt op het DNA van bacteriën en niet op de celwand of celmembraan. Het gevolg is dat bacteriecellen worden afgedood, terwijl hun membraan intact blijft, waardoor ze door FCM worden geteld als intacte cellen. In het water na omgekeerde osmose zijn de celaantallen lager waarbij het totaal aantal cellen ligt tussen  $1,6 \times 10^4 - 8,2 \times 10^5$  cellen  $\text{mL}^{-1}$  en de membraanintacte cellen tussen de  $4,3 \times 10^3 - 6,3 \times 10^5$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ . In het water van de A-bak zijn de celaantallen hoog (totaal  $8,2 - 100 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$  en membraanintact  $8,1 \times 10^6 - 1,0 \times 10^8$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ ), terwijl deze aantallen in de B-bak duidelijk lager zijn (totaal aantal cellen  $5,0 \times 10^5 - 2,5 \times 10^6$  en intacte celaantallen  $1,9 \times 10^5 - 2,3 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ ). Op 7 april was het aantal bacteriecellen in het water van de B-bak niet betrouwbaar te meten met FCM, vanwege de groengele kleur van het water. Nadat het gietwater is behandeld en wordt gebruikt in de kassen laat het gietwater min of meer dezelfde celdichtheden zien bij de druppelaars, ongeacht het chloorgehalte. Deze aantallen zijn steeds in het bereik van  $1 - 10 \times 10^6$  cellen  $\text{mL}^{-1}$ . Uit deze resultaten volgt dat flowcytometrie minder grote verschillen lijkt te laten zien dan het koloniegetal, en is minder geschikt om het effect van UV-ontsmetting te kunnen beoordelen.

Figuur 2. Directe celltellingen m.b.v. flowcytometrie (FCM): totaal aantal cellen op verschillende monsterpunten bij Levoplant, en op verschillende monsterdata (7 april, 11 mei, 8 juni). Vanwege grote verschillen in hoeveelheden staat de celdichtheid weergegeven op een logaritmische schaal. Op 11-5 is geen gietwater + chloor bemonsterd bij de druppelaar (12).



Figuur 3. Directe celltellingen m.b.v. flowcytometrie (FCM): dichtheden membraanintacte ('levende') cellen op verschillende monsterpunten bij Levoplant, en op verschillende monsterdata (7 april, 11 mei, 8 juni). Vanwege grote verschillen in hoeveelheden staat de celdichtheid weergegeven op een logaritmische schaal. Op 11-5 is geen gietwater + chloor bemonsterd bij de druppelaar (12).

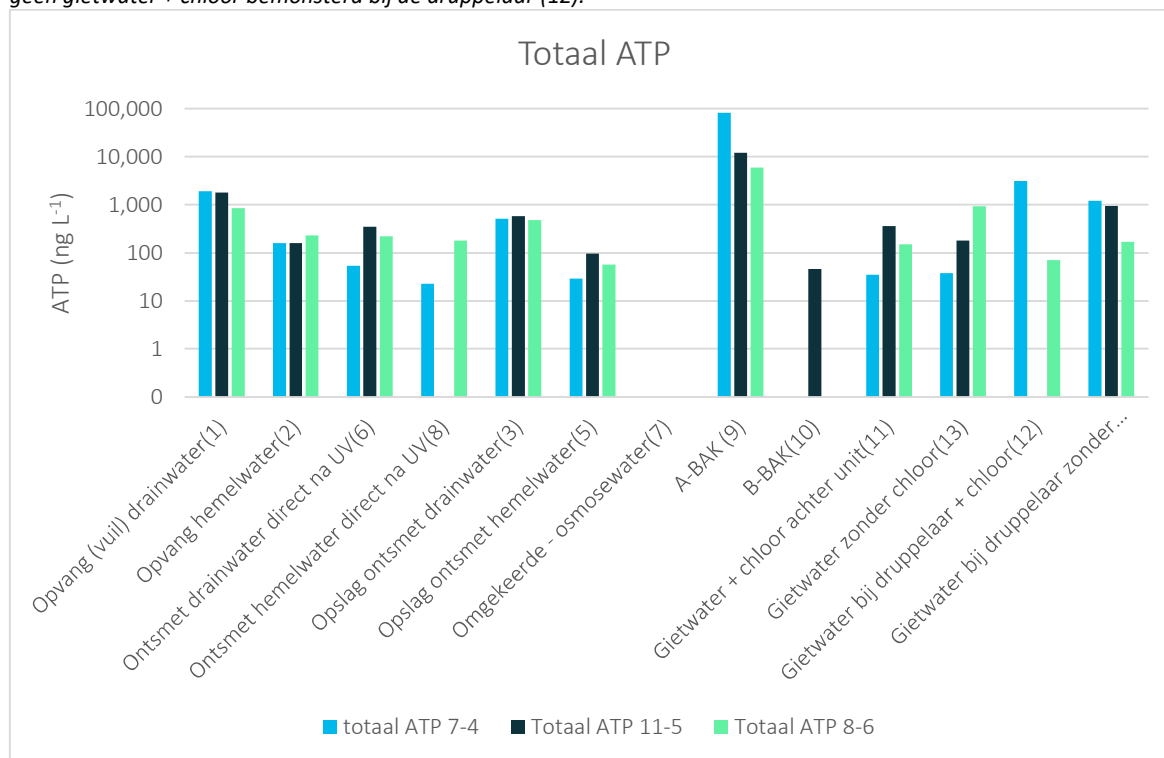


### 3.3 Adenosinetrifosfaat (ATP)

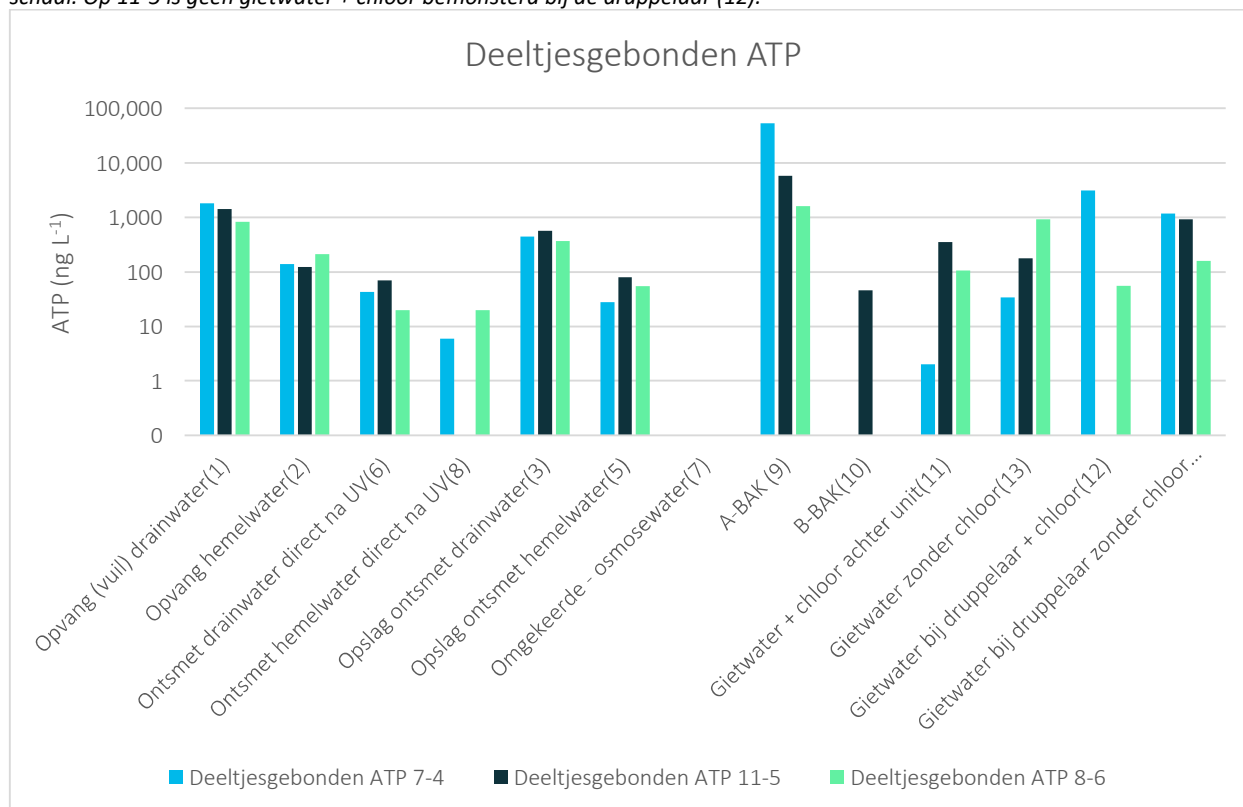
In figuur 4 staat het totaal ATP-gehalte weergegeven, en in figuur 5 de concentratie celgebonden ATP. Het gemiddelde aandeel celgebonden ATP zit voor de meeste watertypen op 80% – 100% (gemiddeld 88%), met enkele uitzonderingen: direct na UV is het gemiddelde aandeel celgebonden ATP 27% (d.w.z. door UV-bestraling stijgt het vrij ATP-gehalte naar 73%), na omgekeerde osmose is de totale ATP en celgebonden ATP concentratie niet detecteerbaar en dus onder de detectielimiet van  $1 \text{ ng L}^{-1}$ , en in het water van de A-bak is het aandeel celgebonden ATP ook lager (gemiddeld 47%).

In de opvang van drainwater is het ATP-gehalte redelijk hoog (850 – 1.900 ng totaal ATP  $\text{L}^{-1}$ , 830 – 1.800 ng celgebonden ATP  $\text{L}^{-1}$ ), en ongeveer een grootteorde lager in het opgevangen hemelwater (160 – 230 ng totaal ATP  $\text{L}^{-1}$ , 120-210 ng celgebonden ATP  $\text{L}^{-1}$ ). Direct na UV is de ATP-concentratie in beide watertypen beduidend lager met de grootste afname in het celgebonden ATP (drainwater na UV: 54 – 350 ng totaal ATP  $\text{L}^{-1}$ , 20 – 70 ng celgebonden ATP  $\text{L}^{-1}$ ); hemelwater na UV: 23 – 180 ng totaal ATP  $\text{L}^{-1}$ , 6 – 20 ng celgebonden ATP  $\text{L}^{-1}$ ). Deze resultaten laten dus zien dat met ATP-metingen, in tegenstelling tot FCM-metingen, de invloed van UV-desinfectie op bacteriën kan worden bepaald. Tijdens de opslag van het water na UV-desinfectie neemt het ATP-gehalte weer toe (opgeslagen drainwater: 480 – 580 ng totaal ATP  $\text{L}^{-1}$ , 370 – 570 ng celgebonden ATP  $\text{L}^{-1}$ ; opgeslagen hemelwater: 29 – 97 ng totaal ATP  $\text{L}^{-1}$ , 28 – 80 ng celgebonden ATP  $\text{L}^{-1}$ ). Het ATP-gehalte van het water in de A-bak is zeer hoog (5.900 – 81.000 ng totaal ATP  $\text{L}^{-1}$ ; 1.600 – 53.000 ng celgebonden ATP  $\text{L}^{-1}$ ). Vanwege de kleur van het water in de B-bak is de ATP-concentratie van het water in de B-bak niet altijd meetbaar, waardoor alleen een waarde is verkregen op 11 mei: 46 ng totaal en celgebonden ATP  $\text{L}^{-1}$ . Na chlorering zijn direct achter de unit kleine verschillen in het ATP-gehalte waargenomen: met chloor wordt hier 35 – 360 ng totaal ATP  $\text{L}^{-1}$  en 2 – 360 ng celgebonden ATP  $\text{L}^{-1}$  in het water gemeten, terwijl zonder chloor de ATP-concentraties iets hoger is: 38 – 930 ng totaal ATP  $\text{L}^{-1}$  en 34 – 930 ng celgebonden ATP  $\text{L}^{-1}$ . Bij de druppelaars wordt geen verschil in ATP-concentratie van het gietwater met en zonder chloor waargenomen. Het gietwater met chloor bevat bij de druppelaars 71 – 3.100 ng totaal ATP  $\text{L}^{-1}$  en 56 – 3.100 ng celgebonden ATP  $\text{L}^{-1}$ , terwijl in het gietwater zonder chloor 170 – 1.200 ng totaal ATP  $\text{L}^{-1}$  en 160 – 1.200 ng cel ATP  $\text{L}^{-1}$  bevat. In vergelijking met flowcytometrie lijkt een ATP-bepaling dus beter in staat om verschillen in desinfectie aan te kunnen tonen alsook de toename in biomassa na een desinfectiestap.

**Figuur 4. Totaal ATP-gehalte op verschillende monsterpunten bij Levoplant, en op verschillende monsterdata (7 april, 11 mei, 8 juni).** Vanwege grote verschillen in hoeveelheden staat het ATP-gehalte weergegeven op een logaritmische schaal. Op 11-5 is geen gietwater + chloor bemonsterd bij de druppelaar (12).



**Figuur 5. Deeltjesgebonden ATP-gehalte op verschillende monsterpunten bij Levoplant, en op verschillende monsterdata (7 april, 11 mei, 8 juni).** Vanwege grote verschillen in hoeveelheden staat het ATP-gehalte weergegeven op een logaritmische schaal. Op 11-5 is geen gietwater + chloor bemonsterd bij de druppelaar (12).

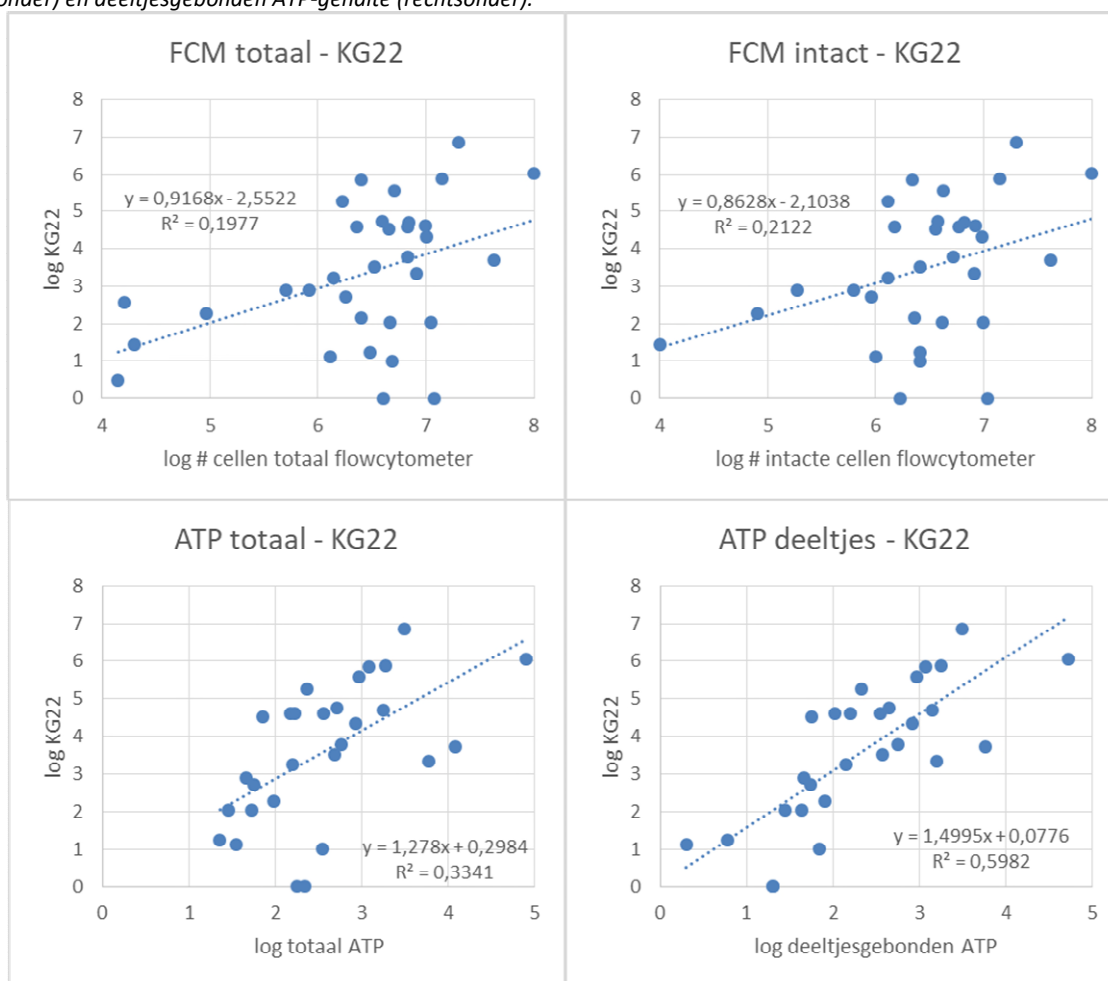


### 3.4 Correlatieanalyse

#### 3.4.1 Voorspelling van KG22

In figuur 6 staan de resultaten van de correlatieanalyses weergegeven. In de bovenste twee grafieken is te zien in hoeverre celtellingen met flowcytometrie correleren met het koloniegetal KG22. De  $R^2$  van de correlatie tussen totaal aantal cellen en KG22-getal en tussen het aantal intacte cellen en KG22 is 0,2, dat laag is. Dit betekent dat celtellingen met FCM voor deze watermonsters niet betrouwbaar gebruikt kan worden om het KG22-getal te voorspellen. In de onderste twee grafieken van figuur 6 staan de correlaties tussen totaal ATP en KG22 en celgebonden ATP en KG22 weergegeven. De waargenomen  $R^2$  tussen totale ATP-concentratie en het KG22-getal is met 0,33 ook relatief laag en de totale ATP-concentratie is daarmee ook een onbetrouwbare voorspellende parameter voor het KG22-getal. De  $R^2$  voor de correlatie tussen celgebonden ATP en KG22 is 0,6. Dat betekent dat het KG22-getal redelijk goed kan worden voorspeld met de concentratie celgebonden ATP, ondanks dat de twee parameters hele verschillende parameters zijn om de microbiële biomassa te bepalen (de ene methode telt kolonies die op een plaat kunnen groeien, de andere ATP gebonden aan bacteriecellen) en de waardes voor de twee parameters over een heel groot bereik verspreid liggen.

*Figuur 6. Lineaire regressie van het koloniegetal KG22 op verschillende voorspellers: totaal van directe celtellingen (DCT) bepaald met flowcytometrie (linksboven), aantal intacte cellen bepaald met flowcytometrie (rechtsboven), totaal ATP-gehalte (linksonder) en deeltjesgebonden ATP-gehalte (rechtsonder).*



#### 3.4.2 Voorspelling microbiologische activiteit o.b.v. sensing

Naast de microbiologische parameters zijn met sensoren ook fysisch-chemische parameters van enkele watermonsters bepaald. In figuur 6 staan de resultaten weergegeven van de correlatieanalyse van de verschillende



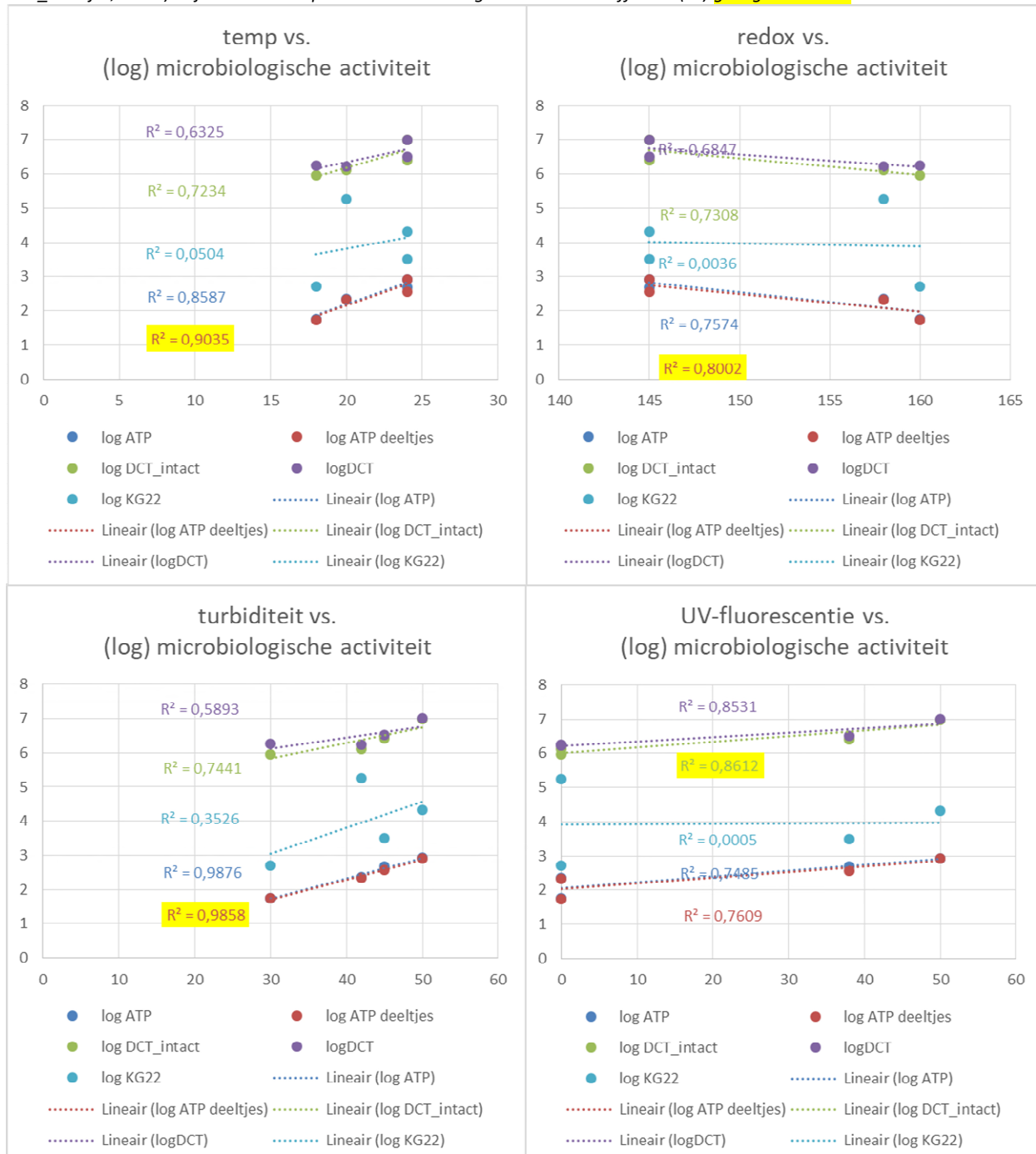
fysisch-chemische sensorparameters en de verschillende microbiologische parameters. Door het lage aantal meetpunten zijn deze correlaties echter alleen indicatief en kunnen daar geen betrouwbare conclusies aan worden verbonden. Hieronder worden deze correlaties verder toegelicht.

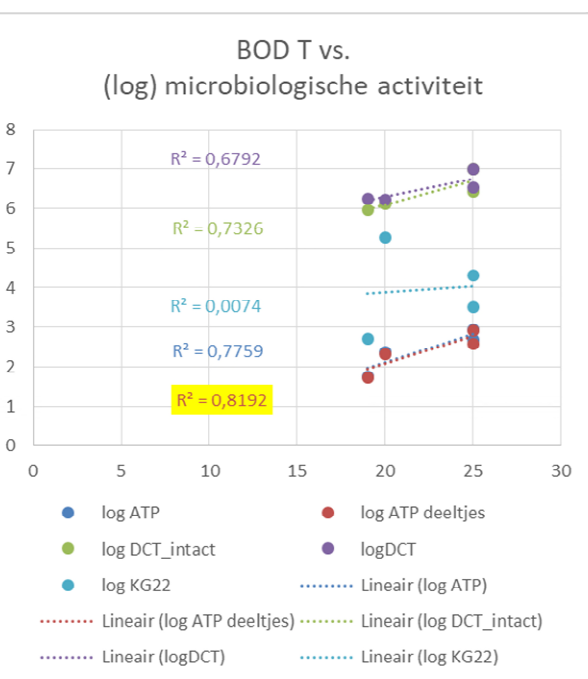
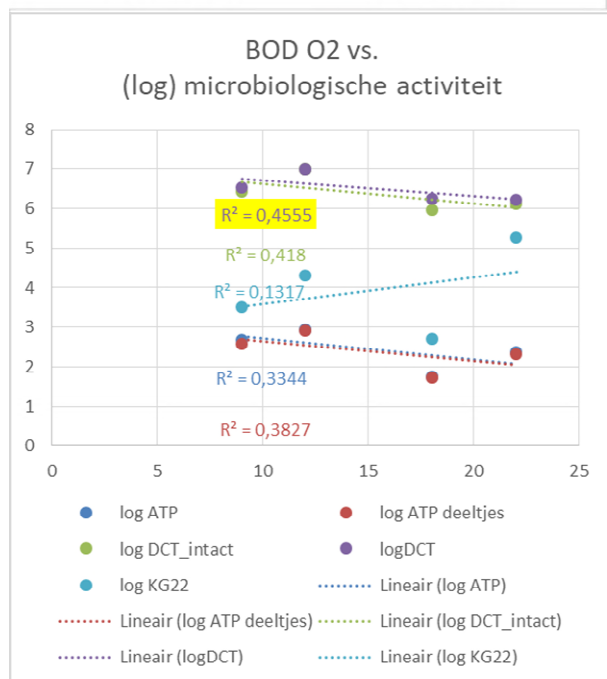
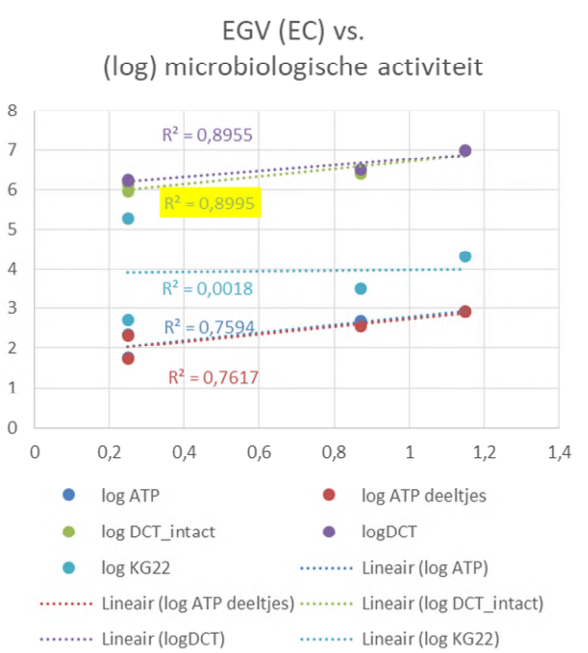
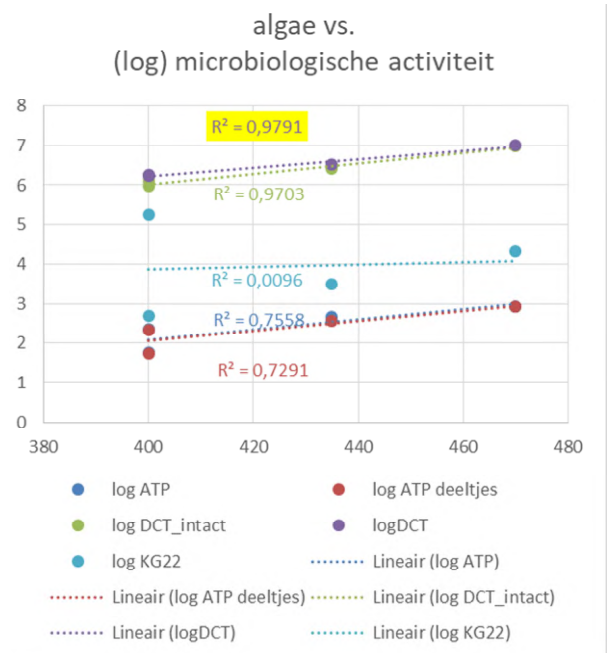
- Een positieve lineaire correlatie is waargenomen tussen *temperatuur* en iedere microbiologische parameter, wat inhoudt dat de bacterieaantallen toenemen met temperatuur. De beste correlatie wordt gevonden tussen temperatuur en celgebonden ATP-concentratie ( $R^2=0,90$ ) en de slechtste met KG22 ( $R^2=0,05$ ).
- De *redoxpotential* laat over het algemeen een negatief verband zien met de microbiologische parameters, wat aangeeft dat microbiologische activiteit afneemt met toenemende redoxpotential. Voor KG22 is geen duidelijke correlatie te zien ( $R^2=0,003$ ), en de beste correlatie is waargenomen tussen redox en celgebonden ATP ( $R^2=0,80$ ).
- Het *elektrische geleidingsvermogen* (EGV of EC) is over het algemeen positief gecorreleerd met de microbiologische parameters, wat aangeeft dat de bacterieaantallen toenemen met toenemend EC. Voor KG22 is geen duidelijke correlatie te zien ( $R^2=0,002$ ) en de beste correlatie is waargenomen tussen EC en het aantal intacte cellen ( $R^2=0,90$ ).
- De *troebelheid* correleert positief met alle microbiologische parameters, wat inhoudt dat microbiologische activiteit toeneemt met toenemende troebelheid. Een opvallend hoge lineaire correlatie wordt gevonden tussen troebelheid en de celgebonden ATP-concentratie ( $R^2=0,99$ ), terwijl de slechtste correlatie is met KG22 ( $R^2=0,35$ ).
- *UV-fluorescentie* laat een positieve lineaire correlatie zien met de meeste microbiologische parameters (behalve KG22), wat inhoudt dat de algemene microbiologische activiteit (gemeten met celtellingen en ATP) toeneemt met toenemende UV-fluorescentie. Voor KG22 is geen duidelijke correlatie te zien ( $R^2=0,001$ ), en de beste correlatie wordt gevonden tussen UV-fluorescentie en intacte cellen ( $R^2=0,86$ ).
- De *algenfluorescentie* laat ook een positieve lineaire correlatie zien met de meeste microbiologische parameters (behalve KG22), wat inhoudt dat microbiologische biomassa (gemeten met celtellingen en ATP) toeneemt met toenemende algenfluorescentie. Een opvallend hoge lineaire correlatie wordt gevonden tussen de algenfluorescentie en het totaal aantal cellen bepaald met FCM ( $R^2=0,98$ ). De slechtste correlatie is met het KG22-getal ( $R^2=0,01$ ).
- De *BOD<sub>O2</sub>* laat met de meeste microbiologische parameters (behalve KG22) een negatieve lineaire correlatie te zien, wat inhoudt dat microbiologische activiteit afneemt met toenemende BOD<sub>O2</sub>. KG22 neemt echter toe met toenemende BOD<sub>O2</sub>, hoewel de correlatie zwak is ( $R^2=0,13$ ). De hoogste correlatie wordt gevonden tussen BOD<sub>O2</sub> en het aantal intacte cellen ( $R^2=0,46$ ).
- In tegenstelling tot BOD<sub>O2</sub> is *BOD<sub>T</sub>* met de meeste parameters (behalve KG22) positief gecorreleerd, wat inhoudt dat microbiologische activiteit toeneemt met toenemende BOD<sub>T</sub>. Voor KG22 is geen duidelijke correlatie te zien ( $R^2=0,01$ ), en de beste correlatie is waargenomen tussen BOD<sub>T</sub> en de celgebonden ATP-concentratie ( $R^2=0,82$ ).

Uit deze resultaten valt op dat KG22 slecht te voorspellen is op basis van sensorparameters, terwijl de andere parameters (met name het aantal intacte cellen en de concentratie celgebonden ATP) redelijk tot goed te voorspellen lijkt met de gegevens van de sensorparameters. Zoals eerder aangegeven zijn deze analyses echter gebaseerd op vier meetpunten en wat waarschijnlijk de reden is dat bij deze analyses geen sterke correlatie tussen het KG22-getal en celgebonden ATP werd waargenomen (wat wel het geval was wanneer alle watermonsters

werden meegenomen in een correlatieanalyse, zie figuur 6). Het is daarom belangrijk om te benadrukken dat uit de correlatieanalyses tussen de fysisch-chemische en microbiologische parameters geen conclusies kunnen worden getrokken. Additionele meetcampagnes zijn nodig om de correlaties op een betrouwbare hoeveelheid meetpunten te kunnen bepalen, zodat daarmee ook betrouwbaar kan worden vastgesteld in hoeverre de fysisch-chemische gegevens uit sensors gebruikt kan worden als voorspellende parameter voor de microbiologie.

*Figuur 6. Lineaire regressie van verschillende sensorparameters (temperatuur, redox, EGV, turbiditeit, UV-fluorescentie, algenfluorescentie, BOD O2 en BOD T) op verschillende parameters voor biologische activiteit (ATP, ATP deeltjes, DCT\_intact, DCT\_deeltjes, KG22). Bij iedere sensorparameter is de hoogste correlatiecoëfficiënt (R<sup>2</sup>) geel gemarkeerd.*





## 4 Discussie en conclusies

### 4.1 Discussie: voors en tegens van de gebruikte methoden

#### 4.1.1 Koloniegetal

De resultaten laten zien dat de grootste variatie is waargenomen in koloniegetal bij 22°C (KG22): verschillen in waterkwaliteit vonden plaats over 7 logeenheden. De effecten van desinfectie op de microbiologie blijken met KG22 goed beoordeeld te kunnen worden. Het grootste nadeel van KG22 blijft de tijdsduur van drie dagen voordat resultaten bekend zijn. Een ander nadeel is dat de methode alleen micro-organismen meet die in staat zijn om onder zuurstofrijke condities op een voedingsbodem te groeien. Het is bekend dat veel bacteriën die in water aanwezig zijn niet kunnen groeien onder die condities. Tijdens deze studie is ook waargenomen dat het aantal intacte bacteriecellen in de watermonsters beduiden hoger waren dan het KG22-getal, wat laat zien dat de meeste bacteriën in de onderzochte watermonsters ook niet in staat zijn om te groeien op het vaste voedingsmedium en de incubatiecondities die worden gebruikt om het KG22-getal te bepalen. Dit nadeel hebben directe celtellingen of ATP-metingen niet. De FCM- en ATP-resultaten laten bijvoorbeeld zien dat de hoogst gemeten waardes worden aangetroffen in het water van de A-bak, terwijl dit niet zo is voor het KG22-getal. Een voordeel van het KG22-getal is dat door het handmatig tellen van kolonies soms aanvullende informatie wordt verkregen. Een voorbeeld hiervan is dat werd waargenomen dat het grootste deel van de kolonies verkregen met het water uit de B-bak uit schimmels bestond. KG22 lijkt op basis van onze correlatieanalyses redelijk goed te voorspellen met de concentratie celgebonden ATP, maar niet met de andere microbiologische parameters of de fysisch-chemische sensorparameters.

#### 4.1.2 Celtellingen met behulp van flowcytometrie

Celtellingen van bacteriën in de watermonster met flowcytometrie geven op een relatief eenvoudige en arbeidsarme manier binnen enkele minuten een beeld van de celaantallen in het desbetreffende watermonster. Dit is een hele vooruitgang ten opzichte van de arbeidsintensieve tellingen met een microscoop. Met flowcytometrie kan het totaal aantal deeltjes in het water bepaald worden, en –zoals hier is gedaan– kunnen met specifieke kleuring bacteriën worden aangetoond, en kan ook iets gezegd worden over de integriteit van het celmembraan dat een mogelijke indicator is voor levende of dode cellen. In principe is het ook mogelijk om algen met FCM te meten, en met bepaalde kleuringen en sorteermethodes zouden ook virussen en/of schimmels kunnen worden aangetoond.

De resultaten laten zien dat waar met KG22 een duidelijk effect van UV-desinfectie kon worden aangetoond, dit niet goed zichtbaar is bij de celtellingen met FCM, ongeacht of dit het totaal aantal cellen of alleen de intacte cellen betreft. Dit komt UV-desinfectie niet aangrijpt op de integriteit van de celmembraan, waardoor de door UV gedode cel nog steeds een intacte membraan heeft en als (intacte) cel door de FCM wordt geteld. Ook de toename van de bacterieaantallen tijdens opslag en transport blijkt minder duidelijk te volgen dan met KG22. FCM-tellingen hebben mede daarom ook geen goede correlatie met KG22. De  $R^2$  van die correlatie is rond de 0,2, dat inhoudt dat maar 20% van de totale variantie in KG22 verklaard kan worden uit FCM-gegevens.

Voor toepassing in de praktijk is FCM momenteel ook nog minder geschikt: de apparatuur is momenteel nog vrij prijzig (beginnend in de orde van enkele tienduizenden euro's) en vereist vrij veel specialistische kennis om de resultaten te kunnen beoordelen. Deze kosten en vereiste specialistische kennis zijn de afgelopen jaren echter wel al scherp gedaald. Op basis van de resultaten lijkt flowcytometrie op dit moment minder geschikt om de microbiologische waterkwaliteit te beoordelen in de tuinbouw.

### 4.1.3 ATP-gehalte

Met het meten van de ATP-concentratie wordt een beeld verkregen van de hoeveelheid actieve biomassa in een monster, aangezien alle levende organismen ATP in hun cellen hebben. De enige groep van organismen die niet wordt meegenomen in ATP-metingen zijn virussen, virussen zijn namelijk deeltjes die alleen bestaan uit erfelijk materiaal (RNA of DNA) en een eiwit. Omdat virussen zelf geen stofwisseling hebben (ze gebruiken de stofwisseling van hun gastheer om hun genetisch materiaal te vermenigvuldigen), dragen zij ook geen energiedrager als ATP bij zich.

ATP-metingen zijn een goede methode om de microbiologische activiteit in water uit de tuinbouwpraktijk te bepalen. Het ATP-gehalte (vooral het celgebonden ATP) laat, net als KG22, duidelijk het resultaat van desinfectie zien, inclusief UV-desinfectie. Het laat ook goed zien wanneer weer een toename van micro-organismen heeft plaatsgevonden. Het celgebonden ATP blijkt een redelijke goede correlatie te hebben met het KG22-getal in tuinbouwwater en dit celgebonden ATP verklaart 60% van de variantie in KG22. Daarmee kan het celgebonden ATP worden gebruikt om het KG22 relatief betrouwbaar te voorspellen in de watermonsters die zijn onderzocht. Tevens is gevonden dat het celgebonden ATP-gehalte redelijk goed correleert met fysisch-chemische sensorparameters, maar die relaties moeten betrouwbaarder worden vastgesteld, voordat geconcludeerd kan worden of de celgebonden ATP-concentratie betrouwbaar kan worden voorspeld uit deze sensordata.

De ATP-gehalten in dit onderzoek zijn bepaald met een luminometer in het laboratorium van KWR, maar er bestaan ook ATP-methodeken die op locatie, zoals in de kas, kunnen worden toegepast. Dergelijke systemen zijn redelijk betaalbaar (in de orde van duizend tot tweeduizend euro) en van sommige is vastgesteld dat ze een vergelijkbare betrouwbaarheid hebben met de laboratoriummethode en dat ze ook onderscheid kunnen maken tussen het celgebonden en totaal ATP. Omdat het ATP-gehalte zelf gemeten kan worden in een relatief korte tijd (10 minuten) lijkt dit dus een geschikte alternatieve methode voor het bepalen van de microbiologische waterkwaliteit in de tuinbouw, inclusief het effect van desinfectie. Het is echter wel aanbevelingswaardig om de ATP-methode met de KG22-methode te vergelijken voor watermonsters die bij een groot aantal verschillende tuinbouwbedrijven zijn genomen, zodat ook duidelijk wordt of de gevonden resultaten geëxtrapoleerd kunnen worden naar alle tuinbouwbedrijven.

## 4.2 Conclusies en aanbevelingen

Van de onderzochte methodes blijken KG22 en celgebonden ATP waardevol als methoden om de microbiologische waterkwaliteit in tuinbouwsystemen te bepalen en om het effect van verschillende desinfectiemethoden op de microbiologische waterkwaliteit te kwantificeren. Doordat de celgebonden ATP-concentratie relatief snel op locatie kan worden bepaald, lijken dergelijke metingen een goed alternatief voor het bepalen van KG22, aangezien dat een methode is die relatief lang duurt en in een laboratorium moet worden ingezet.

De toepasbaarheid van het bepalen van het aantal (intacte) bacteriecellen met FCM lijkt voor toepassing in de tuinbouw beperkt. Die methode is in ieder geval niet in staat om het effect van UV-desinfectie op de microbiologische waterkwaliteit te kwantificeren.

Gezien de positieve resultaten die in de hier beschreven studie werden verkregen met het meten van celgebonden ATP in verschillende watermonsters uit een tuinbouwlocatie, is het aanbevelen om deze methode te vergelijken met de KG22-methode op watermonsters die zijn genomen op een groot aantal verschillende tuinbouwlocaties, zodat duidelijk wordt of de hier verkregen resultaten kunnen worden geëxtrapoleerd naar andere tuinbouwbedrijven.