



Opportunistisch ziekte- verwekkende micro-organismen in drinkwater

BTO 2011.035
Juni 2011

KWR

Watercycle Research Institute



Opportunistisch ziekte- verwekkende micro-organismen in drinkwater

BTO 2011.035
Juni 2011

© 2010 KWR

Alle rechten voorbehouden.

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

Colofon

Titel

Opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater.

Opdrachtnummer

B111673

Onderzoeksprogramma

Microbiologie

Projectmanager

Niels Dammers

Opdrachtgever

BTO

Kwaliteitsborger

Dick van der Kooij

Auteurs

Paul van der Wielen & Dick van der Kooij

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar

Voorwoord

In het kader van het BTO-project 'Invloed van opwarming door klimaatverandering op nagroei in het distributiesysteem' zijn drinkwatermonsters genomen op verschillende adressen in het distributiesysteem van Leeuwarden, Almere, Breda, ps Scheveningen, ps Kralingen, ps Berenplaat, ps Weesperkarspel en ps Andijk. We zijn dank verschuldigd aan Geo Bakker (Vitens), Agata Donocik (Brabant Water), Ed van der Mark (DZH), Trudy Suylen (Evides), Marco Dignum (Waternet), Bram Martijn (PWN), de monsternemers van de drinkwaterbedrijven en/of waterlaboratoria en de coördinatoren van de waterlaboratoria bij het project. Zonder hun hulp was het niet mogelijk geweest om de uitgebreide meetcampagnes in de distributiesystemen uit te voeren.

Samenvatting

Door de verwachte klimaatverandering is het waarschijnlijk dat in de toekomst, door opwarming van de aarde, de temperatuur van het oppervlaktewater, distributiesysteem en leidingwaterinstallaties zal stijgen. Opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen, die in staat zijn in drinkwater te groeien, zijn vaak geadapteerd aan hogere temperaturen. Bij toenemende temperaturen zullen deze organismen daardoor mogelijk vaker deel uit maken van de microbiële populaties in drinkwatergerelateerde milieus. In een eerdere literatuurstudie binnen het BTO-project 'Invloed van opwarming door klimaatverandering op nagroei in het distributiesysteem', is uitgezocht welke opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in Nederland een mogelijk gezondheidsrisico vormen. Op basis van de resultaten uit de literatuurstudie zijn in een vervolgstudie kwantitatieve PCR-methoden ontwikkeld voor de specifieke detectie van schimmels, *Aspergillus fumigatus*, mycobacteriën, *Mycobacterium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* en *Acanthamoeba* spp. Het doel van de in dit rapport beschreven studie is te achterhalen of deze opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen voorkomen in het gedistribueerde drinkwater en of het seizoen (winter versus zomer) een invloed heeft op de aantallen.

In 2010 werd in de winter en zomer het drinkwater bemonsterd op ongeveer tien locaties in het distributiesysteem van Leeuwarden, Breda, Almere, ps Scheveningen, ps Kralingen, ps Berenplaat, ps Weesperkarspel en ps Andijk drinkwatermonsters genomen. In de zomer werd ook het reinwater van de desbetreffende pompstations bemonsterd. De meeste drinkwatermonsters waren afkomstig van het distributiesysteem; de drinkwatermonsters van ps Kralingen en ps Berenplaat waren in de zomer afkomstig uit de binneninstallatie van gebouwen. Drinkwatermonsters werden geanalyseerd op temperatuur, het koloniegetal bij 22°C en 37°C, kolonievormende eenheden van *Legionella*, *P. aeruginosa* en *Aeromonas* bij 30°C en 37°C, ATP, cel aantallen en het aantal genkopieën van schimmels, *A. fumigatus*, mycobacteriën, *M. avium*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *Acanthamoeba* spp. en *Legionella pneumophila*.

In alle geanalyseerde drinkwatermonsters werden schimmels en mycobacteriën aangetroffen. Het aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels lag tussen de $1,1 \times 10^4$ en $8,7 \times 10^6$ per liter, terwijl het aantal *Hsp65* genkopieën van mycobacteriën tussen de $3,0 \times 10^3$ en $5,1 \times 10^5$ per liter lag. Over het algemeen was het aantal schimmels 5 tot 25 keer hoger in het distributiesysteem dan in het reinwater; het aantal mycobacteriën was 1,5 tot 9 keer hoger in het distributiesysteem dan in het reinwater. Deze resultaten laten zien dat schimmels en mycobacteriën algemeen voorkomen in drinkwater en in staat zijn zich te vermeerderen in het distributiesysteem. Het is onduidelijk of ook ziekteverwekkende soorten van schimmels en mycobacteriën aanwezig zijn. Aanvullend onderzoek naar de soortensamenstelling van schimmels en mycobacteriën in drinkwater is daarom wenselijk.

Het *regA* gen van *P. aeruginosa* werd sporadisch aangetroffen in het distributiesysteem van Leeuwarden, Breda, ps Scheveningen, ps Kralingen en ps Berenplaat variërend van 290 tot 3300 genkopieën per liter. In de meeste drinkwatermonsters was het aantal *regA* genkopieën echter lager dan de detectielimiet (200 kopieën l⁻¹). Ook het aantal *chitA* genkopieën van *S. maltophilia* lag in de meeste drinkwatermonsters onder de detectielimiet (412 kopieën l⁻¹). In het distributiesysteem van Leeuwarden, ps Scheveningen, ps Kralingen, ps Berenplaat en ps Weesperkarspel werd *S. maltophilia* sporadisch aangetroffen met aantallen die varieerden tussen de $2,2 \times 10^3$ en $1,1 \times 10^4$ genkopieën per liter. In het distributiesysteem van ps Weesperkarspel was het aantal 28S rRNA genkopieën van *A. fumigatus* in drie van de dertien

monsters hoger dan de detectielimiet van 200 kopieën l⁻¹. De aantallen varieerden hierbij tussen de 660 tot 830 kopieën l⁻¹. Het 16S rRNA gen van *M. avium* en het 18S rRNA gen van *Acanthamoeba* spp. werden in geen enkel drinkwatermonster aangetroffen. Op basis van deze resultaten wordt geconcludeerd dat *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* en *A. fumigatus* aanwezig zijn in het drinkwater van bepaalde Nederlandse pompstations. Deze organismen werden niet aangetroffen in het reinwater, waardoor het waarschijnlijk is dat ze in staat zijn zich te vermeerderen in het distributiesysteem.

In de zomer van 2010 was de drinkwatertemperatuur gemiddeld 8,7 tot 14,8°C hoger dan in de winter. Ondanks dit temperatuurverschil werden in de zomer geen significant hogere aantallen schimmels, mycobacteriën en *P. aeruginosa* waargenomen in het distributiesysteem van Leeuwarden, Breda, Almere, ps Scheveningen, ps Weesperkarspel en ps Andijk. Omdat de zomer van 2010 niet uitzonderlijk warm was, blijft onduidelijk wat het effect van hogere drinkwatertemperaturen (> 22°C) is op het voorkomen van deze opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen. Omdat de zomermaanden vooraf niet zijn te voorspellen, kan het effect van temperaturen boven de 22°C beter worden bestudeerd door experimenten met opportunistische ziekteverwekkende organismen uit te voeren onder gecontroleerde temperatuurcondities in het laboratorium. *A. fumigatus* en *S. maltophilia* werden alleen in de zomer in het drinkwater aangetroffen, dat mogelijk duidt op een effect van de temperatuur op het voorkomen van deze twee organismen. In het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat werden in de zomer wel significant hogere aantallen mycobacteriën, schimmels en *S. maltophilia* gevonden dan in de winter, maar deze hogere aantallen in de zomer zijn veroorzaakt door verschil in bemonstering. In de winter kwamen de drinkwatermonsters uit het distributiesysteem, maar in de zomer uit de binneninstallatie. Daarom wordt geconcludeerd dat schimmels, mycobacteriën en *S. maltophilia* in staat zijn zich te vermeerderen in de binneninstallatie van gebouwen.

In het distributiesysteem van ps Andijk werden significant hogere aantallen schimmels en mycobacteriën waargenomen dan in het distributiesysteem van Almere of ps Scheveningen. De hogere aantallen bij ps Andijk kunnen worden verklaard door de hogere concentratie afbreekbare stoffen en biomassa in het gedistribueerde drinkwater van ps Andijk vergeleken met Almere en ps Scheveningen. Er werden geen duidelijke significante verschillen waargenomen in aantallen schimmels, mycobacteriën, *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* tussen de andere distributiesystemen. Blijkbaar heeft de grondstof (grondwater versus oppervlaktewater) en de mate van nagroei in het gedistribueerde drinkwater geen eenduidig effect op de vermeerdering cq voorkomen van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater. De resultaten laten ook zien dat er geen sterke verbanden zijn tussen microbiologische parameters (ATP, celaantal, KG22, KG37, *Aeromonas*) en het aantal genkopieën van de opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen.

Op grond van de resultaten wordt geconcludeerd dat schimmels en mycobacteriën algemeen voorkomen in het Nederlandse drinkwater en in staat zijn zich te vermeerderen in distributiesystemen en binneninstallaties. Drinkwatertemperaturen tussen de 5 en 22°C hebben geen invloed op de aantallen schimmels en mycobacteriën in gedistribueerd drinkwater. *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* en *A. fumigatus* komen sporadisch voor in drinkwater en lijken in staat zich te vermeerderen in distributiesystemen en/of binneninstallaties. Drinkwatertemperaturen rond de 20°C resulteerden in hogere aantallen *S. maltophilia* en *A. fumigatus* dan drinkwatertemperaturen rond de 7°C. Onduidelijk blijft vooralsnog of de stammen van schimmels, mycobacteriën, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* en *A. fumigatus* in drinkwater ook daadwerkelijk ziekteverwekkend zijn voor de mens.

Inhoud

Voorwoord	1
Samenvatting	3
Inhoud	5
1 Inleiding	7
1.1 Klimaat en Gezondheid	7
1.2 Opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen die zich in drinkwater vermeerderen	8
1.3 Mensen met verzwakt immuunsysteem	9
1.4 Doel van onderzoek	9
2 Materiaal en Methoden	11
2.1 Monsterlocaties en bemonstering	11
2.2 Parameters	12
2.3 Statistische analyses	12
3 Resultaten	15
3.1 Algemeen	15
3.1.1 Temperatuurverloop in de Bilt	15
3.1.2 Hotspotlocaties in het distributiesysteem	16
3.2 Opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater	16
3.2.1 Schimmels en <i>Aspergillus fumigatus</i>	16
3.2.2 <i>Mycobacterium</i> spp. en <i>Mycobacterium avium</i>	18
3.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
3.2.4 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	19
3.2.5 <i>Acanthamoeba</i> spp.	20
3.3 Effect van winter versus zomer	20
3.3.1 Temperatuur	20
3.3.2 ATP	20
3.3.3 Celaantallen	21
3.3.4 KG22, KG37, <i>Aeromonas</i> 30 en <i>Aeromonas</i> 37	22
3.3.5 Schimmels en <i>A. fumigatus</i>	24
3.3.6 <i>Mycobacterium</i>	25
3.3.7 <i>P. aeruginosa</i>	26
3.3.8 <i>S. maltophilia</i>	27
3.3.9 <i>L. pneumophila</i>	27
3.4 Verschillen tussen distributiesystemen	28
3.4.1 ATP en celaantallen	29
3.4.2 Schimmels	30
3.4.3 <i>Mycobacterium</i> spp.	30
3.4.4 <i>P. aeruginosa</i> en <i>S. maltophilia</i>	30
3.4.5 Gekweekte <i>Legionella</i> en <i>L. pneumophila</i>	31

3.5	Correlaties tussen opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen en algemeen microbiologische parameters	32
4	Discussie	35
4.1	Opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater	35
4.1.1	Schimmels	35
4.1.2	Mycobacteriën	37
4.1.3	Pseudomonas aeruginosa	38
4.1.4	Stenotrophomonas maltophilia	39
4.1.5	Legionella en Legionella pneumophila	40
4.2	Effect van temperatuur	40
4.3	Effect van watersamenstelling	44
4.4	Relatie tussen microbiologische parameters	46
5	Conclusies	49
5.1	Temperatuur	49
5.2	Opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen	49
5.2.1	Schimmels en Aspergillus fumigatus	49
5.2.2	Mycobacteriën en Mycobacterium avium	49
5.2.3	Pseudomonas aeruginosa	50
5.2.4	Stenotrophomonas maltophilia	50
5.2.5	Acanthamoeba spp.	51
5.2.6	Legionella pneumophila	51
5.3	Overig	51
6	Aanbevelingen	53
6.1	Groei van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater	53
6.2	Populatiesamenstelling opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen	53
6.3	Methodeontwikkeling	53
7	Literatuur	55
Bijlage I	Monsterlocaties distributiesystemen	61
Bijlage II	Resultaten KG22, KG37, Aeromonas30 en Aeromonas37	63

1 Inleiding

1.1 Klimaat en Gezondheid

Het klimaat op aarde is de afgelopen duizend jaar relatief stabiel gebleven en heeft een sterk gematigde tendens. Recent verschijnen er echter steeds meer studies die aantonen dat de afgelopen decennia het klimaat aan het veranderen is, met een tendens naar globale opwarming (Solomon et al., 2007). Het Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) heeft in 2007 gerapporteerd dat de temperatuur in de afgelopen 100 jaar 0,6 tot 0,9°C is gestegen. In het rapport van de IPCC staat ook geschreven dat klimaatmodellen in het jaar 2100 een gemiddelde temperatuur op aarde voorspellen die 1,1 tot 6,4°C hoger is dan de huidige gemiddelde temperatuur (Solomon et al., 2007).

De huidige en verwachte toekomstige klimaatverandering zullen waarschijnlijk op verschillende manieren de volksgezondheid beïnvloeden (Haines et al., 2000; Frumkin et al., 2008):

- Een directe toename van het aantal doden en gewonden door een toename van het aantal overstromingen, hittegolven en perioden van droogte;
- Een toename van vectorgerelateerde ziektes zoals de ziekte van Lyme, denguekoorts en malaria door hogere temperaturen en veranderende regenvalpatronen;
- Een toename van luchtweg- en cardiovasculaire aandoeningen door een toename van luchtverontreiniging;
- Een toename van allergieën vanwege hogere productie van allergenen door verhoogde temperatuur;
- Een toename van door water en voedsel overdraagbare infectieziekten door toename van intensieve regenval en hogere watertemperatuur.

De klimaatsverandering in de afgelopen jaren heeft waarschijnlijk al geleid tot beïnvloeding van de volksgezondheid. Zo heeft de WHO berekend dat tot en met het jaar 2000 de klimaatsverandering wereldwijd heeft geleid tot 150.000 extra doden per jaar (Patz et al., 2005; Kovats et al., 2005).

Een ander aspect van klimaatverandering is dat door opwarming de temperatuur van het drinkwater in het distributienet kan toenemen (Levin et al., 2002). Een hogere drinkwatertemperatuur leidt mogelijk tot een verschuiving in de populatiesamenstelling van micro-organismen, waardoor micro-organismen met een hogere optimale groeitemperatuur vermoedelijk vaker voorkomen. Micro-organismen met ziekteverwekkende eigenschappen (opportunistische ziekteverwekkers) die in drinkwater kunnen groeien, hebben over het algemeen als kenmerk dat ze bij hogere watertemperaturen beter in staat zijn zich te vermeerderen. *Legionella pneumophila* is een bekend voorbeeld van een dergelijk micro-organisme (Fisman et al., 2005; van der Kooij et al., 2009; 2010). Naast *L. pneumophila* kunnen echter ook andere opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen voorkomen in het drinkwater. Behalve voor *L. pneumophila* is kennis over aanwezigheid van opportunistische ziekteverwekkers in het Nederlandse drinkwater echter schaars.

Op basis van klimaatvoorspellingen van het KNMI is de verwachting dat ook in Nederland de gemiddelde temperatuur in de toekomst zal toenemen. Hierdoor zal ook in Nederland de drinkwatertemperatuur in het distributiesysteem en in de binneninstallatie stijgen. De verwachting is dat deze temperatuurstijging op bepaalde plekken in het distributiesysteem

hoger zal zijn dan de opwarming van de omgeving. Vooral binnen 'heat islands' (bepaalde delen in de stad) of onder donkere oppervlakten (bijvoorbeeld asfalt) is de verwachting dat temperaturen hoger zijn dan in de omgeving. Het is dus niet uit te sluiten dat een temperatuurstoename in het distributiesysteem (lokaal) of binneninstallatie kan leiden tot hogere aantallen opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater(biofilms).

1.2 Opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen die zich in drinkwater vermeerderen

In 2008 is een literatuurstudie uitgevoerd naar opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen die zich in drinkwater kunnen vermeerderen (van der Wielen & van der Kooij, 2009a). In deze literatuurstudie werd van 17 micro-organismen (Tabel 1.1) beschreven (i) welke ziekte het organisme veroorzaakt; (ii) hoeveel ziektegevallen het organisme veroorzaakt in Nederland en eventuele andere landen; (iii) welke epidemiologische link er bestaat tussen (drink)water- en patiëntisolaten; (iv) of het organisme voorkomt in het Nederlandse drinkwater en eventueel in het drinkwater van andere landen; (v) of het organisme in staat is om zich te vermeerderen in drinkwater, distributiesysteem en/of leidingwaterinstallatie en (vi) wat het effect van een hogere temperatuur is op de groei van het organisme. Uiteindelijk is op basis van deze gegevens per organisme een prioritering aangegeven voor aanvullend onderzoek naar het voorkomen in het Nederlandse drinkwater (Tabel 1.1).

Tabel 1.1 Prioritering micro-organismen voor onderzoek naar het voorkomen in Nederlands drinkwater in relatie tot opwarming van het leidingnet (uit: van der Wielen & van der Kooij, 2009a).

Micro-organisme	Prioriteit
<i>Legionella pneumophila</i>	Zeer hoog
Non-tuberculeuze <i>Mycobacterium</i> spp.	Hoog
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hoog
Ziekteverwekkende fungi	Hoog
<i>Burkholderia cepacia</i> complex	'Midden'
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	'Midden'
<i>Acanthamoeba</i> spp.	'Midden'
<i>Acinetobacter baumannii</i> - <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> complex	Laag
<i>Aeromonas</i>	Laag
<i>Afipia</i>	Laag
<i>Bosea</i>	Laag
<i>Chlamydia</i> -achtige bacteriën zoals <i>Simkania negevensis</i>	Laag
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	Laag
<i>Helicobacter pylori</i>	Laag
<i>Methylobacterium</i>	Laag
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Laag

Op basis van de gegevens uit de literatuur werd geconcludeerd dat *L. pneumophila* de hoogste prioriteit voor aanvullend onderzoek heeft (Tabel 1.1). Deze prioriteit werd ingegeven doordat het aantal ziektegevallen in Nederland relatief hoog is, het organisme in drinkwatergerelateerde biofilms kan groeien en een hogere temperatuur een zodanige verschuiving in de legionellapopulatie kan veroorzaken dat *L. pneumophila* vaker wordt aangetroffen. De Nederlandse drinkwaterbedrijven, VROM en KWR hebben het belang van onderzoek naar groei van *L. pneumophila* in drinkwatergerelateerde biofilms eerder onderkend, waardoor de laatste tien jaar in BTO-verband en voor VROM diverse projecten zijn uitgevoerd op het terrein van *Legionella* en *L. pneumophila*. Daarom is binnen het BTO-project 'Invloed van opwarming door klimaatverandering op nagroei in het distributiesysteem' geen uitgebreid onderzoek uitgevoerd naar *L. pneumophila*.

Na *L. pneumophila* hebben non-tuberculeuze mycobacteriën (NTM), *Pseudomonas aeruginosa* en ziekteverwekkende schimmels een hoge prioriteit voor aanvullend onderzoek gekregen (Tabel 1.1). Deze hoge prioriteit wordt veroorzaakt doordat *P. aeruginosa* en enkele NTM- en schimmelsoorten in Nederland infecties veroorzaken en kunnen groeien in (drink)watergerelateerde milieus. Daarnaast is bewezen dat ziekteverwekkende stammen van *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii* en *Aspergillus* spp. via drinkwater kunnen worden verspreid. Het staat niet vast dat ziekteverwekkende stammen van *P. aeruginosa* via drinkwater worden verspreid, maar het kan op basis van de literatuur ook niet worden uitgesloten (van der Wielen & van der Kooij, 2009a).

Stenotrophomonas maltophilia, *Acanthamoeba* spp. en bacteriën die behoren tot het *Burkholderia cepacia* complex (BCC) hebben een prioriteit voor aanvullend onderzoek gekregen die tussen hoog en laag is (Tabel 1.1). Uit de literatuur is duidelijk geworden dat ziekteverwekkende stammen van deze organismen via drinkwater worden verspreid en dat ze zich in drinkwater kunnen vermeerderen. Omdat het aantal ziektegevallen met deze organismen in Nederland echter laag is, is de prioriteit voor aanvullend onderzoek lager dan voor de organismen die hierboven zijn benoemd (van der Wielen & van der Kooij, 2009a). De overige micro-organismen met ziekteverwekkende eigenschappen die zijn genoemd in Tabel 1.1 hebben een lage prioriteit voor aanvullend onderzoek en worden daarom niet verder onderzocht (van der Wielen & van der Kooij, 2009a).

In 2009 werd onderzocht of specifieke detectiemethoden met behulp van qPCR zijn te ontwikkelen voor de organismen die een hoge en 'midden' prioriteit hebben gekregen (Tabel 1.1). Uiteindelijk resulteerde het onderzoek in qPCR-methoden voor de kwantitatieve detectie van schimmels, *Aspergillus fumigatus*, mycobacteriën, *M. avium*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* en *Acanthamoeba* spp. (van der Wielen et al. 2011b).

1.3 Mensen met verzwakt immuunsysteem

Een kenmerk van de opportunistisch ziekteverwekkende organismen van Tabel 1.1 is dat ze voornamelijk ziekte veroorzaken bij mensen met een verzwakt immuunsysteem. Naast de trend dat opwarming door klimaatverandering waarschijnlijk resulteert in een toenemende drinkwatertemperatuur, is er ook een trend dat er in de aankomende decennia meer mensen met een verzwakt immuunsysteem zullen zijn (Szewzyk et al., 2000; Theron & Cloete, 2002; Glasmacher et al., 2003). Deze toename komt omdat (i) mensen met een levensbedreigende ziekte (bv kanker, cystic fibrosis) langer in leven blijven, (ii) steeds meer mensen geneesmiddelen krijgen die de activiteit van het immuunsysteem verlagen (bv bij orgaantransplantatie en reuma- of kankertherapie) en (iii) het aantal ouderen toeneemt. Door de toename van het aantal mensen met een verzwakt immuunsysteem, zullen infecties met opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in de aankomende jaren waarschijnlijk ook toenemen (Glasmacher et al., 2003). Deze trend onderschrijft nogmaals het belang om aanvullend onderzoek uit te voeren naar de aanwezigheid van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater.

1.4 Doel van onderzoek

Om de aanwezigheid van verschillende opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in het gedistribueerde drinkwater van enkele Nederlandse pompstations te bepalen, zijn in de winter en zomer van 2010 verschillende distributiesystemen bemonsterd en de drinkwatermonsters zijn geanalyseerd op het voorkomen van verschillende opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen.

Het doel van deze bemonstering en analyse is:

1. Het kwantificeren van mycobacteriën, *M. avium*, schimmels, *A. fumigatus*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* en *Acanthamoeba* in gedistribueerd drinkwater van verschillende pompstations;
2. Bepalen of de drinkwatertemperatuur invloed heeft op het voorkomen van deze opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in het distributiesysteem;
3. Bepalen/nagaan of aard van de grondstof (oppervlaktewater, grondwater) en de watersamenstelling (TOC, ATP, cellen, *Aeromonas* en eventueel BVS) een relatie hebben met het aantal opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in het gedistribueerde drinkwater.

2 Materiaal en Methoden

2.1 Monsterlocaties en bemonstering

Drinkwatermonsters werden in de winter (januari t/m maart) en zomer (augustus, september) van 2010 genomen aan de tap op een aantal geselecteerde locaties in acht verschillende distributiesystemen (Tabel 2.1). Deze acht distributiesystemen werden gekozen op basis van grondstof (grondwater of oppervlaktewater) en mate van nagroei in het distributiesysteem (relatief hoog vs relatief laag). Drie distributiesystemen werden gevoed met drinkwater bereid van grondwater en vijf distributiesystemen met drinkwater bereid van oppervlaktewater. De locaties in een distributiesysteem werden geselecteerd op basis van de temperatuurgegevens uit 2003, 2004, 2005, 2006, 2007 en/of 2008. Hierbij werden 'hotspot' locaties geselecteerd waar de drinkwatertemperatuur één keer of vaker boven de 23°C (oppervlaktewaterlocaties) of boven de 20°C (grondwaterlocaties) was. De hotspotlocaties in het distributienet dat wordt gevoed met drinkwater bereid uit grondwater waren over het algemeen locaties in een buurt die werden verwarmd met stadsverwarming. Daarnaast werden referentielocaties geselecteerd waar de drinkwatertemperatuur lager dan 23 of 20°C was. De adressen van de geselecteerde monsterlocaties zijn weergegeven in Bijlage I. In de zomer van 2010 werd in de meeste gevallen ook een monster genomen van het uitgaande reinwater van het betreffende pompstation.

Tabel 2.1 De acht distributiesystemen die in de winter en zomer werden bemonsterd op een aantal geselecteerde locaties in het leidingnet.

Distributiesysteem	Grondstof	Nagroei ^a	Aantal locaties distributiesysteem	
			Referentie	Hot spot
Leeuwarden ^b	Grondwater	Relatief hoog		10
Breda ^c	Grondwater	Relatief laag	5	5
Almere ^d	Grondwater	Relatief laag	6	6
Ps Scheveningen	Oppervlaktewater	Relatief laag	5	6
Ps Kralingen	Oppervlaktewater	Relatief hoog	5	6
Ps Berenplaat	Oppervlaktewater	Relatief hoog	5	8
Ps Weesperkarspel	Oppervlaktewater	Relatief hoog	5	8
Ps Andijk	Oppervlaktewater	Relatief hoog	6	7

^a De mate van nagroei is bepaald door de score in rapportage van der Wielen & van der Kooij (2011a) en de BVS-waarde, AOC-concentratie en ATP-gehalte van het reinwater te nemen

^b Het gedistribueerde drinkwater was afkomstig van ps Spannenburg

^c Het gedistribueerde drinkwater was afkomstig van ps Oosterhout en ps Dorst

^d Het gedistribueerde drinkwater was afkomstig van ps Fledite

Normaal werden monsters aan de tap genomen na doorstroming totdat de temperatuur van het drinkwater constant was. Hierbij wordt aangenomen dat het watermonster afkomstig is uit de leiding van het distributiesysteem. In het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat werden in de zomer echter drinkwatermonsters genomen aan de tap nadat het eerste water (één liter) uit de tap was gestroomd; deze drinkwatermonsters waren waarschijnlijk gedeeltelijk afkomstig van de binneninstallatie.

Er werd ongeveer drie liter water bemonsterd. Een deel van het watermonster (2 liter) werd gefiltreerd over een filter van 0,22 µm, waarna de filters met DNA van een interne controle werden opgeslagen bij -20°C. Later werd DNA uit deze filters geïsoleerd (FastDNA Spin kit for

soil; Qbiogene) en werden verschillende qPCR methoden op het DNA toegepast, waarbij ook het rendement van DNA-extractie en PCR werd bepaald. Dit rendement lag over het algemeen rond de 20%. Het andere deel van het watermonster (~ 1 liter) werd gebruikt voor het meten van de drinkwatertemperatuur of voor het inzetten van directe microbiologische analysemethoden.

2.2 Parameters

De drinkwatertemperatuur werd direct gemeten aan het drinkwatermonster dat uit de tap was genomen. Nadat de drinkwatermonsters op het laboratorium arriveerden werden de volgende microbiologische parameters bepaald: het koloniegetal bij 22°C (KG22) en 37°C (KG37), het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas* bij 30°C (*Aeromonas*30) en bij 37°C (*Aeromonas*37), het aantal kolonievormende eenheden van *Legionella* spp. (behalve in het distributiesysteem van Breda), het aantal kolonievormende eenheden van *P. aeruginosa* (alleen bepaald in de zomer), adenosinetrifosfaat (ATP) en het totaal aantal cellen, waarbij ook het aantal cellen met een intact membraan (levend) en beschadigd membraan (dood) werd bepaald. Wanneer de kweek voor *Legionella* spp. positief was, werd gekarakteriseerd of de gekweekte stam(men) tot *L. pneumophila* behoorde(n). Uit de gegevens werd tevens de ratio KG37/KG22 en *Aeromonas*37/*Aeromonas*30 berekend.

Het aantal genkopieën van schimmels, *A. fumigatus*, *Mycobacterium* spp., *M. avium*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* en *Acanthamoeba* werd bepaald van het geïsoleerde DNA met behulp van nieuw ontwikkelde qPCR-methoden (van der Wielen et al., 2011b). Daarnaast werd met qPCR-methoden ook het aantal genkopieën van *L. pneumophila* bepaald (Wullings et al., 2007). Voor de meeste micro-organismen is het aantal genkopieën per cel bekend (Tabel 2.2) en die gegevens zijn gebruikt om het aantal cellen te berekenen.

Tabel 2.2. Het aantal genkopieën per cel van de geamplificeerde genen van de diverse opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen

Micro-organisme	Gen	Kopieën per cel
Schimmels	28S rRNA	50 - 100 (75) ^a
<i>Aspergillus fumigatus</i>	18S rRNA	38 - 91 (54)
Mycobacteriën	Hsp65	Onbekend
<i>Mycobacterium avium</i>	16S rRNA	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	regA	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	chitA	Onbekend
<i>Legionella pneumophila</i>	Mip	1

^a tussen haakjes staat het gemiddelde aantal genkopieën dat is gebruikt om het aantal cellen uit te rekenen.

2.3 Statistische analyses

Voordat de statistische toetsen werden uitgevoerd, werd eerst onderzocht of de (loggetransformeerde) gegevens van de verschillende parameters normaal verdeeld waren (Kolmogorov-Smirnov toets). Er werd per pompstation statistisch getoetst of parameterwaarden tussen winter en zomer verschilden. Hierbij werd een t-toets toegepast voor de gegevens die normaal verdeeld waren en de Mann-Whitney toets voor de gegevens die niet normaal verdeeld waren. Er werd per seizoen getoetst of bepaalde parameterwaarden verschilden tussen de distributiesystemen. Hierbij werd een ANOVA-toets met Bonferroni posthoc test toegepast voor gegevens die normaal verdeeld waren en een Kruskal-Wallis toets met Bonferroni posthoc test voor de gegevens die niet normaal verdeeld waren. De correlatieanalyse werd uitgevoerd op gegevens die normaal verdeeld waren, waardoor de

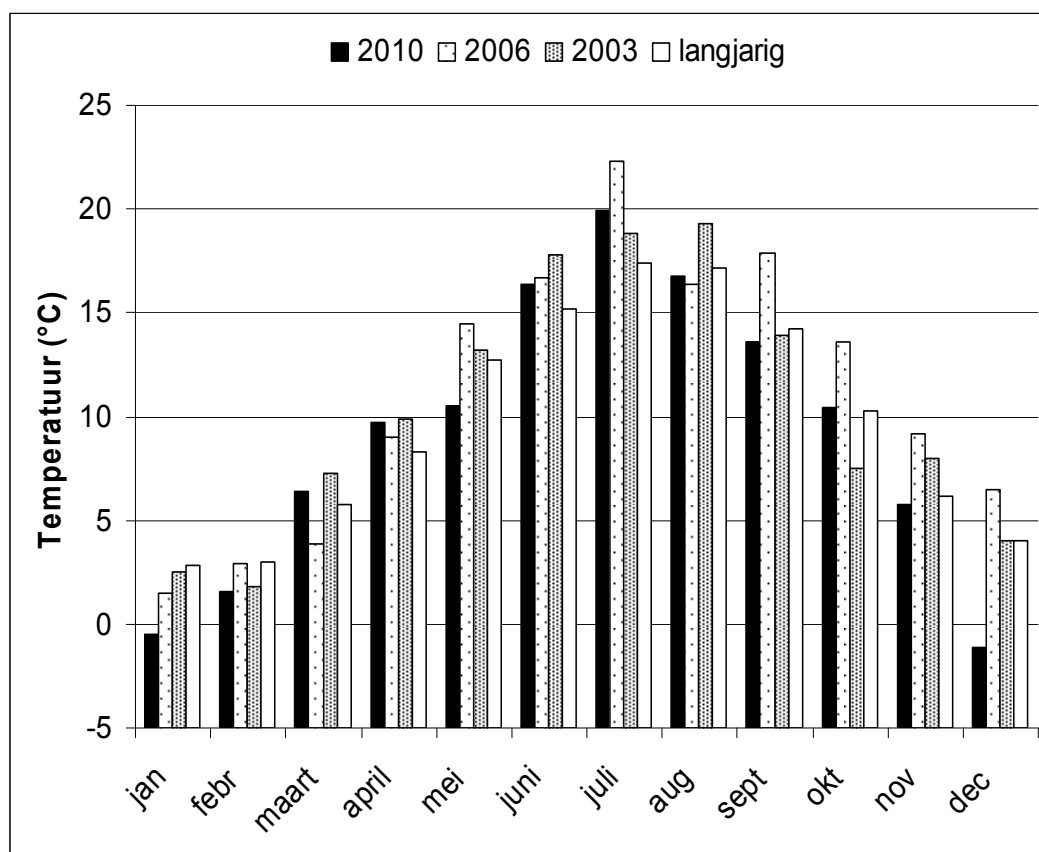
Pearson correlatieanalyse kon worden toegepast. In alle statistische analyses werden verschillen als significant beschouwd als de significantiewaarde onder de 0,01 lag.

3 Resultaten

3.1 Algemeen

3.1.1 Temperatuurverloop in de Bilt

De gemiddelde maandtemperatuur (dag en nacht) in 2003, 2006, 2010 en het langjarig gemiddelde op weerstation 'de Bilt' is weergegeven in Figuur 3.1. In 2010 was de gemiddelde temperatuur in januari, februari en mei beduidend lager dan het langjarig gemiddelde. In augustus en september 2010 was de temperatuur ook lager, maar het verschil met het langjarig gemiddelde was klein. In maart, april, juni en juli 2010 was de gemiddelde temperatuur hoger dan het langjarig gemiddelde; vooral in juli was de temperatuur beduidend hoger dan het langjarig gemiddelde. Ten opzichte van het warme jaar 2006 was de gemiddelde temperatuur in 2010 voor de meeste maanden vergelijkbaar of lager; alleen in maart en april was de temperatuur in 2010 hoger. In het warme jaar 2003 was de temperatuur voor vrijwel alle maanden (behalve juli en oktober) hoger dan in 2010. Uit deze gegevens wordt geconcludeerd dat 2010 een normaal jaar lijkt te zijn wat betreft het temperatuurverloop en zeker niet vergeleken kan worden met de warme jaren 2006 en 2003.



Figuur 3.1. De gemiddelde maandtemperaturen op weerstation 'de Bilt' van de maanden januari t/m december in 2010, 2006, 2003 en het langjarig gemiddelde.

3.1.2 Hotspotlocaties in het distributiesysteem

De gemiddelde drinkwatertemperatuur van de monsters genomen op de 'hotspot'- en referentielocaties in de winter en zomer bij acht verschillende distributiesystemen is weergegeven in Tabel 3.1. Over het algemeen was de gemiddelde temperatuur van het drinkwater op de 'hotspot'-locaties hoger dan op de referentielocaties, maar de verschillen zijn klein en niet significant ($p > 0,01$; t-toets). Door het ontbreken van significante verschillen kan worden geconcludeerd dat de vermeende 'hotspot'-locaties in de acht onderzochte distributiesystemen geen locaties zijn waar de temperatuur van het gedistribueerde drinkwater structureel hoger is dan van het drinkwater op andere locaties in het distributienet. Daardoor heeft het geen zin om bij de interpretatie van microbiologische gegevens onderscheid te maken tussen de 'hotspot' locaties en de referentielocaties. De 'hotspot'-locaties in het distributiesysteem van Leeuwarden, Almere en Breda zijn gekozen in een wijk waar stadsverwarming aanwezig is. Deze stadsverwarming heeft dus geen invloed gehad op de drinkwatertemperatuur, vermoedelijk omdat de leidingen van de stadsverwarming niet dicht genoeg bij de drinkwaterleidingen liggen.

Tabel 3.1 De gemiddelde temperatuur \pm de standaarddeviatie van het gedistribueerde drinkwater op vermeende hotspot- en referentielocaties van acht distributiesystemen in de winter en zomer van 2010. Tevens is aangegeven of het verschil tussen hotspot- en referentielocaties statistisch significant was.

Distributiesysteem	Winter			Zomer		
	hotspot	Referentie	p-waarde	hotspot	Referentie	p-waarde
Leeuwarden	5,9 \pm 1,6	nvt	nvt	19,4 \pm 0,6	nvt	nvt
Breda	9,0 \pm 1,1	7,5 \pm 0,7	> 0,01	17,9 \pm 1,8	18,8 \pm 0,8	> 0,01
Almere	9,7 \pm 1,3	8,3 \pm 1,2	> 0,01	18,1 \pm 1,4	17,3 \pm 1,0	> 0,01
Ps Scheveningen	9,6 \pm 3,7	8,3 \pm 2,1	> 0,01	18,6 \pm 1,3	16,8 \pm 1,1	> 0,01
Ps Kralingen	6,3 \pm 1,1	6,9 \pm 0,9	> 0,01	19,1 \pm 0,7	19,2 \pm 0,5	> 0,01
Ps Berenplaat	6,0 \pm 1,9	5,0 \pm 2,6	> 0,01	20,5 \pm 1,1	20,2 \pm 1,6	> 0,01
Ps Weesperkarspel	5,4 \pm 0,7	5,2 \pm 0,1	> 0,01	18,6 \pm 0,1	18,6 \pm 0,1	> 0,01
Ps Andijk	8,0 \pm 0,5	8,0 \pm 1,2	> 0,01	18,2 \pm 0,6	17,9 \pm 1,6	> 0,01

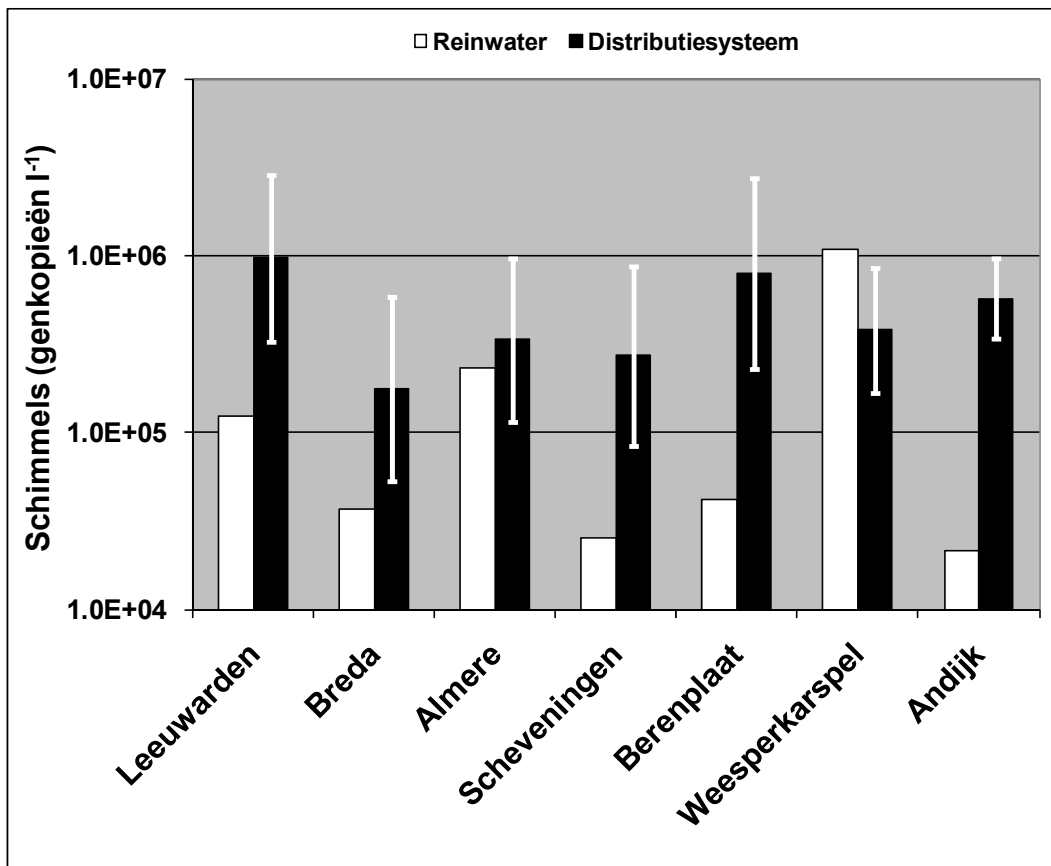
3.2 Opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater

3.2.1 Schimmels en *Aspergillus fumigatus*

In alle drinkwatermonsters werden genkopieën van het 18S rRNA gen van schimmels waargenomen, dus schimmels komen voor in alle acht distributiesystemen (Figuur 3.2). Het aantal 18S rRNA genkopieën varieerde van $1,1 \times 10^4$ kopieën per liter op een locatie in het distributiesysteem van Almere tot $8,7 \times 10^6$ kopieën per liter op een locatie in het distributiesysteem van ps Weesperkarspel. Het aantal 18S rRNA genkopieën per cel varieert tussen verschillende schimmelsoorten, maar ligt gemiddeld tussen de 50 en 100 genkopieën per cel. Het aantal cellen van schimmels in de drinkwatermonsters ligt daardoor tussen de $1,1 \times 10^2$ en $1,7 \times 10^5$ N per liter.

Bij zes van de zeven distributiesystemen was het gemiddelde aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels hoger in de monsters van het distributiesysteem dan in het reinwater van het betreffende pompstation in de zomer (Figuur 3.2; het distributiesysteem van ps Kralingen werd niet meegenomen, omdat geen reinwatermonsters zijn genomen). In het distributiesysteem van Leeuwarden, Breda, ps Scheveningen, ps Berenplaat en ps Andijk was het aantal genkopieën in het gedistribueerde drinkwater 2 tot 100 keer hoger dan in het reinwater. Het aantal genkopieën was in twee monsters van het distributiesysteem van Almere lager dan in het reinwater; het aantal genkopieën in de overige monsters was 1,3 tot 12,6 keer hoger dan in het

reinwater. In elf van de dertien monsters van het distributiesysteem van ps Weesperkarspel was het aantal genkopieën lager dan in het reinwater.



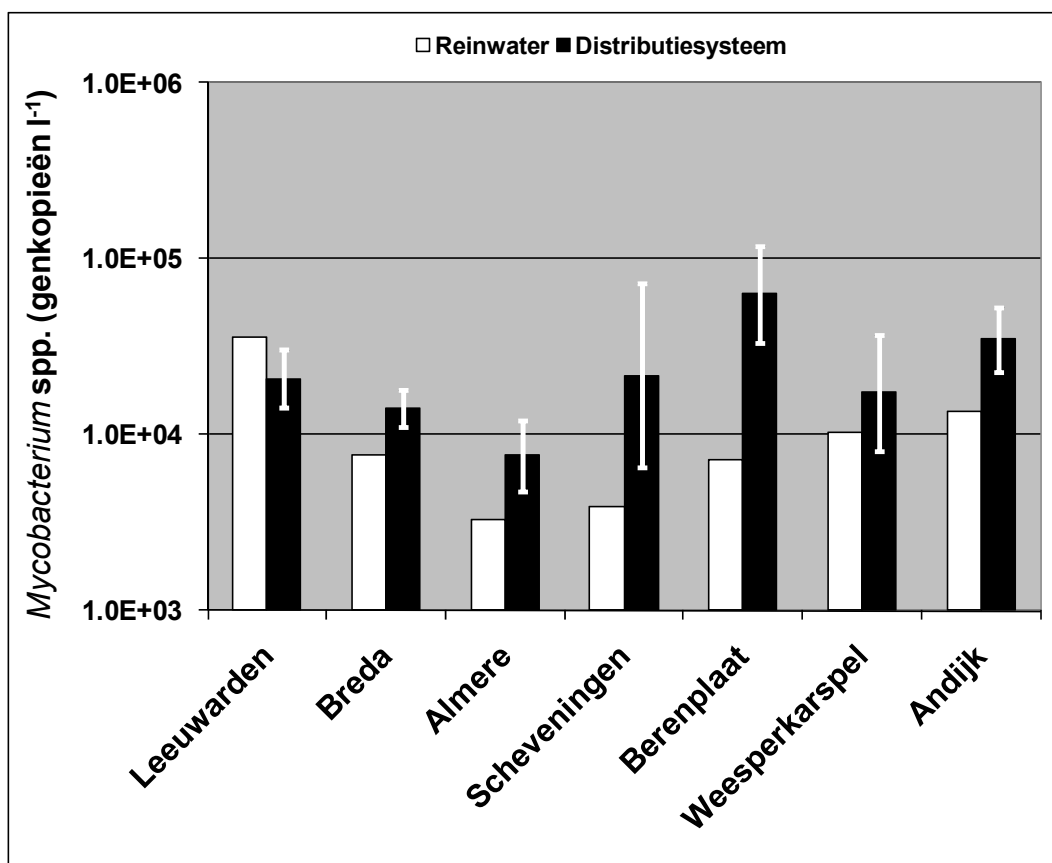
Figuur 3.2. Het geometrisch gemiddelde \times /geometrische standaarddeviatie van het aantal kopieën van het 18S rRNA gen van schimmels in drinkwatermonsters van zeven verschillende distributiesystemen en het aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels in het reinwater van het desbetreffende pompstation in de zomer van 2010.

De resultaten laten dus zien dat schimmels algemeen voorkomen in het drinkwater van de acht bemonsterde distributiesystemen en dat ze in staat zijn zich te vermeerderen in het distributiesysteem. Het is echter onduidelijk of deze aangetroffen schimmels ook ziekteverwekkend zijn voor mensen. Een beperkte sequentieanalyse van het 18S rRNA gen van schimmels heeft laten zien dat humaanpathogene schimmels in drinkwater kunnen voorkomen (van der Wielen et al., 2011b). Daarnaast is onderzocht of de opportunistisch ziekteverwekkende schimmelsoort *A. fumigatus* kon worden gedetecteerd in drinkwater. Het 28S rRNA gen van *A. fumigatus* werd alleen aangetroffen in het distributiesysteem van ps Weesperkarspel. In de andere zeven distributiesystemen werd het 28S rRNA gen van *A. fumigatus* niet aangetroffen, dus in de geanalyseerde drinkwatermonsters uit deze zeven distributiesystemen was het aantal 28S rRNA genkopieën lager dan 200 kopieën per liter. Het aantal 28S rRNA genkopieën varieert tussen de 38 en 91 kopieën per cel bij verschillende stammen van *A. fumigatus*, met een gemiddelde van 54 kopieën per cel (Herrera et al. 2009). Het aantal cellen van *A. fumigatus* was in zeven van de acht distributiesystemen dus lager dan 3,7 cellen per liter. In het gedistribueerde drinkwater van ps Weesperkarspel werd het 28S rRNA gen van *A. fumigatus* in drie monsters gedetecteerd. Het aantal genkopieën varieerde in deze drie monsters van 660 tot 830 per liter, dat overeenkomt met 12 tot 15 *A. fumigatus* cellen

per liter. Omdat het aantal 28S rRNA genkopieën van *A. fumigatus* in het reinwater van ps Weesperkarspel lager was dan 200 per liter, is het aantal 28S rRNA genkopieën in de drie positieve monsters van het distributienet in ieder geval 3,3 tot 4,2 keer hoger dan in het reinwater. Blijkbaar is *A. fumigatus* in staat geweest zich te vermeerderen in het distributiesysteem van ps Weesperkarspel.

3.2.2 *Mycobacterium* spp. en *Mycobacterium avium*

Kopieën van het *hsp65* gen van *Mycobacterium* spp. werden gedetecteerd in alle drinkwatermonsters die in de winter en zomer zijn genomen in acht verschillende distributiesystemen. Het aantal *hsp65* genkopieën van *Mycobacterium* spp. varieerde van $3,0 \times 10^3$ genkopieën l^{-1} op een locatie in het distributiesysteem van Almere tot $5,1 \times 10^5$ genkopieën l^{-1} op een locatie in het distributiesysteem van Breda. Bij zes van de zeven distributiesystemen werd waargenomen dat het gemiddeld aantal *Hsp65* genkopieën van *Mycobacterium* spp. in het gedistribueerde water hoger was dan in het reinwater (Figuur 3.3). Over het algemeen was het aantal *Hsp65* genkopieën 1,1 tot 10 keer hoger in het gedistribueerde drinkwater dan in het reinwater van het pompstation. In één monster van het distributiesysteem in Almere en in twee monsters van het distributiesysteem van ps Weesperkarspel was het aantal *Hsp65* genkopieën van mycobacteriën lager dan in het reinwater. In het distributiesysteem van Leeuwarden was het aantal *Hsp65* genkopieën van *Mycobacterium* spp. gelijk aan of lager dan het aantal genkopieën in het reinwater van ps Spannenburg.



Figuur 3.3. Het geometrisch gemiddelde \times /geometrische standaarddeviatie van het aantal kopieën van het *Hsp65* gen van *Mycobacterium* spp. in drinkwatermonsters van zeven verschillende distributiesystemen en aantal *Hsp65* genkopieën van *Mycobacterium* spp. in het reinwater van het desbetreffende pompstation in de zomer van 2010.

De resultaten laten dus zien dat mycobacteriën algemeen voorkomen in het drinkwater van de acht bemonsterde distributiesystemen en dat ze in staat zijn zich te vermeerderen in het distributiesysteem. De aanwezigheid van de ziekteverwekkende soort *M. avium* in het gedistribueerde drinkwater werd ook bepaald. Het 16S rRNA gen van *M. avium* werd in geen enkel drinkwatermonster gedetecteerd en het aantal 16S rRNA genkopieën was daardoor dus lager dan 200 per liter. *M. avium* heeft slechts één 16S rRNA genkopie per cel (Chiodini, 1990), waardoor het aantal cellen van *M. avium* in de drinkwatermonsters in ieder geval lager was dan 200 per liter.

3.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

In het drinkwater van het distributiesysteem van Almere, ps Weesperkarspel en ps Andijk werd het *regA* gen van *P. aeruginosa* in de winter en zomer niet aangetroffen. In deze drie distributiesystemen was het aantal *regA* genkopieën dus lager dan de detectielimiet van 200 genkopieën per liter. Omdat *P. aeruginosa* één kopie van het *regA* gen in het genoom van een cel heeft (Hedstrom et al., 1986), was het aantal *P. aeruginosa* cellen in deze drinkwatermonsters ook lager dan 200 per liter.

Het *regA* gen van *P. aeruginosa* werd wel aangetroffen in een aantal drinkwatermonsters van het distributiesysteem in Leeuwarden. Het aantal genkopieën varieerde daarbij tussen de 860 en 3300 *regA* genkopieën per liter. Overigens werd bij deze monsterserie (distributiesysteem Leeuwarden in de winter) het *regA* gen van *P. aeruginosa* ook aangetroffen in de blanco DNA-isolatie, maar werd bij vier monsters geen PCR-product gevormd. Ondanks de vier negatieve monsters, kan niet helemaal worden uitgesloten dat er mogelijk een kruiscontaminatie tussen monsters is opgetreden. In één of meerdere drinkwatermonster van het distributiesysteem van Breda, ps Scheveningen, ps Kralingen en ps Berenplaat werd het *regA* gen van *P. aeruginosa* ook gedetecteerd. Het aantal genkopieën lag hierbij tussen de 290 en 4400 kopieën l⁻¹. De blanco DNA-isolatie was bij deze monsters wel negatief voor het *regA* gen van *P. aeruginosa*.

Het reinwater van ps Dorst, ps Oosterhout (beide pompstations voeden distributiesysteem Breda), ps Spannenburg (voedt distributiesysteem van Leeuwarden), ps Scheveningen en ps Berenplaat onderzocht op de aanwezigheid van het *regA* gen van *P. aeruginosa*, maar bij alle pompstations was het aantal *regA* genkopieën in het reinwater lager dan de detectielimiet van 200 kopieën l⁻¹. Blijkbaar zijn de meer dan 1,5 tot 5,9 keer hogere aantallen *regA* genkopieën op locaties in deze distributiesysteem veroorzaakt door vermeerdering van *P. aeruginosa* in het drinkwater. Deze resultaten laten zien dat *P. aeruginosa* kan voorkomen in het gedistribueerde drinkwater en dat *P. aeruginosa* in staat is zich te vermeerderen in het drinkwaterdistributiesysteem.

De drinkwatermonsters die in de zomer van 2010 zijn genomen, werden ook ingezet op het aantal kolonievormende eenheden van *P. aeruginosa* met behulp van een selectief agarmedium. In het distributiesysteem van Almere werden kweekbare *P. aeruginosa* bacteriën aangetroffen op twee locaties in het distributiesysteem. In de zeven andere distributiesystemen werd in de zomer geen *P. aeruginosa* aangetroffen in de drinkwatermonsters en daar waren de aantallen *P. aeruginosa* lager dan 10 kve l⁻¹. Het aantal *P. aeruginosa* cellen op de twee positieve locaties in het distributiesysteem van Almere was 10 kve l⁻¹ drinkwater.

3.2.4 *Stenotrophomonas maltophilia*

In de winter werd het *chitA* gen van *S. maltophilia* niet gedetecteerd in drinkwatermonsters van de geanalyseerde distributiesystemen. In het bemonsterde drinkwater was het aantal

genkopieën daardoor in de winter van 2010 lager dan 412 per liter. In de zomer werd het *chitA* gen van *S. maltophilia* ook niet aangetroffen in het distributiesysteem van Breda, Almere en ps Andijk. In het distributiesysteem van Leeuwarden, ps Scheveningen en ps Weesperkarspel werd het *chitA* gen van *S. maltophilia* in de zomer op één of twee locaties aangetroffen. De aantallen lagen daarbij tussen de $2,2 \times 10^3$ en $1,0 \times 10^4$ genkopieën l⁻¹. Het gedistribueerde drinkwater van ps Kralingen en ps Berenplaat was in de zomer vaker positief voor het *chitA* gen van *S. maltophilia*: acht van de elf drinkwatermonsters uit het distributiesysteem van ps Kralingen en zes van de dertien drinkwatermonsters uit het distributiesysteem van ps Berenplaat. Het aantal *chitA* genkopieën van *S. maltophilia* varieerde tussen de $< 4,1 \times 10^2$ en $5,3 \times 10^3$ kopieën l⁻¹ in het gedistribueerde drinkwater van ps Kralingen en tussen de $< 4,1 \times 10^2$ en $1,1 \times 10^4$ kopieën l⁻¹ in het gedistribueerde drinkwater van ps Berenplaat.

In het reinwater van de desbetreffende pompstations werd het *chitA* gen van *S. maltophilia* niet aangetroffen. Het aantal kopieën van het *chitA* gen in het reinwater was dus lager dan de detectielimiet van 412 kopieën l⁻¹. Op de enkele locaties in het distributiesysteem van Leeuwarden, ps Scheveningen en ps Weesperkarspel waar het *chitA* gen van *S. maltophilia* werd aangetroffen, was het aantal *chitA* genkopieën in ieder geval 7,0 tot 24,3 keer hoger dan in het reinwater. In het gedistribueerde drinkwater van ps Kralingen was het aantal *chitA* genkopieën van *S. maltophilia* bij acht monsters in ieder geval 6,1 tot 12,9 keer hoger dan in het reinwater. Tot slot was het aantal *chitA* genkopieën in zes drinkwatermonsters van het distributiesysteem van ps Berenplaat 1,4 tot 26,7 keer hoger dan in het reinwater van het pompstation. Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat *S. maltophilia* in gedistribueerd drinkwater voorkomt en dat deze bacterie in staat is zich te vermeerderen in het distributiesysteem.

3.2.5 Acanthamoeba spp.

Het 18S rRNA gen van *Acanthamoeba* spp. werd niet aangetroffen in de drinkwatermonsters van de acht verschillende distributiesystemen. Het aantal cellen van *Acanthamoeba* spp. was daardoor in alle gevallen lager dan 1 cel l⁻¹.

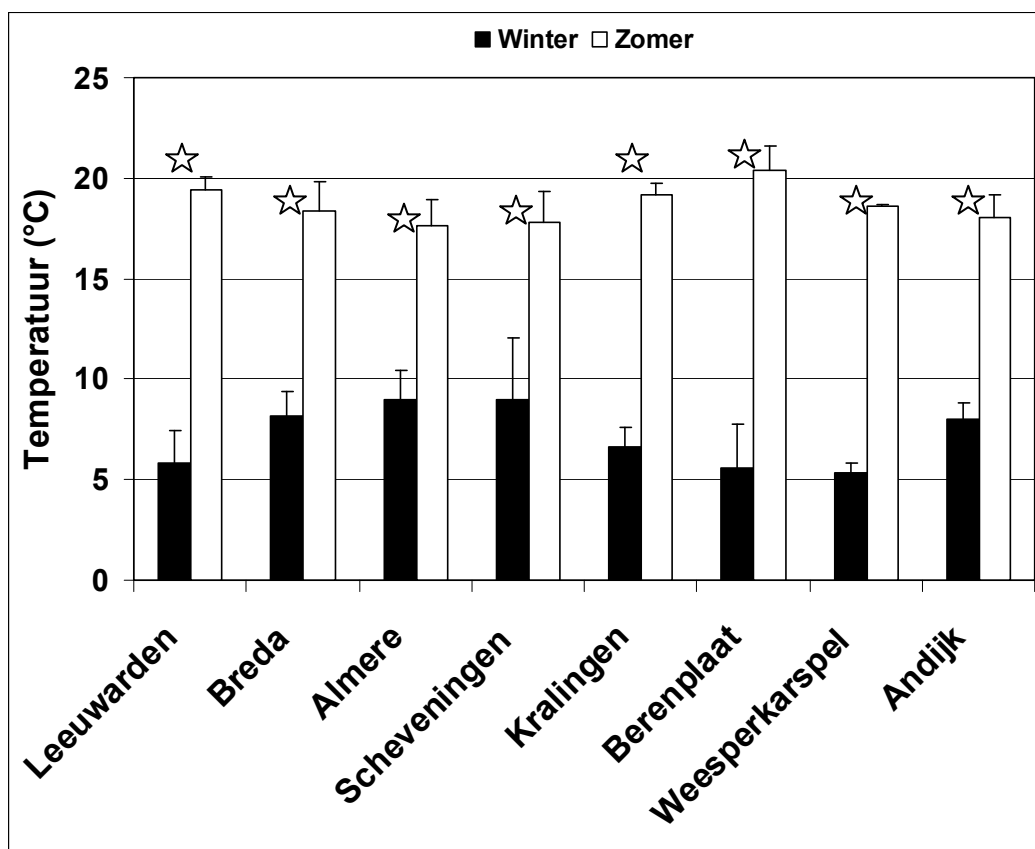
3.3 Effect van winter versus zomer

3.3.1 Temperatuur

De temperatuur van het gedistribueerde drinkwater was in alle onderzochte distributiesystemen significant hoger in de zomer dan in de winter ($p < 0,01$; t-toets; Figuur 3.4). Het effect van de drinkwatertemperatuur op de microbiologische parameters werd daarom onderzocht door de aantallen in de winter te vergelijken met de aantallen in de zomer.

3.3.2 ATP

De ATP-concentratie van het gedistribueerde water was over het algemeen niet significant verschillend tussen de winter en zomer voor ieder van de acht onderzochte distributiesystemen (Tabel 3.2). Alleen in het distributiesysteem van ps Scheveningen en ps Kralingen werd waargenomen dat in de zomer de gemiddelde ATP-concentratie in het gedistribueerde water significant hoger was dan in de winter ($p < 0,01$; t-toets). In een eerdere BTO-studie werd ook waargenomen dat de ATP-concentraties in het distributiesysteem van vier van de zes onderzochte pompstations niet verschilden tussen de seizoenen (van der Wielen and van der Kooij, 2009b).



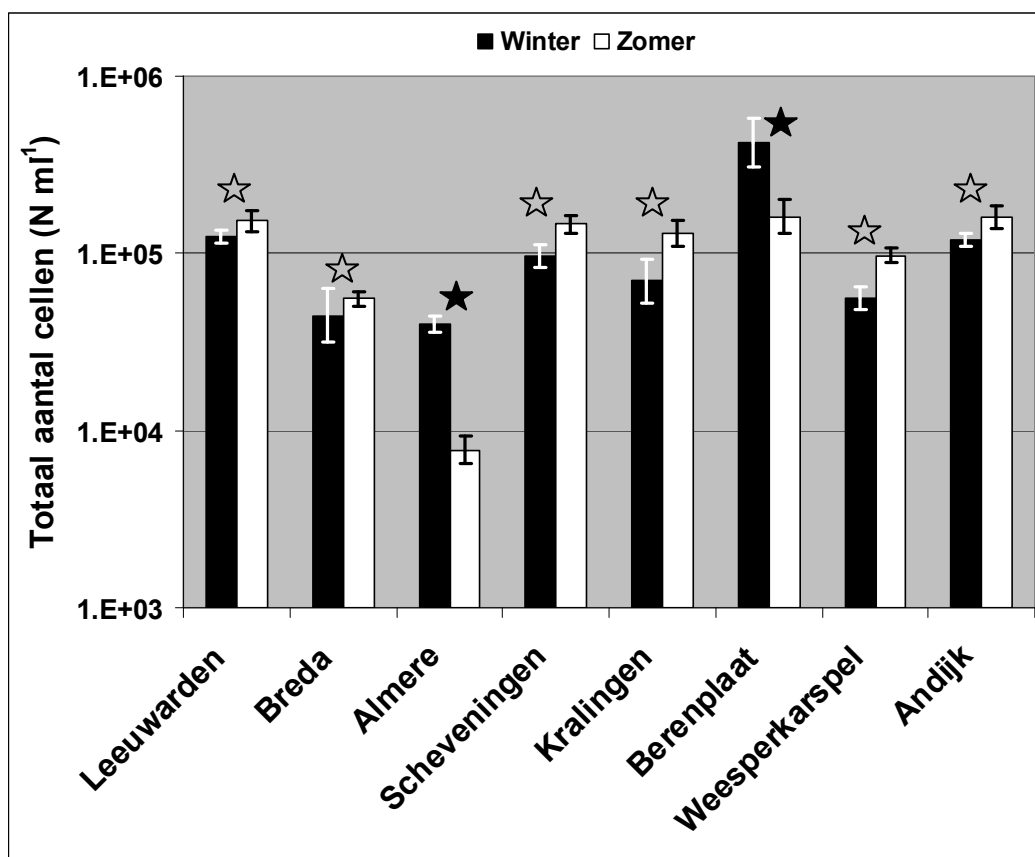
Figuur 3.4 De gemiddelde temperatuur \pm standaarddeviatie van het gedistribueerde drinkwater in de winter en zomer gemeten aan tappunten op verschillende locaties in acht distributiesystemen. ☆ = zomer significant hoger dan winter ($p < 0,01$).

Tabel 3.2 De gemiddelde ATP-concentratie in $\text{ng l}^{-1} \pm$ standaarddeviatie van het gedistribueerde drinkwater op verschillende locaties in acht distributiesystemen in de winter en zomer. Tevens is aangegeven of het verschil in ATP tussen de winter en zomer significant was (p -waarde $< 0,01$).

Distributiesysteem	Winter	Zomer	p -waarde
Leeuwarden	$5,8 \pm 1,0$	$6,6 \pm 1,2$	$> 0,01$
Breda	$2,0 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,6$	$> 0,01$
Almere	$1,5 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,5$	$> 0,01$
Ps Scheveningen	$0,8 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,4$	$< 0,01$
Ps Kralingen	$< 1,0$	$2,9 \pm 1,6$	$< 0,01$
Ps Berenplaat	$3,6 \pm 2,0$	$4,2 \pm 2,1$	$> 0,01$
Ps Weesperkarspel	$5,0 \pm 1,0$	$3,7 \pm 1,4$	$> 0,01$
Ps Andijk	$4,3 \pm 0,9$	$4,1 \pm 1,1$	$> 0,01$

3.3.3 Celaantallen

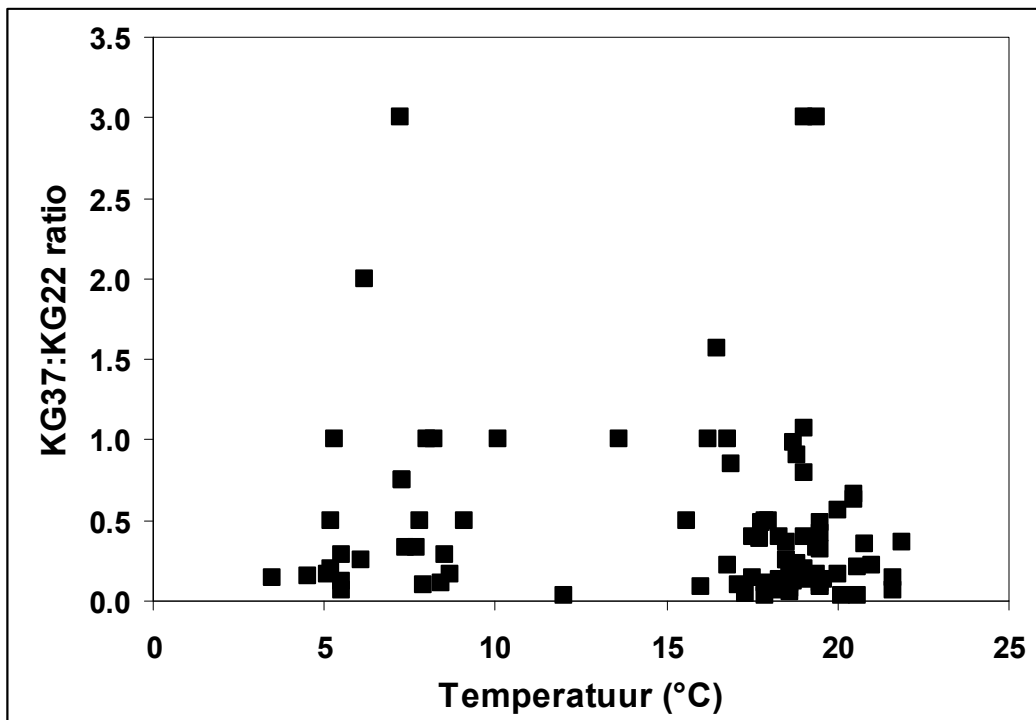
Het aantal cellen in een aantal drinkwatermonsters werd geanalyseerd met de flowcytometer en met de microscoop. De resultaten laten zien dat tussen deze twee meetmethoden geen significante verschillen waren ($p < 0,01$; t -toets). In deze rapportage worden de celaantallen gegeven die zijn gemeten met de flowcytometer. Het aantal cellen in het gedistribueerde drinkwater was bij zes van de acht distributiesystemen significant hoger in de zomer dan in de winter (Figuur 3.5). In het distributiesysteem van Almere en ps Berenplaat was echter in de winter het aantal cellen in het gedistribueerde drinkwater significant hoger dan in de zomer. Het is niet duidelijk waardoor dit verschil wordt veroorzaakt.



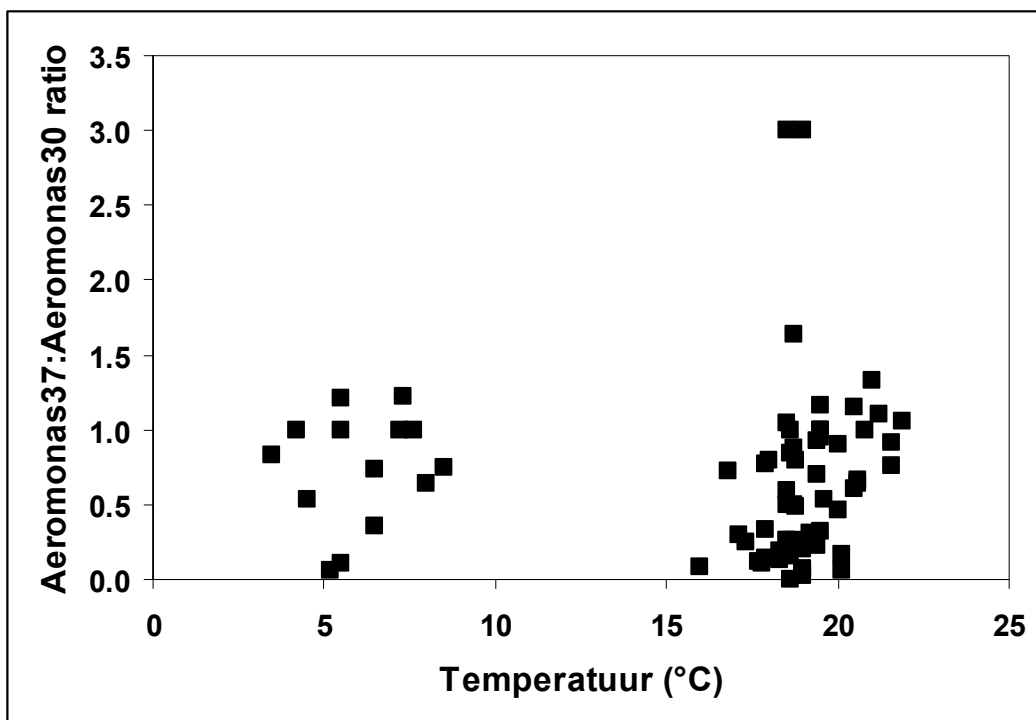
Figuur 3.5 Het geometrisch gemiddelde van de celaantallen \times de geometrische standaarddeviatie in het gedistribueerde drinkwater op verschillende locaties in acht distributiesystemen tijdens de winter en zomer van 2010. ☆ = zomer significant hoger dan winter ($p < 0,01$); ★ = winter significant hoger dan zomer ($p < 0,01$).

3.3.4 KG22, KG37, *Aeromonas*30 en *Aeromonas*37

De kolonievormende eenheden van de parameters KG22, KG37, *Aeromonas*30 en *Aeromonas*37 maken slechts een zeer klein deel uit van de totale populatie en zijn daarmee geen geschikte parameters om de hoeveelheid biomassa in het water te meten. De aantallen KG22, KG37, *Aeromonas*30 en *Aeromonas* 37 zijn daarom weergegeven in Bijlage 2. KG22, KG37, *Aeromonas*30 en *Aeromonas* 37 waren beduidend hoger in de zomer dan in de winter. Blijkbaar zijn de condities voor groei van heterotrofe bacteriën die worden gemeten met KG22, KG37 en *Aeromonas* gunstiger in de zomer dan in de winter. Waarschijnlijk speelt de drinkwatertemperatuur daar een directe of indirecte rol bij. Uit eerder onderzoek is bekend dat de drinkwatertemperatuur een invloed heeft op het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas* (Baggelaar et al., 1992; van der Wielen & van der Kooij, 2011a). Onverwacht zijn echter de relatief hoge *Aeromonas*-aantallen in het distributiesysteem van Leeuwarden in de winter. De gemiddelde drinkwatertemperatuur was in die periode $5,9 \pm 1,6^\circ\text{C}$, die normaal te laag is om groei van *Aeromonas* te veroorzaken, maar wel was het ATP-gehalte relatief hoog.

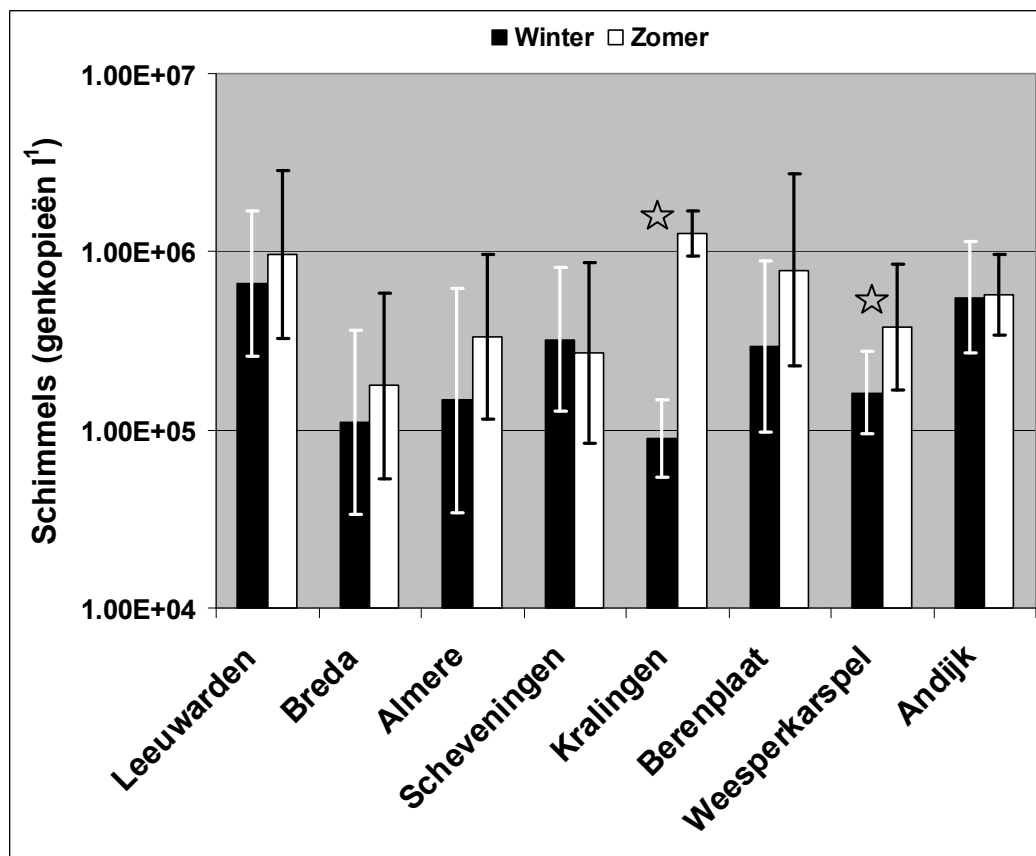


Figuur 3.6 De relatie tussen KG37:KG22 ratio en temperatuur in gedistribueerde drinkwatermonsters van acht distributiesystemen.



Figuur 3.7 De relatie tussen Aeromonas37:Aeromonas30 ratio en temperatuur in gedistribueerde drinkwatermonsters van acht distributiesystemen.

Tevens is gekeken of een relatie aanwezig is tussen de drinkwatertemperatuur en de KG37:KG22 ratio of *Aeromonas*37:*Aeromonas*30 ratio. Er werden geen sterke relaties waargenomen tussen de KG37:KG22 ratio en de temperatuur (Figuur 3.6) of de *Aeromonas*37:*Aeromonas*30 ratio en de temperatuur (Figuur 3.7). Zowel bij lage als hoge temperaturen werden ratio's van boven de 1,0 waargenomen. Het aantal kolonievormende eenheden van KG37 of *Aeromonas*37 kan dus hoger zijn dan KG22 of *Aeromonas*30 bij zomer- en wintertemperaturen. Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat de ratio van KG37:KG22 of *Aeromonas*37:*Aeromonas*30 niet kan worden gebruikt als eenvoudige indicatorparameter voor het signaleren van de invloed van een toenemende watertemperatuur op nagroei of van verschuivingen in de samenstelling van de bacterieflora in het drinkwater.



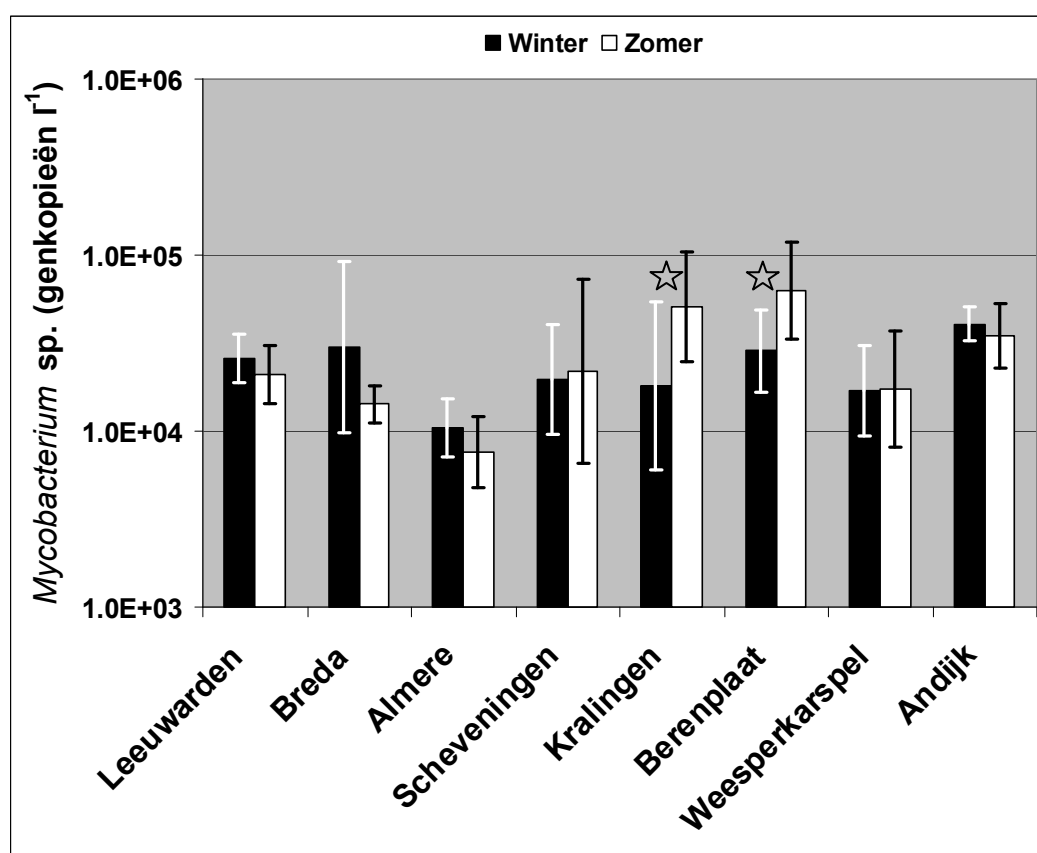
Figuur 3.8. Het geometrisch gemiddelde \times /geometrische standaarddeviatie van het aantal kopieën van het 18S rRNA gen van schimmels in het drinkwater van acht distributiesystemen in de winter en zomer van 2010. ☆ = zomer significant hoger dan winter ($p < 0,01$).

3.3.5 Schimmels en *A. fumigatus*

Het geometrisch gemiddelde van het aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels in het gedistribueerde drinkwater van de acht distributiesystemen is weergegeven in Figuur 3.8. In de winter was het gemiddelde aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels in het gedistribueerde drinkwater van ps Kralingen het laagst en was het gemiddeld aantal kopieën het hoogst in het distributiesysteem van Leeuwarden. In de zomer was het gemiddeld aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels het laagst in het gedistribueerde drinkwater van distributiesysteem Breda; in het distributiesysteem van ps Kralingen was het gemiddelde aantal genkopieën het hoogst. Bij de meeste distributiesystemen was het geometrisch gemiddelde van het aantal 18S

rRNA genkopieën hoger in de zomer dan in de winter. Alleen in het distributiesysteem van ps Scheveningen was het geometrisch gemiddelde in de zomer lager dan in de winter. In het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Weesperkarspel was het aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels in de zomer ook significant hoger dan in de winter ($p < 0,01$; t-toets).

Genkopieën van het 28S rRNA gen van *A. fumigatus* werden uitsluitend waargenomen in de zomer in het distributiesysteem van ps Weesperkarspel. Drie van de dertien monsters waren in deze periode positief voor *A. fumigatus*; in de winter werd *A. fumigatus* niet waargenomen. Evenals voor schimmels, geldt ook voor het aantal 28S rRNA genkopieën van *A. fumigatus* dat de hogere drinkwatertemperatuur in de zomer vermoedelijk verantwoordelijk is geweest voor de hogere aantallen 28S rRNA genkopieën van *A. fumigatus* in het distributiesysteem van ps Weesperkarspel. Naast temperatuur spelen ook andere factoren een rol, omdat bij de andere distributiesystemen *A. fumigatus* niet is aangetroffen in de zomer.

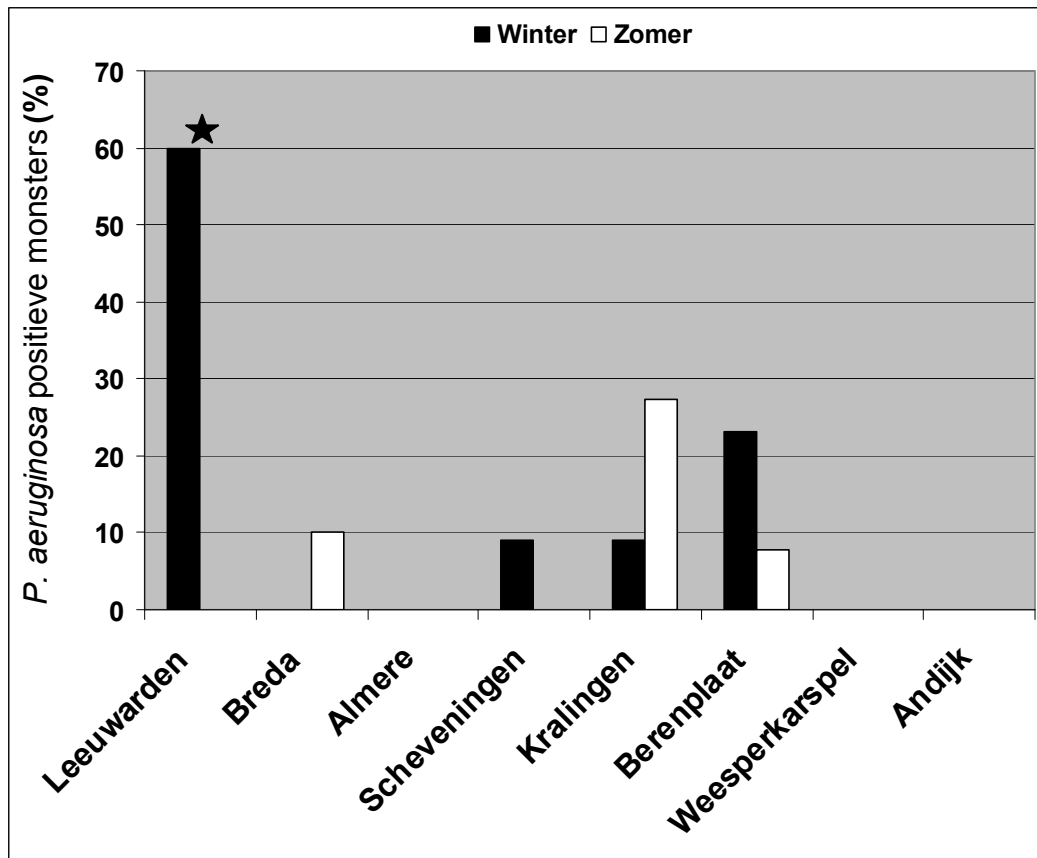


Figuur 3.9. Het geometrisch gemiddelde \times / geometrische standaarddeviatie van het aantal kopieën van het *hsp65* gen van *Mycobacterium* spp. in het drinkwater van acht distributiesystemen in de winter en zomer van 2010. ☆ = zomer significant hoger dan winter ($p < 0,01$).

3.3.6 *Mycobacterium*

Het geometrisch gemiddelde van het aantal *hsp65* genkopieën van *Mycobacterium* spp. in het drinkwater van acht verschillende distributiesystemen in de winter en zomer van 2010 is weergegeven in Figuur 3.9. In de winter was het gemiddeld aantal genkopieën het hoogst in het gedistribueerde drinkwater van ps Andijk. In de zomer was het gemiddeld aantal *Hsp65* genkopieën het hoogst in het gedistribueerde water van ps Berenplaat en het laagst in het

distributiesysteem van Almere. In het drinkwater van distributiesysteem Leeuwarden, Breda, Almere en ps Andijk was het gemiddeld aantal *hsp65* genkopieën van *Mycobacterium* spp. in de zomer lager dan in de winter, maar deze verschillen waren niet statistisch significant ($p > 0,01$; t-toets). In het gedistribueerde drinkwater van ps Scheveningen en ps Weesperkarspel was het gemiddeld aantal *hsp65* genkopieën van mycobacteriën in de zomer hoger dan in de winter, maar ook deze verschillen waren niet significant ($p > 0,01$). Het aantal *hsp65* genkopieën van *Mycobacterium* spp. was wel significant hoger in de zomer dan in de winter in het drinkwater van het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat ($p < 0,01$).



Figuur 3.10. Het percentage positieve monsters voor het *regA* gen van *P. aeruginosa* in het drinkwater van acht distributiesystemen in de winter en zomer van 2010. ★ = winter significant hoger dan zomer ($p < 0,01$).

3.3.7 *P. aeruginosa*

Zowel in de winter als de zomer werd het *regA* gen van *P. aeruginosa* in het gedistribueerde drinkwater van enkele distributiesystemen waargenomen (Figuur 3.10). Alleen in de winter waren in het distributiesysteem van Leeuwarden en ps Scheveningen één of meerdere monsters positief voor het *regA* gen, terwijl in het distributiesysteem van Breda alleen een monster in de zomer positief was. In het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat waren in de winter en zomer drinkwatermonsters positief voor het *regA* gen van *P. aeruginosa*. In het distributiesysteem van ps Kralingen werden de meeste positieve drinkwatermonsters en de hoogste aantallen *regA* genkopieën in de zomer waargenomen, terwijl in het distributiesysteem van ps Berenplaat de meeste positieve drinkwatermonsters en hoogste *regA* genkopieaantallen in de winter werden waargenomen. Op het distributiesysteem van Leeuwarden na was het verschil in positieve en negatieve monsters voor het *regA* gen van *P.*

aeruginosa niet significant verschillend tussen winter en zomer ($p > 0,01$; Mann-Whitney toets). Bemonstering in de winter of zomer in de acht onderzochte distributiesystemen en bemonstering van de binneninstallatie in het voorzieningsgebied van ps Berenplaat en ps Kralingen lijkt dus geen invloed te hebben op het voorkomen van *P. aeruginosa* in drinkwater.

3.3.8 *S. maltophilia*

Het aantal kopieën van het *chitA* gen van *S. maltophilia* was in de winter onder de detectielimiet voor de drinkwatermonsters van alle acht de distributiesystemen. In de zomer werd het *chitA* gen van *S. maltophilia* wel aangetroffen bij een aantal monsters uit het distributiesysteem van Leeuwarden, ps Scheveningen, ps Kralingen, ps Berenplaat en ps Weesperkarspel (Tabel 3.3). Mogelijk dat de hogere drinkwatertemperatuur in de zomer verantwoordelijk is voor de hogere aantallen *S. maltophilia* op sommige locaties in het distributiesysteem. Alleen in het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat was er een significant verschil tussen het aantal positieve monsters voor het *chitA* gen van *S. maltophilia* in de zomer en winter ($p < 0,01$; Mann-Whitney toets).

Tabel 3.3 Het aantal positieve drinkwatermonsters voor het *chitA* gen van *S. maltophilia* en het minimum, maximum en geometrisch gemiddelde van het aantal *chitA* genkopieën l⁻¹ van *S. maltophilia* in water van acht verschillende distributiesystemen in de zomer van 2010. ☆ = zomer significant hoger dan winter ($p < 0,01$).

Distributiesysteem	% positieve monsters	<i>S. maltophilia</i> (<i>chitA</i> genkopieën l ⁻¹)		
		Minimum	Maximum	Geom. gemiddelde
Leeuwarden	11,1 (1/9)	< 412	1,0×10 ⁴	< 412
Breda	0,0 (0/10)	< 412	< 412	< 412
Almere	0,0 (0/12)	< 412	< 412	< 412
Scheveningen	18,2 (2/11)	< 412	3,8×10 ³	< 412
Kralingen ☆	72,7 (8/11)	< 412	5,3×10 ³	1,5×10 ³
Berenplaat ☆	46,2 (6/13)	< 412	1,1×10 ⁴	6,6×10 ²
Weesperkarspel	7,7 (1/13)	< 412	2,9×10 ³	< 412
Andijk	0,0 (0/13)	< 412	< 412	< 412

3.3.9 *L. pneumophila*

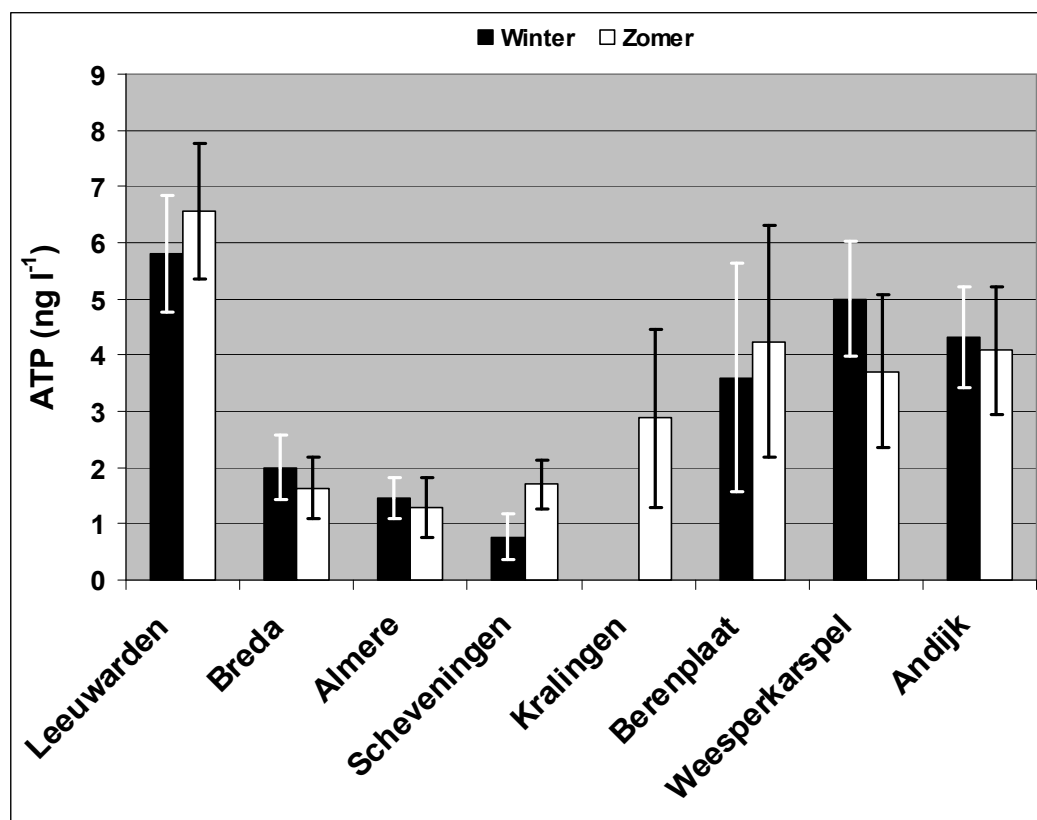
Het *mip* gen van *L. pneumophila* werd aangetroffen in het distributiesysteem van Leeuwarden, ps Kralingen, ps Berenplaat, ps Weesperkarspel en ps Andijk (Tabel 3.4). Bij twee distributiesystemen (Leeuwarden en ps Andijk) was één van de monsters positief in de winter, maar geen van de monsters in de zomer. In het distributiesysteem van ps Weesperkarspel waren twee monsters in de winter positief en maar één monster in de zomer. In het distributiesysteem van ps Kralingen en Berenplaat waren in de zomer juist meer drinkwatermonsters positief voor het *mip* gen van *L. pneumophila* dan in de winter. In de meeste distributiesystemen was het verschil in positieve/negatieve monsters voor het *mip* gen van *L. pneumophila* niet significant ($p > 0,01$; Mann-Whitney toets). Alleen in het distributiesysteem van ps Berenplaat was het percentage positieve drinkwatermonsters in de zomer significant hoger dan in de winter. Waarschijnlijk werden deze hogere aantallen van het *mip* gen van *L. pneumophila* veroorzaakt doordat de monsters in de zomer werden genomen van de binneninstallatie. Uit de resultaten wordt geconcludeerd dat het verschil in drinkwatertemperatuur dat in 2010 tussen de winter en zomer is waargenomen geen effect heeft gehad op de groei van *L. pneumophila* in het gedistribueerde drinkwater.

Tabel 3.4 Het aantal positieve drinkwatermonsters voor het mip gen van *L. pneumophila* en het minimum, maximum en geometrisch gemiddelde van het aantal mip genkopieën l⁻¹ van *L. pneumophila* in water van acht verschillende distributiesystemen. ☆ = zomer significant hoger dan winter (p<0,01).

Distributiesysteem	% positieve monsters	<i>L. pneumophila</i> (mip genkopieën l ⁻¹)		
		Minimum	Maximum	Geom. gemiddelde
Leeuwarden winter	10,0 (1/10)	< 200	1,1×10 ⁴	< 200
Leeuwarden zomer	0,0 (0/9)	< 200	< 200	< 200
Kralingen winter	9,1 (1/11)	< 200	1,1×10 ³	< 200
Kralingen zomer	18,2 (2/11)	< 200	1,3×10 ⁴	< 200
Berenplaat winter ☆	0,0 (0/13)	< 200	< 200	< 200
Berenplaat zomer ☆	100 (13/13)	600	5,2×10 ⁴	9,8×10 ³
Weesperkarspel winter	15,4 (2/13)	< 200	9,2×10 ³	< 200
Weesperkarspel zomer	7,7 (1/13)	< 200	7,9×10 ²	< 200
Andijk winter	0,0 (0/13)	< 200	< 200	< 200
Andijk zomer	15,4 (2/13)	< 200	4,4×10 ³	< 200

3.4 Verschillen tussen distributiesystemen

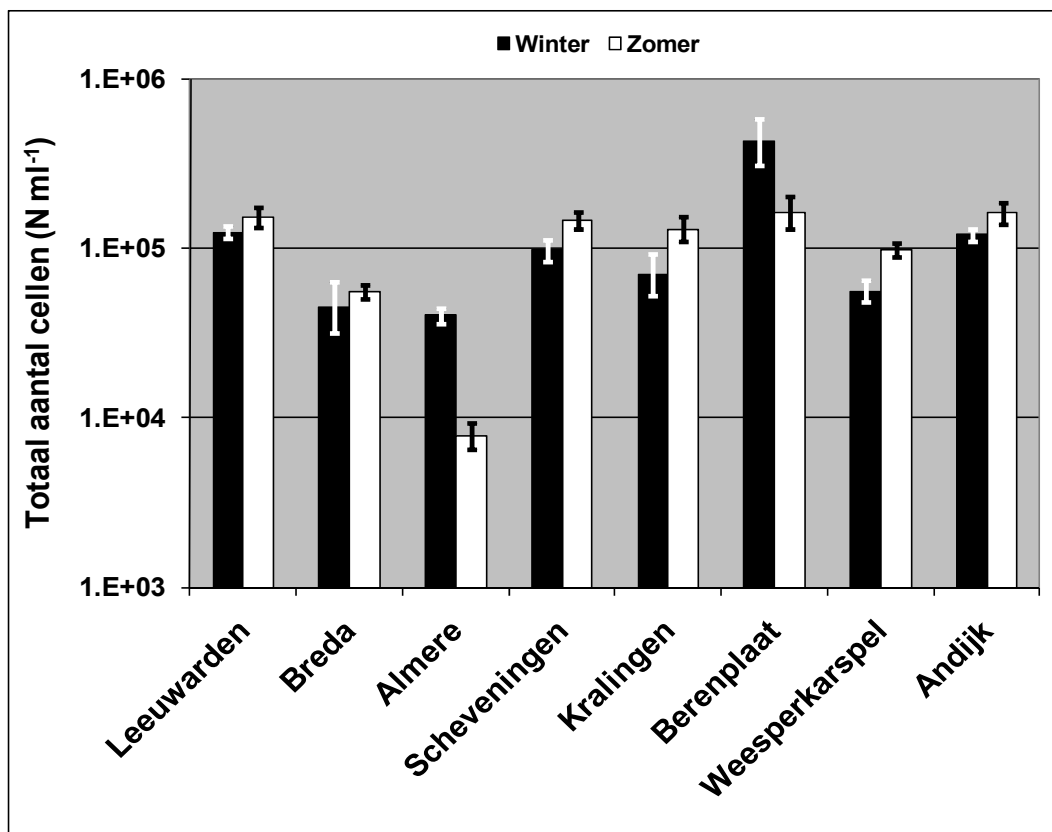
Het drinkwater dat wordt gedistribueerd in de onderzochte distributiesystemen, wordt geleverd door verschillende pompstations. Deze pompstations verschillen in het gebruik van grondstof en in de biologische stabiliteit van het afgeleverde water.



Figuur 3.11 Gemiddelde ATP-concentraties ± standaard deviatie in het gedistribueerde drinkwater van acht distributiesystemen in de winter en zomer van 2010.

3.4.1 ATP en celaantallen

De gemiddelde ATP-concentratie van het gedistribueerde drinkwater bij de acht onderzochte distributiesystemen is weergegeven in Figuur 3.11. Uit deze figuur blijkt dat het ATP-gehalte van het gedistribueerde drinkwater verschilt tussen de distributiesystemen. De laagste concentraties werden waargenomen in het distributiesysteem van Almere, Breda en ps Scheveningen, terwijl de hoogste concentraties werden gemeten in het distributiesysteem van Leeuwarden. Ook de ATP-concentraties van het drinkwater in het distributiesysteem van ps Berenplaat, ps Weesperkarspel en ps Andijk waren relatief hoog. De ATP-concentraties in het distributiesysteem van Almere, Breda en ps Scheveningen waren in de winter en zomer significant lager dan de ATP-concentraties in het distributiesysteem van Leeuwarden, ps Berenplaat, ps Weesperkarspel en ps Andijk ($p < 0,01$; ANOVA met Bonferroni posthoc toets). Deze verschillen in ATP-concentraties zijn volgens verwachting, aangezien het afgeleverde water van pompstations Spannenburg, Berenplaat, Weesperkarspel en Andijk een lagere biologische stabiliteit hebben dan het reinwater van ps Scheveningen.



Figuur 3.12 Het geometrisch gemiddelde van het aantal cellen \times / geometrische standaard deviatie in het gedistribueerde drinkwater van acht distributiesystemen in de winter en zomer van 2010.

Met behulp van de flowcytometer werd het totaal aantal cellen bepaald en het percentage van deze cellen die een intacte membraan hebben ('levende' cellen). Het totaal aantal cellen in het gedistribueerde drinkwater van de verschillende distributiesystemen is weergegeven in Figuur 3.12. De laagste celaantallen werden waargenomen in het gedistribueerde drinkwater van Breda en Almere, terwijl de hoogste celaantallen werden gemeten in het distributiesysteem van ps Berenplaat. De celaantallen in het gedistribueerde drinkwater van de overige distributiesystemen waren vergelijkbaar. De celaantallen in het gedistribueerde drinkwater van

Breda en Almere waren in de winter en zomer significant lager dan de celaantallen in het distributiesysteem van ps Scheveningen, ps Berenplaat, ps Andijk, Leeuwarden en ps Kralingen ($p < 0,01$; ANOVA met Bonferroni posthoc toets). In de zomer waren ook de celaantallen in het distributiesysteem van ps Weesperkarspel significant hoger dan de celaantallen in het gedistribueerde water van Breda en Almere.

Het percentage 'levende' cellen was hoog in het distributiesysteem van Leeuwarden, Breda, Almere en ps Scheveningen (alle hoger dan 90%) en in het distributiesysteem van ps Weesperkarspel ($> 80\%$). Een beduidend lager percentage 'levende' cellen werd waargenomen in het gedistribueerde water van ps Kralingen (53%), ps Berenplaat (29%) en ps Andijk (48%). Het verschil tussen deze drie pompstations en de rest is significant ($p < 0,01$; ANOVA met Bonferroni posthoc toets) en wordt veroorzaakt doordat het water van ps Kralingen, ps Berenplaat en ps Andijk een chloordioxidebehandeling ondergaat aan het einde van de waterbehandeling. Dit chloordioxide werkt desinfecterend en doodt een deel van de bacteriën.

3.4.2 Schimmels

Het aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels in het drinkwater van de acht distributiesystemen is weergegeven in Figuur 3.8. In de winter werden de hoogste aantallen 18S rRNA genkopieën gevonden in het gedistribueerde drinkwater van Leeuwarden en ps Andijk en deze aantallen waren significant hoger dan de aantallen in het distributiesysteem van Breda en ps Kralingen ($p < 0,01$; ANOVA met Bonferroni posthoc toets). In de zomer werden de meeste 18S rRNA genkopieën in het drinkwater van distributiesysteem ps Kralingen, Leeuwarden en ps Andijk gevonden. De laagste aantallen werden gevonden in het gedistribueerde water van Breda en ps Scheveningen. Deze aantallen waren significant lager dan de aantallen in het distributiesysteem van ps Kralingen. Het aantal 18S rRNA genkopieën in het distributiesysteem van Breda waren ook significant lager dan de aantallen in het distributiesysteem van Leeuwarden.

3.4.3 Mycobacterium spp.

In de winter verschilden de aantallen genkopieën van het *hsp65* gen van mycobacteriën onderling niet significant in het gedistribueerde drinkwater van de acht distributiesystemen (Figuur 3.9). In de zomer was het aantal genkopieën van het *hsp65* gen van *Mycobacterium* spp het hoogst in het gedistribueerde drinkwater van ps Kralingen en ps Berenplaat (Figuur 3.9). Deze aantallen in het distributiesysteem van ps Berenplaat waren significant hoger dan het aantal genkopieën in het distributiesysteem van Leeuwarden, Almere, Breda, ps Scheveningen en ps Weesperkarspel ($p < 0,01$; ANOVA met Bonferroni posthoc toets). In het distributiesysteem van Kralingen werden in de zomer aantallen genkopieën gemeten die significant hoger waren dan die in het distributiesysteem van Almere, Breda en ps Weesperkarspel. Tot slot was in de zomer het aantal *hsp65* genkopieën van *Mycobacterium* spp in het distributiesysteem van Almere significant lager dan in het distributiesysteem van ps Andijk en ps Scheveningen.

3.4.4 P. aeruginosa en S. maltophilia

P. aeruginosa en *S. maltophilia* werden slechts sporadisch waargenomen in het gedistribueerde drinkwater (Figuur 3.10 en Tabel 3.3), waardoor het lastig is om te bepalen of aantallen verschilden tussen de acht distributiesystemen. Het percentage positieve monsters voor het *regA* gen van *P. aeruginosa* was in de winter significant hoger in het gedistribueerde drinkwater van Leeuwarden dan in het drinkwater van de zeven andere distributiesystemen ($p < 0,01$; Kruskal-Wallis met Bonferroni posthoc toets). In de zomer was het aantal positieve

drinkwatermonsters voor *P. aeruginosa* niet significant verschillend tussen de acht distributiesystemen. In het distributiesysteem van Almere, ps Weesperkarspel en ps Andijk werd het *regA* gen van *P. aeruginosa* in geen van de onderzochte drinkwatermonsters aangetroffen.

In de winter waren alle geteste drinkwatermonsters negatief voor het *chitA* gen van *S. maltophilia*. In de zomer waren drinkwatermonsters van het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat het vaakst positief voor *S. maltophilia*. Alleen het percentage positieve drinkwatermonsters voor het *chitA* gen van *S. maltophilia* uit het distributiesysteem van ps Kralingen was significant hoger dan het percentage *S. maltophilia* positieve monsters van het distributiesysteem Breda, Almere en ps Andijk ($p < 0,01$; Kruskal-Wallis met Bonferroni posthoc toets). De onderzochte drinkwatermonsters uit het distributiesysteem van Breda, Almere en ps Andijk waren ook in de zomer negatief voor het *chitA* gen van *S. maltophilia*.

3.4.5 Gekweekte *Legionella* en *L. pneumophila*

Evenals voor *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* werden *Legionella* (mbv de kweekmethode) en het *mip* gen van *L. pneumophila* sporadisch waargenomen in het gedistribueerde drinkwater. Het hoogste percentage positieve monsters voor *Legionella* mbv de kweekmethode werd gevonden in de winter in het distributiesysteem van ps Kralingen (Tabel 3.5). Dit percentage is significant hoger dan het percentage positieve monsters voor *Legionella* in de zeven andere distributiesystemen ($p < 0,01$; Kruskal Wallis met Bonferroni posthoc toets). In de zomer werden geen significante verschillen waargenomen tussen de distributiesystemen voor het percentage drinkwatermonsters positief voor *Legionella* met de kweekmethode. Het hoogste aantal kve van *Legionella* ($1,2 \times 10^4$ kve l⁻¹) werd aangetroffen in een drinkwatermonster van het distributiesysteem van ps Kralingen. Het distributiesysteem van ps Scheveningen was het enige distributiesysteem waarin *Legionella* niet werd aangetroffen. De gekweekte legionellastammen werden getypeerd en geen van deze getypeerde stammen behoorde tot de soort *L. pneumophila*.

Tabel 3.5 Het aantal positieve drinkwatermonsters voor *Legionella* met de kweekmethode (NEN) en het minimum, maximum en geometrisch gemiddelde van het aantal kolonievormende eenheden (kve) van *Legionella* in water van zeven verschillende distributiesystemen. Monsters uit het distributiesysteem van Breda zijn niet ingezet op *Legionella*.

Distributiesysteem	% positieve monsters	Minimum	Legionella (kve l ⁻¹)	
			Maximum	Geom. gemiddelde
Leeuwarden winter	0,0 (0/10)	< 100	< 100	< 100
Leeuwarden zomer	11,1 (1/9)	< 100	500	< 100
Almere winter	16,7 (2/12)	< 100	500	< 100
Almere zomer	0,0 (0/12)	< 100	< 100	< 100
Scheveningen winter	0,0 (0/11)	< 100	< 100	< 100
Scheveningen zomer	0,0 (0/11)	< 100	< 100	< 100
Kralingen winter	54,5 (6/11)	< 100	3000	120
Kralingen zomer	18,2 (2/11)	< 100	$1,2 \times 10^4$	< 100
Berenplaat winter	15,4 (2/13)	< 100	200	< 100
Berenplaat zomer	15,4 (2/13)	< 100	600	< 100
Weesperkarspel winter	0,0 (0/13)	< 100	< 100	< 100
Weesperkarspel zomer	15,4 (2/13)	< 100	100	< 100
Andijk winter	7,7 (1/13)	< 100	150	< 100
Andijk zomer	7,7 (1/13)	< 100	100	< 100

In de winter was er tussen de distributiesystemen geen significant verschil voor het percentage drinkwatermonsters dat positief was voor het *mip* gen van *L. pneumophila*. In de zomer werd in het distributiesysteem van ps Berenplaat het hoogste percentage positieve drinkwatermonsters voor het *mip* gen van *L. pneumophila* waargenomen (Tabel 3.4). Dit percentage was significant hoger dan het percentage positieve monsters voor het *mip* gen van *L. pneumophila* bij de andere zeven distributiesystemen ($p < 0,01$; Kruskal Wallis), maar dit verschil wordt mogelijk veroorzaakt doordat in de zomer de binneninstallaties in het voorzieningsgebied van ps Berenplaat zijn bemonsterd. In het distributiesysteem van Breda, Almere en ps Scheveningen werd het *mip* gen van *L. pneumophila* niet aangetroffen in de winter en zomer van 2010.

3.5 Correlaties tussen opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen en microbiologische parameters

Er werd ook onderzocht of bepaalde microbiologische parameters onderling correleren. Bij deze analyses werden alleen de opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen meegenomen waarvan het aantal genkopieën in de drinkwatermonsters boven de detectielimiet lag (schimmels en *Mycobacterium* spp.). Voor de correlatieanalyse werden van elke parameter de gecombineerde gegevens van winter en zomer gebruikt en de gegevens van alleen de zomer. De resultaten van de correlatieanalyse zijn weergegeven in Tabel 3.6 en 3.7.

De resultaten van de correlatieanalyse met de gecombineerde gegevens van de winter en zomer laten zien dat alle berekende correlaties een significantieniveau lager dan 0,01 hebben, behalve de relatie tussen het aantal levende cellen en het aantal genkopieën van schimmels (Tabel 3.6). Het kwadraat van de correlatiecoëfficiënt (R^2) was echter in alle gevallen lager dan 0,3. De hoogste correlatiecoëfficiënt werd gevonden tussen het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas* en het aantal genkopieën van schimmels.

Tabel 3.6 De significantie en sterkte (R^2) van de correlaties tussen verschillende microbiologische parameters gemeten in de winter en zomer in acht verschillende distributiesystemen.

Parameter 1	Parameter 2	p-waarde	R^2
Kve van <i>Aeromonas</i> ^a	Genkopieën schimmels ^a	< 0,01	0,29
Aantal cellen ^a	Genkopieën <i>Mycobacterium</i> ^a	< 0,01	0,28
ATP	Aantal levende cellen ^a	< 0,01	0,23
ATP	Kve van <i>Aeromonas</i>	< 0,01	0,22
Aantal levende cellen	Kve van <i>Aeromonas</i>	< 0,01	0,19
ATP	Aantal cellen	< 0,01	0,16
Aantal levende cellen	Genkopieën <i>Mycobacterium</i>	< 0,01	0,15
ATP	Genkopieën <i>Mycobacterium</i>	< 0,01	0,15
Genkopieën schimmels	Genkopieën <i>Mycobacterium</i>	< 0,01	0,13
ATP	Genkopieën schimmels	< 0,01	0,10
Kve van <i>Aeromonas</i>	Genkopieën <i>Mycobacterium</i>	< 0,01	0,08
Aantal cellen	Kve van <i>Aeromonas</i>	< 0,01	0,06
Aantal cellen	Genkopieën schimmels	< 0,01	0,05
Aantal levende cellen	Genkopieën schimmels	> 0,01	0,03

^a Van deze parameters is de logaritmische waarde genomen in de correlatieanalyses

Tabel 3.7 De significantie en sterkte (R^2) van de correlaties tussen verschillende microbiologische parameters gemeten in de zomer in acht verschillende distributiesystemen.

Parameter 1	Parameter 2	p-waarde	R^2
ATP	Kve van <i>Aeromonas</i> ^a	< 0,01	0,38
Aantal cellen ^a	Genkopieën <i>Mycobacterium</i> ^a	< 0,01	0,35
ATP	Aantal levende cellen ^a	< 0,01	0,27
ATP	Aantal cellen	< 0,01	0,27
Aantal levende cellen	Kve van <i>Aeromonas</i>	< 0,01	0,27
Kve van <i>Aeromonas</i>	Genkopieën schimmels ^a	< 0,01	0,23
Aantal cellen	Kve van <i>Aeromonas</i>	< 0,01	0,23
Genkopieën schimmels	Genkopieën <i>Mycobacterium</i>	< 0,01	0,20
Aantal levende cellen	Genkopieën <i>Mycobacterium</i>	< 0,01	0,18
ATP	Genkopieën <i>Mycobacterium</i>	< 0,01	0,14
ATP	Genkopieën schimmels	< 0,01	0,13
Kve van <i>Aeromonas</i>	Genkopieën <i>Mycobacterium</i>	< 0,01	0,12
Aantal cellen	Genkopieën schimmels	> 0,01	0,06
Aantal levende cellen	Genkopieën schimmels	> 0,01	0,02

^a Van deze parameters is de logaritmische waarde genomen in de correlatieanalyses

De meeste relaties tussen de microbiologische parameters waren ook significant ($p < 0,01$) wanneer de gegevens van alleen de zomer werden gebruikt (Tabel 3.7). Uitzonderingen hierop waren de relatie tussen het aantal cellen en het aantal genkopieën van schimmels en het aantal levende cellen en het aantal genkopieën van schimmels. Het kwadraat van de correlatiecoëfficiënt was voor de meeste relaties iets hoger dan wanneer de gegevens van winter en zomer werden gebruikt, maar de R^2 lag nog altijd onder de 0,4. Dit betekent dat minder dan 40% van de variatie in de ene parameter verklaard kan worden met de andere parameter. De hoogste correlatiecoëfficiënt werd gevonden tussen de ATP-concentratie en het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas*.

Er werd ook achterhaald of watermonsters die positief waren voor een opportunistisch pathogeen ook positief waren voor een ander opportunistisch pathogeen micro-organisme in de verschillende distributiesystemen (Tabel 3.8). Omdat NTM en schimmels in alle drinkwatermonsters zijn aangetroffen, werden deze organismen niet betrokken bij de onderstaande beschrijving. Van de gedistribueerde drinkwatermonsters die positief waren voor *P. aeruginosa* was 25,0% ook positief voor een ander opportunistisch ziekteverwekkend micro-organisme. Het organisme dat het vaakst ook positief was in een *P. aeruginosa* positief drinkwatermonster, was *L. pneumophila*. Van de monsters positief voor *S. maltophilia* was 50,0% negatief voor een ander opportunistisch ziekteverwekkend micro-organisme. *L. pneumophila* werd het vaakst naast *S. maltophilia* aangetroffen in gedistribueerd drinkwater (50,0% van de *S. maltophilia* positieve monsters). Een deel (56,5%) van de monsters die positief waren voor *L. pneumophila*, was negatief voor andere opportunistische ziekteverwekkende organismen. *A. fumigatus* werd slechts in vier drinkwatermonsters aangetroffen en in deze drinkwatermonsters werden geen andere opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen aangetroffen. Deze resultaten laten zien dat de meeste drinkwatermonsters die positief waren voor een opportunistisch ziekteverwekkend micro-organisme ook tenminste één ander opportunistisch ziekteverwekkend micro-organisme bevatten, maar hierbij is geen duidelijke correlatie tussen twee specifieke opportunistisch ziekteverwekkende organismen waargenomen.

Tabel 3.8 Het percentage positieve drinkwatermonsters voor *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *L. pneumophila* en *A. fumigatus* en het percentage drinkwatermonsters dat ook positief is voor een tweede opportunistisch ziekteverwekkend organisme.

1 ^e Organisme	Positieve monsters	Tweede opportunistisch ziekteverwekkend organisme				
		<i>P. aer.</i>	<i>S. malt.</i>	<i>L. pneu.</i>	<i>A. fum.</i>	Alle ^a
<i>P. aeruginosa</i>	8,6%	100	18,8%	25,0%	0,0%	25,0%
<i>S. maltophilia</i>	9,7%	16,7%	100	50,0%	0,0%	50,0%
<i>L. pneumophila</i>	12,4%	17,4%	39,1%	100	0,0%	43,5%
<i>A. fumigatus</i>	2,2%	0,0%	0,0%	0,0%	100	0,0%

^a Met alle wordt bedoeld het aantal monsters dat ook positief is voor tenminste één ander opportunistisch ziekteverwekkend organisme.

4 Discussie

4.1 Opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater

4.1.1 Schimmels

De resultaten van deze meetcampagne hebben laten zien dat het 18S rRNA gen van schimmels in alle drinkwatermonsters werd aangetroffen. Onderzoek naar schimmels in drinkwater heeft tot nu toe voornamelijk plaatsgevonden met kweekmethoden. De resultaten van het kweken van schimmels uit drinkwater in enkele distributiesystemen van Vitens heeft laten zien dat schimmels uit de meeste drinkwatermonsters kon worden gekweekt (pers. comm. Bendert de Graaf, Vitens). In andere landen hebben onderzoekers ook het aantal kolonievormende eenheden van schimmels in drinkwater bepaald met behulp van kweekmethoden. De resultaten van die studies laten zien dat over het algemeen schimmels in 43 tot 70% van de gedistribueerde drinkwatermonsters werden aangetroffen (Anaissie et al., 2003; Frankova & Horecká, 1995; Pedro-Botet et al., 2007; Hinzelin & Block, 1985; Hageskal et al., 2006). Er waren echter ook enkele uitzonderingen. Zo was slechts 8% van de drinkwatermonsters positief voor schimmels met kweekmethoden in een Duitse studie (Göttlich et al., 2002), maar dit werd waarschijnlijk veroorzaakt doordat 100 tot 1000 keer minder volume werd ingezet op schimmels. In een Finse en Griekse studie werden schimmels vaker in het drinkwater aangetroffen (respectievelijk 86 en 95%) (Niemi et al., 1982; Arvanitidou et al., 1999), terwijl het geanalyseerde drinkwatervolume vergelijkbaar was met de studies die hierboven zijn genoemd. Het aantal kolonievormende eenheden van schimmels in buitenlands gedistribueerd drinkwater lag over het algemeen tussen de 1 en 500 kve l⁻¹ (Arvanitidou et al., 1999; Anaissie et al., 2003; Grabinska-Loniewska et al., 2007; Kanzler et al., 2007; Nagy & Olson, 1982; Niemi et al., 1982; Zacheus & Martikainen, 1995; Hinzelin & Block, 1985; Hageskal et al., 2006). In de studie beschreven in dit rapport zijn drinkwatermonsters vaker positief voor schimmels en is het aantal 18S rRNA genen van schimmels in drinkwater hoger dan het aantal kolonievormende eenheden die in de buitenlandse studies zijn gerapporteerd. Er zijn een aantal redenen te noemen voor dit verschil: (i) niet alle schimmelsoorten zijn kweekbaar, (ii) met de qPCR methode worden ook dode schimmelcellen gedetecteerd, (iii) schimmels zijn vaak niet als afzonderlijke cellen aanwezig waardoor meerdere schimmelcellen in een monster toch één kolonie vormen en (iv) het aantal 18S rRNA genen in een schimmelcel kan oplopen tot 100, waardoor het aantal schimmelcellen lager is dan het aantal 18S rRNA genkopieën.

Over het algemeen was het gemiddeld aantal 18S rRNA genkopieën 5 tot 25 keer hoger in het gedistribueerde drinkwater dan in het reinwater van het pompstation. Deze verschillen tussen reinwater en gedistribueerd drinkwater kunnen alleen worden verklaard door vermeerdering van schimmels tijdens distributie van het drinkwater. Onduidelijk is echter of deze vermeerdering optreedt in de biofilms aan de leidingwand of in het sediment dat in het distributiesysteem aanwezig is. Daarnaast is ook niet onderzocht of de soortensamenstelling van schimmels verandert tijdens distributie in het leidingnet. Aanvullend onderzoek kan op deze vragen een antwoord geven. In een eerdere studie werd ook waargenomen dat het aantal schimmels toenam in het distributiesysteem (Zacheus & Martikainen, 1995). Tevens is aangetoond dat sommige schimmelsoorten zich in drinkwater kunnen vermeerderen (Castellani et al., 1939). In het distributiesysteem van ps Weesperkarspel was het gemiddeld aantal 18S rRNA genkopieën in het gedistribueerde drinkwater drie keer lager dan in het reinwater. Uit het onderzoek is niet duidelijk geworden waardoor deze lagere aantallen in het distributiesysteem van ps Weesperkarspel worden veroorzaakt, maar er zijn een aantal

mogelijke verklaringen: (i) in het laatste zuiveringsproces van ps Weesperkarspel zijn relatief hoge aantallen schimmels aanwezig, (ii) de schimmelsoorten in het reinwater zijn andere dan die in het gedistribueerde drinkwater en hebben meer genkopieën in hun cel of (iii) een meetfout in het enkele reinwatermonster dat van ps Weesperkarspel is onderzocht. Overigens was het aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels in het drinkwater op twee locaties in het distributiesysteem van ps Weesperkarspel hoger dan het aantal in het reinwater.

De meetcampagne van 2010 was gericht op het kwantificeren van het aantal schimmels in drinkwatermonsters uit het distributiesysteem van verschillende pompstations. Het is echter onduidelijk wat de gezondheidkundige betekenis is van het aantreffen van 18S rRNA genkopieën van schimmels in alle onderzochte drinkwatermonsters. Een beperkte sequentieanalyse van 18s rRNA genen van schimmels heeft laten zien dat opportunistisch ziekteverwekkende schimmelsoorten in drinkwater aanwezig kunnen zijn (bv *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium cladosporioides* en *Aspergillus restrictus*) (Valster et al., 2010; van der Wielen et al., 2011b), maar onduidelijk blijft of drinkwaterstammen van deze ziekteverwekkende soorten ook ziekte bij patiënten veroorzaken. Daarnaast is onbekend hoeveel ziektegevallen er per jaar in Nederland zijn door *C. cladosporioides* en *A. restrictus*, maar de verwachting is dat het aantal ziektegevallen laag is (pers. comm. Sybren de Hoog, senior onderzoeker Centraalbureau voor Schimmelcultures). Ziektegevallen met *F. oxysporum* worden in Nederland regelmatig waargenomen (pers. comm. Paul Verweij, hoogleraar Medische Microbiologie, Radbouduniversiteit Nijmegen), en het is gesuggereerd dat er een epidemiologische link is tussen *F. oxysporum* in drinkwater en patiënten (Anaissie et al., 2001). Het is daarom aanbevelingswaardig om ook een specifieke qPCR-methode voor detectie van *F. oxysporum* in drinkwater beschikbaar te hebben. Ook in buitenlandse studies zijn schimmelsoorten waargenomen waarvan bekend is dat ze ziekte kunnen veroorzaken bij mensen (Pedro-Botet et al., 2007; Kanzler et al., 2007; Grabinska-Loniewska et al., 2007; Warris et al., 2001; Göttlich et al., 2002; Anaissie et al., 2003; Hageskal et al., 2006).

In de meeste distributiesystemen werd *A. fumigatus* niet aangetroffen, maar in drie drinkwatermonsters uit het distributiesysteem van ps Weesperkarspel werd het 28S rRNA gen van *A. fumigatus* aangetroffen in de zomer. Het percentage positieve drinkwatermonsters is lager dan in een buitenlandse studie werd gevonden, waar 33% van de gedistribueerde drinkwatermonsters positief was voor kweek van *A. fumigatus* (Anaissie et al., 2002). Die studie hanteerde echter een lagere detectiegrens en de aantallen *A. fumigatus* lagen in alle gevallen onder de detectiegrens van de qPCR-methode. In een andere Amerikaanse studie werd ook een qPCR-methode toegepast voor de detectie van *A. fumigatus* in drinkwater (Vesper et al., 2007). De resultaten van die studie lieten ook zien dat slechts een klein percentage (1,7%) van de monsters positief was voor *A. fumigatus*. *A. fumigatus* werd ook regelmatig aangetroffen in gedistribueerd drinkwater van andere Westerse landen (Hageskal et al., 2006; Anaissie et al., 2003; Göttlich et al., 2002; Warris et al., 2001; Grabinska-Loniewska et al., 2007).

Eerder onderzoek heeft laten zien dat drinkwaterstammen van *A. fumigatus* genotypisch, bepaald met de randomly amplified polymorphic DNA methode, overeenkwamen met *A. fumigatus* stammen die uit patiënten zijn geïsoleerd (Anaissie et al., 2002). Het is echter toch onduidelijk of de aangetroffen *A. fumigatus* stammen in het gedistribueerde drinkwater van ps Weesperkarspel ziekteverwekkend zijn. Aanvullend onderzoek waarin het genotype van drinkwaterstammen en patiëntstammen van *A. fumigatus* wordt geanalyseerd, is nodig om de gezondheidkundige betekenis van de aanwezigheid van schimmels en *A. fumigatus* in het Nederlandse drinkwater te kunnen duiden.

4.1.2 Mycobacteriën

Naast het 18S rRNA gen van schimmels werd ook het *Hsp65* gen van *Mycobacterium* spp. in alle drinkwatermonsters aangetroffen. In Nederland is weinig onderzoek gedaan naar het voorkomen van mycobacteriën in drinkwater. Eind jaren '70 van de vorige eeuw is het drinkwater in Rotterdam met kweekmethoden onderzocht op de aanwezigheid van *Mycobacterium (kansasii)* (Engel et al. 1980). In 61 van de 78 watermonsters die direct (zonder doorstroming) werden genomen aan de kraan, werd *Mycobacterium* aangetroffen; in 38 van deze 61 positieve drinkwatermonsters werd *M. kansasii* aangetroffen. In monsters uit het distributiesysteem werd *M. kansasii* slechts in één van de 112 geanalyseerde watermonsters gedetecteerd. Recent is een studie gepubliceerd waar met behulp van een kweekmethode drinkwatermonsters van een binnenhuisinstallatie in Utrecht en in Nijmegen werden onderzocht op aanwezigheid van mycobacteriën (van Ingen et al., 2010). De resultaten lieten zien dat mycobacteriën werden aangetroffen in drinkwatermonsters uit deze binneninstallaties. Het aantal kolonievormende eenheden per liter is in beide studies niet gerapporteerd (Engel et al., 1980; van Ingen et al., 2010), waardoor de gegevens uit deze studies zich moeilijk laten vergelijken met de resultaten van onze studie. Ander onderzoek heeft in ieder geval laten zien dat in het drinkwater van een Nederlands ziekenhuis een deel van de mycobacteriën wordt gemist wanneer alleen kweekmethoden worden toegepast (Hillerkamp-Haverkort et al., 1999).

In enkele andere landen (bv Verenigde Staten) is relatief veel onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van non-tuberculeuze mycobacteriën in drinkwater. Twaalf van de 32 drinkwatermonsters uit het distributiesysteem in Florida bleken met kweekmethoden positief voor *Mycobacterium* spp. (Pryor et al., 2004). Een studie naar het voorkomen van mycobacteriën in drinkwater uit het distributiesysteem en de binneninstallaties van ziekenhuizen verspreid over de Verenigde Staten laat zien dat mycobacteriën konden worden gekweekt uit 83% van de monsters (Carson et al., 1988). In andere Amerikaanse studies was een lager percentage (15 tot 35%) van de geanalyseerde drinkwatermonsters positief voor mycobacteriën (Covert et al., 1999; Falkinham et al. 2001). De aantallen mycobacteriën varieerden over het algemeen tussen de 2 en 40 kve l⁻¹ (Covert et al., 1999) of tussen de 10 en 7×10⁵ kve l⁻¹ (Falkinham et al., 2001). In Europa zijn studies verschenen over de aanwezigheid van mycobacteriën in het Duitse, Franse, Finse en Griekse drinkwater, waarbij een vergelijkbaar drinkwatervolume werd geanalyseerd (Fischeder et al., 1991; Le Dantec et al., 2002; Torvinen et al., 2004; Tsintzou et al., 2000; Hussein et al., 2009). In Duitsland, Frankrijk en Finland werden mycobacteriën met kweekmethoden aangetroffen in 72 tot 82% van de drinkwatermonsters uit het distributiesysteem; in Griekenland was dit percentage 21%. Het aantal mycobacteriën in het drinkwater lag hierbij over het algemeen tussen de 1 en 1000 kve l⁻¹. Het aantal positieve monsters en het aantal mycobacteriën in het gedistribueerde drinkwater van de acht onderzochte distributiesystemen in Nederland zijn meestal hoger dan in deze eerder gepubliceerde studies. Dit verschil wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het gebruik van andere detectiemethoden (qPCR vs kweek). De qPCR methode detecteert ook nietkweekbare mycobacteriën en DNA van inactieve mycobacteriecellen. Hussein et al. (2009) hebben gevonden dat mycobacteriën in 100% van de onderzochte Duitse drinkwatermonsters werd gedetecteerd, terwijl met de kweekmethode maar 62% van de monsters positief was. Daarnaast waren de aantallen met qPCR ongeveer 1000 keer hoger dan met de kweekmethode.

Het gemiddeld aantal *Hsp65* genkopieën in het gedistribueerde drinkwater was over het algemeen 1,5 tot 9 keer hoger in het gedistribueerde drinkwater dan in het reinwater en duidt erop dat in het distributiesysteem vermeerdering van mycobacteriën plaatsvindt. Ook in eerdere studies werd waargenomen dat mycobacteriën in staat zijn zich te vermeerderen in drinkwater of drinkwatergerelateerde biofilms (Engel et al., 1980; Carson et al., 1978; Carter et al., 2003; Kirschner et al., 1999; Hall-Stoodley et al., 1999; Williams et al., 2009). Het is

onduidelijk of de soortensamenstelling van *Mycobacterium* spp. ook verandert tijdens distributie van het water in het leidingnet. Onderzoek naar de gensequenties kan daar meer duidelijkheid over geven. In het distributiesysteem van Leeuwarden werden echter lagere aantallen Hsp65 genkopieën van *Mycobacterium* gevonden dan in het reinwater van ps Spannenburg. Het distributiesysteem van Leeuwarden wordt echter door twee pompstations gevoed (menggebied), waardoor het mogelijk is dat het gedistribueerde drinkwater ook afkomstig is geweest van een pompstation met lagere aantallen *Mycobacterium* in het reinwater.

In deze studie is maar beperkt onderzocht of ook ziekteverwekkende non-tuberculeuze *Mycobacterium*-soorten in het drinkwater aanwezig zijn. Met behulp van een specifieke qPCR methode voor *M. avium* is onderzocht of dit opportunistisch ziekteverwekkend organisme in drinkwater werd aangetroffen, maar in geen van de drinkwatermonsters werd *M. avium* aangetroffen. In overeenstemming met onze resultaten, werd *M. avium* ook niet aangetroffen in drinkwater van een binneninstallatie in Utrecht en Nijmegen met behulp van een specifieke kweekmethode voor NTM (van Ingen et al., 2010). In tegenstelling met deze resultaten, zijn resultaten van Amerikaanse studies waar *M. avium* met kweekmethoden regelmatig in drinkwater wordt aangetroffen (von Reijn et al., 1993; Aronson et al., 1999; Falkinham et al., 2001; Carson et al., 1988; Pryor et al., 2004). Feazel et al. (2009) gebruikten een vergelijkbare qPCR methode voor de detectie van *M. avium* in douchewater in Denver en New York. Een positief signaal voor *M. avium* werd in 13 van de 14 douchewatermonsters gevonden. Mogelijk dat het toepassen van chlooramine als desinfectant residu in het Amerikaanse drinkwater de reden is voor dit verschil. De meeste mycobacteriestammen (waaronder *M. avium*) zijn namelijk zeer resistent tegen chloor of chlooramine in het drinkwater. Naast *M. avium* zijn er nog een aantal *Mycobacterium*-soorten die ziekteverwekkend kunnen zijn voor mensen met een verzwakt immuunsysteem (van Ingen, 2009). In de hier beschreven studie is echter niet met een sequentieanalyse onderzocht tot welke soorten de mycobacteriën in het Nederlandse drinkwater behoren. Hierdoor blijft het vooralsnog onduidelijk of opportunistisch ziekteverwekkende *Mycobacterium*-soorten in drinkwater aanwezig zijn. In het verleden zijn ziekteverwekkende *Mycobacterium*-soorten echter wel aangetroffen in het Nederlandse drinkwater (Engel et al., 1980).

4.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

In vijf van de acht onderzochte distributiesystemen werd het *regA* gen van *P. aeruginosa* aangetroffen in het gedistribueerde drinkwater. In eerder onderzoek werden kweekbare *P. aeruginosa* bacteriën ook waargenomen in drinkwater (Lee et al., 2006; van der Kooij et al., 1982; Schubert & Blum, 1974; Schubert & Scheiber, 1975; Reitler & Seligman, 1957; Shehabi et al., 2005; Papapetropoulou et al., 1994). In Duitsland werd gevonden dat 16 van de 216 drinkwatermonsters uit het distributiesysteem positief waren voor *P. aeruginosa* (7,6%) met behulp van een kweekmethode (Schubert & Blum, 1974). De aantallen *P. aeruginosa* in de Duitse drinkwatermonsters lagen tussen de 10 en 1000 kve l⁻¹. Zowel het aantal positieve monsters en de aantallen *P. aeruginosa* in het Duitse drinkwater komen overeen met het aantal positieve monsters en de aantallen *P. aeruginosa* die in de Nederlandse distributiesystemen zijn gevonden met behulp van de qPCR-methode. In landen met een warmer klimaat (Togo, Israël en Jordanië) werden gekweekte *P. aeruginosa* bacteriën vaker aangetroffen in gedistribueerd drinkwater (24 tot 44% van de onderzochte watermonsters) (Schubert & Scheiber, 1975; Reitler & Seligman, 1957; Shehabi et al., 2005). Hierbij waren de aantallen *P. aeruginosa* in het Togolese drinkwater ook altijd hoger dan 1000 kve l⁻¹. In Griekenland, een ander land met een warmer klimaat, werd met kweekmethoden echter een lager percentage (9%) van gedistribueerd drinkwater positief gevonden voor *P. aeruginosa*, waarbij de aantallen rond de 70 kve l⁻¹ waren (Papapetropoulou et al., 1994).

Naast het detecteren van het *regA* gen van *P. aeruginosa* met een qPCR methode, werd ook onderzocht of *P. aeruginosa* met een selectief agarmedium kon worden gekweekt uit de watermonsters die in de zomer zijn genomen. In twee drinkwatermonsters uit het distributiesysteem van Almere werd *P. aeruginosa* gekweekt, maar werd het *regA* gen van *P. aeruginosa* niet aangetroffen. Het aantal kve van *P. aeruginosa* in het gedistribueerde drinkwater op de twee locaties in het distributiesysteem van Almere was echter lager dan de detectielimiet voor de qPCR-methode, waardoor het logisch is dat het *regA* gen van *P. aeruginosa* niet werd aangetroffen in deze drinkwatermonsters. De resultaten laten ook zien dat het aantal *regA* genkopieën van *P. aeruginosa* hoger was dan 200 kopieën l⁻¹ in enkele drinkwatermonsters uit het distributiesysteem van Breda, ps Berenplaat en ps Kralingen, maar dat het aantal kweekbare *P. aeruginosa* cellen lager was dan 10 kve l⁻¹. Dit verschil tussen kweek en PCR werd mogelijk veroorzaakt doordat niet alle *P. aeruginosa* stammen in drinkwater kweekbaar zijn op een selectief agarmedium of omdat het DNA van *P. aeruginosa* afkomstig was van dode cellen. Het verschil tussen de kweekmethode en qPCR methode kan worden bepaald met aanvullend onderzoek.

In het reinwater van de acht onderzochte pompstations werd het *regA* gen van *P. aeruginosa* niet aangetroffen. Dit resultaat impliceert dat *P. aeruginosa* zich heeft weten te vermeerderen in het distributiesysteem van een aantal pompstation. Deze vermeerdering in het distributiesysteem is volgens verwachting omdat in het verleden is aangetoond dat *P. aeruginosa* zich in drinkwater kan vermeerderen (van der Kooij et al., 1982). Tot slot geeft het onderzoek geen uitsluitsel of de aangetroffen *P. aeruginosa* bacteriën ziekteverwekkend zijn. Om die vraag te kunnen beantwoorden, dienen patiëntstammen van *P. aeruginosa* te worden vergeleken met drinkwaterstammen door gebruik te maken van (geno)typeringsmethoden.

4.1.4 *Stenotrophomonas maltophilia*

In de zomer werd in vijf van de acht distributiesystemen *S. maltophilia* in het gedistribueerde drinkwater waargenomen; het percentage positieve monsters varieerde tussen de 7 en 73%. Ook in andere studies werd *S. maltophilia* aangetroffen in drinkwater wanneer met algemene media heterotrofe bacteriën werden gekweekt uit gedistribueerde drinkwatermonsters (zie review van Rusin et al., 1997). Vanwege het ontbreken van een selectieve kweekmethode voor dit organisme, zijn kwantitatieve gegevens over *S. maltophilia* in drinkwater niet beschikbaar. In de onderzochte Nederlandse distributiesystemen werd *S. maltophilia* niet gedetecteerd in de winter en ook niet in het reinwater. Dit duidt erop dat groei van *S. maltophilia* in drinkwater optreedt, maar dat deze groei afhankelijk lijkt te zijn van de drinkwatertemperatuur. Resultaten van laboratoriumtesten met *S. maltophilia* in steriel flessenwater hebben aangetoond dat *S. maltophilia* in staat is zich te vermeerderen in flessenwater (Wilkinson & Kerr, 1998). Aanvullend onderzoek kan aantonen onder welke condities *S. maltophilia* in staat is te groeien in drinkwater.

De gezondheidkundige betekenis van de aanwezigheid van *S. maltophilia* in een aantal gedistribueerde drinkwatermonsters is onduidelijk. In het verleden is in het ziekenhuis van Nijmegen een kleine uitbraak geweest van *S. maltophilia* bij neonatale patiënten. Deze stam werd ook gekweekt uit het drinkwater van het ziekenhuis en met een genotyperingsmethode (RAPD) werd gevonden dat het genotype van de drinkwaterisolaat overeenkwam met het genotype van isolaten uit patiënten (Verweij et al., 1998). Uit deze studie is echter niet duidelijk geworden of de *S. maltophilia* stam afkomstig was uit het aangeleverde drinkwater of dat patiënten de kraan besmetten, waardoor de stam in het drinkwater terecht kwam.

4.1.5 Legionella en Legionella pneumophila

Met de qPCR-methode werd het *mip* gen van *L. pneumophila* sporadisch aangetroffen in een aantal drinkwatermonsters van het distributiesysteem van Leeuwarden, ps Kralingen, ps Berenplaat, ps Weesperkarspel en ps Andijk. Naast de qPCR-methode voor de detectie van *L. pneumophila* in drinkwater werd ook de kweekmethode (NEN 6265) ingezet op drinkwatermonsters van de distributiesystemen. Regelmatig werden kolonievormende eenheden van *Legionella* spp. waargenomen op het agarmedium, maar nadere bevestiging wees uit dat in alle gevallen *L. nonpneumophila* soorten waren gekweekt. Uit deze resultaten blijkt dus een discrepantie tussen de qPCR- en de kweekmethode voor *L. pneumophila*. Er zijn een aantal mogelijke oorzaken voor dit verschil: (i) niet alle *L. pneumophila* stammen in drinkwater waren kweekbaar op het selectieve agarmedium, (ii) het DNA van *L. pneumophila* was afkomstig van dode *L. pneumophila* cellen of (iii) de agarplaten werden overgroeid door *L. nonpneumophila* soorten, waardoor kweekbare *L. pneumophila* niet werd gedetecteerd. Aanvullend onderzoek, waarbij DNA van membraanbeschadigde *L. pneumophila* cellen ('dode' cellen) niet wordt vermenigvuldigd in de qPCR en een specifieke kweekmethode voor *L. pneumophila* (Veenendaal & van der Kooij, 2007) wordt gebruikt, kan deze problematiek ophelderen. Door de verschillen tussen de qPCR- en kweekmethode blijft de gezondheidskundige betekenis van het aantreffen van het *mip* gen van *L. pneumophila* onduidelijk. Daarnaast zijn ook niet alle *L. pneumophila* stammen ziekteverwekkend.

4.1.6 Dood vs levend

De aanwezigheid van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen is onderzocht door met een qPCR-methode het DNA van het organisme te detecteren en kwantificeren. Doordat filters van 0,45 µm zijn gebruikt voor filtratie van het drinkwater, was het DNA in ieder geval aanwezig in cellen of gebonden aan deeltjes groter dan 0,45 µm. Toch sluit deze aanpak niet uit dat het DNA afkomstig was van dode cellen die niet langer in staat zijn te groeien in het distributiesysteem of binneninstallatie. Omdat werd waargenomen dat het aantal genkopieën van schimmels en mycobacteriën toenam in het distributiesysteem, wordt geconcludeerd dat schimmels en mycobacteriën in staat zijn zich te vermeerderen in het distributiesysteem en kwam het DNA dus van levende cellen. Omdat het DNA van *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. fumigatus* en *L. pneumophila* sporadisch werd aangetroffen, is het onduidelijk of deze organismen zich vermeerderen in het distributiesysteem. Het DNA van deze organismen werd niet in het reinwatermonster van de acht onderzochte pompstations waargenomen. Dit kan een aanwijzing zijn dat vermeerdering van deze organismen in het distributiesysteem plaatsvindt. Het toepassen van stoffen die onderscheid kunnen maken tussen DNA van membraanintacte en van membraanbeschadigde cellen in de PCR-reactie, kan meer duidelijkheid verschaffen of het DNA afkomstig is van dode of levende cellen. Daarnaast zullen meer reinwatermonsters geanalyseerd moeten worden op het voorkomen van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen.

4.2 Effect van temperatuur

Het effect van de temperatuur op het voorkomen van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen werd op twee manieren onderzocht. Als eerste werden, op basis van historische gegevens, locaties in het leidingnet geïdentificeerd waar in voorgaande jaren hogere temperaturen werden gemeten (hotspotlocaties) dan op andere locaties in het leidingnet (referentielocaties). Daarnaast werden watermonsters in de winter en zomer geanalyseerd. Uit de resultaten bleek dat de watertemperatuur op de hotspotlocaties niet significant hoger was dan op de referentielocaties. Hieruit blijkt dat hogere drinkwatertemperaturen niet structureel op dezelfde locaties in het distributiesysteem voorkomen, maar dat de temperatuur wisselt tussen de verschillende monsternames. Waarschijnlijk is dat de tijd dat de kraan openstaat voordat het drinkwatermonster aan de kraan wordt genomen per keer verschillend is, dat een

effect kan hebben op de drinkwatertemperatuur. Het effect van de watertemperatuur op het voorkomen van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen kan daardoor alleen worden onderzocht op basis van de verschillen tussen winter en zomer.

De ATP-concentratie was alleen in het distributiesysteem van pompstations Scheveningen en Kralingen significant hoger in de zomer. Het is waarschijnlijk dat de hogere ATP-concentraties in de zomer in het distributiesysteem van ps Kralingen niet door de temperatuur werden veroorzaakt, maar door verschil in monsternamen. In de zomer was het monster namelijk uit de binneninstallatie (na de watermeter) afkomstig, terwijl in de winter het monster uit het distributiesysteem (voor de watermeter) kwam. In een eerdere studie werden ook niet in alle onderzochte distributiesystemen seizoensverschillen in ATP-concentraties waargenomen (van der Wielen & van der Kooij, 2009b). De resultaten laten in ieder geval zien dat ook bij drinkwatertemperaturen van 5 tot 10°C actieve biomassa in het drinkwater aanwezig is. Deze actieve biomassa is waarschijnlijk afkomstig van de biofilm die op de leidingwand en het sediment aanwezig is. Ook werd waargenomen dat de hoeveelheid biomassa (ATP en celaantallen) niet structureel hoger ligt op bepaalde locaties in het distributiesysteem, maar dat er per meetperiode verschillende locaties zijn met hogere ATP-concentraties en celaantallen. Dit werd ook waargenomen in een eerdere studie naar het ATP-gehalte in gedistribueerd drinkwater (van der Wielen & van der Kooij, 2009b). Deze verschillen per meetcampagne binnen een distributiesysteem laten zien dat het niet zinvol is om een enkele uitgebreide meetcampagne uit te voeren in het distributiesysteem om locaties te identificeren waar de microbiologische waterkwaliteit minder goed is, zoals onlangs werd voorgesteld in een workshop (Hammes, 2010).

Het *mip* gen van *L. pneumophila* werd zowel in de winter als zomer sporadisch aangetroffen in enkele distributiesystemen. Hierbij lijkt geen effect van temperatuur gevonden te zijn. Gezien de lage drinkwatertemperatuur in de winter was het aantreffen van *L. pneumophila* onverwacht. In een eerder onderzoek is namelijk waargenomen dat *L. pneumophila* voornamelijk in biofilms groeit wanneer de drinkwatertemperatuur 25°C of hoger is (van der Kooij et al., 2009). Ook in de zomer was de drinkwatertemperatuur over het algemeen lager dan 25°C, waardoor het aantreffen van het *mip* gen van *L. pneumophila* onverwacht was. Het is daarom waarschijnlijker dat, ondanks het lange doorstromen van de kraan voordat het drinkwatermonster is genomen, de aangetroffen *L. pneumophila* niet afkomstig waren uit het distributiesysteem, maar uit de biofilm op leidingen van de binneninstallatie, waar lokaal hogere temperaturen kunnen optreden. Hierdoor kan ook niet worden uitgesloten dat andere opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen die werden aangetroffen in het gedistribueerde drinkwater afkomstig zijn uit biofilms op leidingen van de binneninstallatie. Eventuele bemonstering op brandkranen kan hier in de toekomst duidelijkheid over scheppen.

Het aantal *Hsp65* genkopieën van mycobacteriën en het aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels was in zes van de acht distributiesystemen niet significant verschillend tussen de winter en zomer, terwijl in alle distributiesystemen de watertemperatuur beduidend lager was in de winter. Ondanks het ontbreken van een seizoensinvloed op de aantallen mycobacteriën en schimmels in drinkwater, zijn mycobacteriën en schimmels wel actief in het drinkwater aangezien ze zich in het distributiesysteem vermeerderen. De aantallen mycobacteriën en schimmels in het distributiesysteem waren immers hoger dan in het reine water. De verwachting is dat in de winter *Mycobacterium*- en schimmelsoorten aanwezig zullen zijn die beter zijn aangepast aan lagere temperaturen, terwijl in de zomer waarschijnlijk soorten domineren die in staat zijn te groeien bij mesofiele temperaturen (15 tot 20°C). Door de sequenties van het *Hsp65* gen van *Mycobacterium* en het 18S rRNA gen van schimmels te analyseren, kan worden onderzocht of deze hypothese klopt.

In een eerder onderzoek in de Verenigde Staten werd ook geen seizoenseffect op het aantal mycobacteriën gevonden, maar de drinkwatertemperatuur werd niet bepaald in die studie (Falkinham et al., 2001). Ook in Frankrijk werd geen effect waargenomen van de drinkwatertemperatuur (die varieerde tussen 8 en 22°C) op het aantal monsters dat positief was voor mycobacteriën (Le Dantec et al., 2002). De resultaten van een studie naar de aanwezigheid van schimmels in gedistribueerd drinkwater in Noorwegen lieten ook zien dat er geen seizoensvariatie was op het aantal schimmels in gedistribueerd drinkwater (Hageskal et al. 2007). In een studie van Nagy & Olson (1982) werd waargenomen dat in de zomer het aantal kolonievormende eenheden van schimmels in niet gechloreerd drinkwater 1,5 tot 2 keer hoger was dan in de winter, maar het is onduidelijk of deze verschillen statistisch significant waren. De temperatuurvariatie tussen winter en zomer was echter klein (minimumwaarde 16,0°C, maximum waarde 23,0°C).

De hogere drinkwatertemperatuur in de zomer lijkt dus geen effect te hebben op het aantal mycobacteriën en schimmels in het gedistribueerde drinkwater. In de distributiesystemen van ps Kralingen en ps Berenplaat werden echter wel significant hogere *Mycobacterium*-aantallen waargenomen in de zomer. Ook het aantal schimmels was hoger in de zomer dan winter in het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat. Bij ps Kralingen waren deze verschillen in schimmels statistisch significant, maar niet bij ps Berenplaat vanwege de hoge variatie. De hogere aantallen mycobacteriën en schimmels in de zomer in het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat worden verklaard doordat in de zomer de drinkwatermonsters uit de distributiesystemen van ps Kralingen en ps Berenplaat werden genomen direct na openen van de tap (monster van binneninstallatie), terwijl in de winter de drinkwatermonsters werden genomen na doorstroming totdat de temperatuur van het water constant was geworden (monster van het distributiesysteem). In dat geval zijn de hogere aantallen mycobacteriën en schimmels in de zomer niet door de hogere temperatuur veroorzaakt, maar door het bemonsteren van de binneninstallatie. Deze resultaten laten dus tevens zien dat mycobacteriën en schimmels in staat zijn zich te vermeerderen in de binneninstallatie. Andere studies hebben ook laten zien dat *Mycobacterium* en schimmelsoorten in staat zijn te groeien in de binneninstallatie (Feazel et al., 2009; Engel et al., 1980; Carson et al., 1988; Gottlich et al., 2002; Hageskal et al., 2007). Het blijft onduidelijk welke factoren deze toename veroorzaken, maar mogelijk dat de veranderende oppervlakte/volumeverhouding, leidingmateriaal of temperatuur hier een rol bij speelt. Eerder onderzoek heeft laten zien dat in biofilms op leidingmaterialen, die ruime tijd in contact hebben gestaan met drinkwater (4 weken tot 12 jaar), hogere aantallen mycobacteriën werden gevonden op rubber, silicone, PE en PVC dan op glas en koper (Schulze-Robbecke et al., 1992). In aanvullend onderzoek kan de rol van deze factoren op de aantallen opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater worden onderzocht.

Hoewel in de meeste distributiesystemen geen verschil in aantallen *Mycobacterium* of schimmels tussen winter en zomer werd waargenomen, was in het distributiesysteem van ps Weesperkarspel het aantal schimmels wel significant hoger in de zomer dan in de winter. De hogere temperatuur in de zomer zou hier dus verantwoordelijk voor kunnen zijn, hoewel de drinkwatertemperatuur in het distributiesysteem van ps Weesperkarspel niet hoger was dan in het distributiesysteem van andere pompstations. Blijkbaar spelen naast temperatuur ook andere factoren hierbij een rol. Het was opvallend dat in de zomer het aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels hoger was in het reinwater van ps Weesperkarspel dan in drinkwater uit het distributiesysteem. De hoge aantallen schimmels in het gedistribueerde drinkwater van ps Weesperkarspel in de zomer van 2010 hangen daardoor mogelijk samen met de hoge aantallen schimmels die in het reinwater aanwezig waren. Het reinwater van ps

Weesperkarspel is echter maar één keer geanalyseerd. Het bemonsteren en bepalen van het aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels in het reinwater van ps Weesperkarspel tijdens verschillende seizoenen kan hier meer duidelijkheid over geven.

Het effect van temperatuur op *M. avium*, *A. fumigatus*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* en *Acanthamoeba* is lastiger te achterhalen met de resultaten van het onderzoek, omdat deze organismen niet of sporadisch werden aangetroffen in het gedistribueerde drinkwater. Wel was opvallend dat *A. fumigatus* en *S. maltophilia* alleen in de zomer in het gedistribueerde drinkwater zijn gedetecteerd. Dit zou er op kunnen duiden dat de temperatuur een relatie heeft met het voorkomen van deze organismen. Overigens waren de locaties binnen een distributiesysteem waar het *chitA* gen van *S. maltophilia* werd aangetroffen, niet locaties waar de drinkwatertemperatuur beduidend hoger lag dan op locaties waar het *chitA* gen van *S. maltophilia* niet werd aangetroffen. Dit toont aan dat naast de temperatuur ook andere factoren verantwoordelijk zijn voor de hogere aantallen *S. maltophilia* in de zomer. De hoogste aantallen *chitA* genkopieën van *S. maltophilia* werden in de zomer waargenomen in het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat (Tabel 3.4). Blijkbaar vindt vermeerdering van *S. maltophilia* in drinkwatergerelateerde biofilms dus ook in de binneninstallatie plaats.

De zomer van 2010 was niet uitzonderlijk warm en ook ten tijde van de meetcampagne in augustus/september was het niet buitengewoon warm. De drinkwatertemperatuur op de monsterlocaties in de zomer was daardoor in 85,6% van de gevallen lager dan 20°C en op geen enkele locatie werd een drinkwatertemperatuur van boven de 22°C gemeten. De relatief lage drinkwatertemperatuur in de zomer kan de reden zijn waarom de opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen *M. avium*, *Acanthamoeba*, *A. fumigatus*, *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* niet of sporadisch werden waargenomen en de aantallen mycobacteriën en schimmels niet significant hoger waren in de zomer. Het is daarom raadzaam om de meetcampagne van enkele distributiesystemen te herhalen wanneer de drinkwatertemperatuur door een langdurige warme zomer rond de 25°C is.

In een eerdere studie werd waargenomen dat het aantal drinkwatermonsters van een ziekenhuis in Noorwegen (Oslo) waarin *A. fumigatus* werd aangetroffen lager lag in de zomer (juni t/m augustus) dan in de winter (december t/m februari) (Warris et al., 2001). Deze resultaten zijn dus tegenovergesteld met de resultaten die werden gevonden in het distributiesysteem van Weesperkarspel, maar in de Noorse studie werd *A. fumigatus* bepaald met een algemeen medium voor schimmels. De groei van andere schimmels op deze kweekmedia hebben *A. fumigatus* mogelijk overgroeid en de resultaten dus waarschijnlijk beïnvloed. Daarnaast is de drinkwatertemperatuur niet gemeten in de Noorse studie en het is mogelijk dat de verwarming in de winter het drinkwater van de binneninstallatie van het ziekenhuis heeft opgewarmd. In een andere studie is beschreven dat drinkwatermonsters uit Togo en Israël (landen met een warm klimaat) vaker positief zijn voor *P. aeruginosa* dan drinkwatermonsters uit Midden-Europa (landen met gematigd klimaat) (Schubert & Scheiber, 1975; Reitler & Seligmann, 1957). Naast deze studies, zijn geen andere studies in de literatuur gevonden waar het effect is onderzocht van de temperatuur op groei en/of voorkomen van deze opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater. Met behulp van onderzoek onder laboratoriumcondities in batchcultures en (boiler) biofilmmonitoren kan het effect van temperatuur op groei van deze organismen in drinkwatergerelateerde biofilms worden bepaald.

Tabel 4.1 De gemiddelde temperatuur van het gedistribueerde drinkwater in de winter en zomer en het temperatuurverschil in het gedistribueerde drinkwater tussen winter en zomer bij acht distributiesystemen.

Distributiesysteem	Drinkwatertemperatuur (°C)		
	Winter	Zomer	Vershil
Leeuwarden	5,9	19,4	13,6
Breda	8,2	18,4	10,1
Almere	9,0	17,7	8,7
Scheveningen	9,0	17,8	8,8
Kralingen	6,6	19,2	12,5
Berenplaat	5,6	20,4	14,8
Weesperkarspel	5,3	18,6	13,2
Andijk	8,0	18,0	10,0

Een belangrijke aanleiding voor het onderzoek naar het voorkomen van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen is de verwachte opwarming van het distributiesysteem in de toekomst door klimaatverandering. Hoewel de zomer van 2010 niet uitzonderlijk warm was, was het verschil in de gemiddelde temperatuur van het drinkwater tussen de winter en zomer 8,7 tot 14,8°C bij de acht onderzochte distributiesystemen (Tabel 4.1). Ondanks deze substantiële temperatuurverschillen werd geen effect op het aantal genkopieën van schimmels, mycobacteriën, *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* waargenomen. Omdat de aantallen schimmels, mycobacteriën, *P. aeruginosa* en *L. pneumophila* niet verschillen tussen winter en zomer, kan worden gedacht dat een eventuele verdere temperatuurstijging door opwarming weinig invloed zal hebben op het aantal opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in het distributiesysteem. Doordat de zomer van 2010 niet uitzonderlijk warm was, kan echter geen uitspraak worden gedaan over de effecten van temperaturen in het traject 20 tot 30°C op het voorkomen van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in gedistribueerd drinkwater. Voor een aantal opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen geldt dat die juist pas in staat zijn te groeien bij temperaturen boven de 20 of 25°C. Daarom is ook de verwachting dat in het temperatuurtraject van 20 tot 30°C de grootste effecten zijn te verwachten op het wel of niet aantreffen van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in gedistribueerd drinkwater. Het is onzeker of de zomers van 2011 of 2012 warm genoeg zijn om dergelijke temperaturen in het leidingnet te halen. Bijgevolg kan het effect van temperaturen tussen de 20 en 30°C op groei van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in biofilmgerelateerde drinkwatermilieus beter worden onderzocht onder gecontroleerde laboratoriumcondities, waarbij elke gewenste drinkwatertemperatuur kan worden ingesteld en gecontroleerd. Voor schimmels en mycobacteriën geldt tevens dat in de zomer mogelijk andere soorten deel uit maken van de populatie in het drinkwater dan in de winter. Aanvullend onderzoek naar de DNA-sequenties van het 18S rRNA gen van schimmels en het Hsp65 gen van mycobacteriën kan eventuele seizoensverschillen in de populatiesamenstelling laten zien.

4.3 Effect van watersamenstelling

De celaantallen in het drinkwater van de meeste pompstations komen overeen met het ATP-gehalte in het gedistribueerde drinkwater (Figuur 3.9). Een uitzondering hierop is het gedistribueerde drinkwater van ps Scheveningen. Het hoge aantal cellen in het gedistribueerde drinkwater van ps Scheveningen is opvallend en deze aantallen zijn in tegenspraak met de lage ATP-concentratie die werd gemeten in de drinkwatermonsters uit het distributiesysteem van ps Scheveningen. Uit eerder

onderzoek is bekend dat de TOC-concentratie, het AOC-gehalte en de BVS-waarde bij ps Scheveningen relatief laag zijn, waardoor een lage biomassaconcentratie in het gedistribueerde drinkwater van ps Scheveningen wordt verwacht. Evenals de ATP-concentratie was ook het geometrisch gemiddelde van *Aeromonas* bij 30°C in de zomer in het distributiesysteem van ps Scheveningen beduidend lager (7,0 kve 100 ml⁻¹) dan in het distributiesysteem van ps Berenplaat (83,0 kve 100 ml⁻¹), ps Weesperkarspel (46,9 kve 100 ml⁻¹), ps Andijk (1066 kve 100 ml⁻¹) en Leeuwarden (572 kve 100 ml⁻¹). Relatief hoge celaantallen in het drinkwater van ps Scheveningen werden voorheen ook met microscopische tellingen waargenomen, waarbij opviel dat deze cellen een kleinere afmeting hadden dan wat doorgaans wordt waargenomen in drinkwater (persoonlijke communicatie Dick van der Kooij). De relatief hoge celaantallen in combinatie met lage ATP-concentraties in het gedistribueerde drinkwater van ps Scheveningen betekenen dat de hoeveelheid ATP per cel relatief laag is in het gedistribueerde drinkwater van ps Scheveningen. Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat de ATP-concentratie van het drinkwater een betrouwbaardere parameter is voor de hoeveelheid actieve biomassa in (gedistribueerd) drinkwater dan het aantal cellen bepaald met flowcytometrie of microscopie.

Het aantal kopieën van het *Hsp65* gen van mycobacteriën was in de winter niet significant verschillend tussen de verschillende distributiesystemen. Dit betekent dat het verschil in grondstof (oppervlaktewater/ grondwater) en mate van nagroei (hoog/ laag) in de winter geen effect heeft gehad op de aantallen mycobacteriën in het gedistribueerde drinkwater. In de zomer waren de aantallen mycobacteriën in het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat significant hoger dan in het distributiesysteem van enkele andere onderzochte pompstations. Deze verschillen zijn echter veroorzaakt doordat drinkwatermonsters van het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat uit de binneninstallaties van de gebouwen kwamen, in tegenstelling tot de drinkwatermonsters van de andere distributiesystemen. In de zomer was ook het aantal mycobacteriën in het distributiesysteem van Almere significant lager dan in het distributiesysteem van ps Andijk en ps Scheveningen. Het drinkwater in het distributiesysteem van Almere heeft een lage mate van nagroei, terwijl het gedistribueerde drinkwater van ps Andijk een hoge mate van nagroei heeft. Deze verschillen verklaren waarschijnlijk de significante hogere aantallen van mycobacteriën in het distributiesysteem van ps Andijk. Het gedistribueerde drinkwater van ps Scheveningen heeft echter ook een lage mate van nagroei, waardoor onduidelijk is waarom de mycobacterieaantallen in het distributiesysteem van ps Scheveningen significant hoger waren dan in het distributiesysteem van Almere.

In een Amerikaanse en Finse studie zijn vergelijkbare resultaten gevonden, aangezien het aantal gekweekte mycobacteriën niet hoger was in drinkwater met een hoog AOC-gehalte (~ 170 tot 220 µg C l⁻¹) dan in drinkwater met een laag AOC-gehalte (~ 20 tot 40 µg C l⁻¹) (Falkinham et al., 2001; Torvinen et al., 2004). Het AOC-gehalte in deze Amerikaanse en Finse studie was echter beduidend hoger dan de AOC-concentratie die wordt gemeten in het gedistribueerde drinkwater in Nederland (Tabel 3.6), maar onze resultaten laten zien dat ook bij lagere AOC-gehalten er geen duidelijke effecten zijn op het aantal mycobacteriën in drinkwater. Blijkbaar zijn mycobacteriën bij zeer lage AOC-concentraties al in staat zich te vermeerderen in drinkwater. Uit deze studies blijft onduidelijk welke factoren een rol spelen bij groei van (opportunistisch ziekteverwekkende) mycobacteriën in drinkwater en aanvullend onderzoek is daarom wenselijk.

Het aantal schimmels in het gedistribueerde drinkwater was in de winter en zomer significant hoger in het distributiesysteem van Leeuwarden dan van Breda. Ook in het distributiesysteem van Almere waren de schimmelaantallen lager dan in Leeuwarden, maar door de hoge standaarddeviatie waren deze verschillen niet significant. Deze drie distributiesystemen worden gevoed met drinkwater bereid uit grondwater. Het distributiesysteem van Leeuwarden wordt echter gevoed met drinkwater met een relatief hoge mate van nagroei en BVS-waarde, terwijl het distributiesysteem van Breda en Almere worden gevoed met drinkwater met een lage mate van nagroei. Het verschil in mate van nagroei duidt erop dat in het distributiesysteem van Leeuwarden meer afbreekbare stoffen aanwezig zijn dan in de distributiesystemen van Breda en Almere. Dit verschil in afbreekbare stoffen verklaart waarschijnlijk de hogere schimmelaantallen in het distributiesysteem van Leeuwarden. Het aantal schimmels in het gedistribueerde drinkwater van ps Andijk was ook hoger dan van ps Scheveningen. Ook in het drinkwater van ps Andijk komen meer afbreekbare stoffen voor dan in het drinkwater van ps Scheveningen. Hoewel het verschil in het aantal schimmels tussen ps Andijk en ps Scheveningen niet significant was, duiden de hogere aantallen in het gedistribueerde drinkwater van ps Andijk er wel op dat ook hier de hoeveelheid afbreekbare stoffen en/of biomassa in het drinkwater de aantallen schimmels beïnvloedt. Er zijn geen andere studies gevonden waarin het aantal schimmels werd vergeleken tussen drinkwater met verschillende hoeveelheden biologisch afbreekbaar materiaal. Wel is in sommige studies gerapporteerd dat het aantal kweekbare schimmels in drinkwater positief correleerde met het aantal kweekbare heterotrofe bacteriën (Arvanitidou et al., 1999) of troebelheid (Nagy & Olson, 1982). Maar in andere studies werd geen correlatie tussen kweekbare heterotrofe bacteriën en schimmels waargenomen (Gottlich et al., 2002; Nagy & Olson, 1982). Aanvullend onderzoek is daarom wenselijk naar welke factoren in het drinkwater de groei van (opportunistisch ziekteverwekkende) schimmels beïnvloeden.

P. aeruginosa en *S. maltophilia* werden sporadisch aangetroffen in drinkwatermonsters uit het distributiesysteem van de meeste onderzochte pompstations. Deze organismen werden aangetroffen in drinkwater met een hoge en lage mate van nagroei. Uit deze studie is dus niet duidelijk naar voren gekomen of de aantallen *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* worden beïnvloed door de hoeveelheid biologisch afbreekbare stoffen in het gedistribueerde drinkwater, maar dat kan komen doordat beide organismen slechts sporadisch zijn aangetroffen. Laboratoriumexperimenten hebben laten zien dat een *P. aeruginosa* stam in staat was te groeien bij lage concentraties organisch koolstof ($25 \mu\text{g C l}^{-1}$) in drinkwater (van der Kooij et al., 1982), maar het is onduidelijk bij welke concentraties organisch koolstof de groei van *P. aeruginosa* in drinkwater of biofilms niet meer optreedt. Daarnaast is gevonden dat *P. aeruginosa* concurreert met *P. fluorescens* in drinkwater, waarbij de temperatuur een belangrijke rol speelt. Bij temperaturen boven de 25°C gaat *P. aeruginosa* in plaats van *P. fluorescens* groeien (persoonlijke communicatie van der Kooij). Er zijn geen studies gevonden waar het effect van diverse factoren op de groei van *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* in drinkwater is onderzocht, waardoor aanvullend onderzoek wenselijk is.

4.4 Relatie tussen microbiologische parameters

Globaal laten de correlatieanalyses voor mycobacteriën en schimmels zien dat de meeste correlaties tussen microbiologische parameters wel significant zijn, maar dat het verband tussen de verschillende microbiologische parameters zeer zwak is. Het lijkt er dus op dat niet dezelfde factoren verantwoordelijk zijn voor een toe- of afname van de totale (actieve) biomassa en de aantallen *Aeromonas*, *Mycobacterium* en schimmels in gedistribueerd

drinkwater. Ook werd niet waargenomen dat in sommige drinkwatermonsters veel verschillende opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen aanwezig waren. Er zijn dus geen locaties in het distributiesysteem waar de problemen met opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen zich concentreren. Het is aannemelijk dat meerdere en/of andere factoren de groei van de verschillende opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen beïnvloeden. De invloeden van verschillende factoren op groei in drinkwater zijn het beste te achterhalen wanneer onder gecontroleerde laboratoriumcondities het effect van verschillende factoren op groei van verschillende opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater en biofilms wordt onderzocht.

5 Conclusies

5.1 Temperatuur

- 2010 was geen uitzonderlijk warm jaar waardoor het niet mogelijk was om het effect van hoge drinkwatertemperaturen (> 20°C) op het voorkomen van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen te bestuderen;
- Er werden geen locaties in het distributiesysteem aangetroffen (zogenoemde 'hotspots') waar de temperatuur structureel hoger ligt dan op andere locaties in het leidingnet;
- De stadsverwarming in de onderzochte wijk van Leeuwarden, Almere en Breda heeft geen invloed gehad op de drinkwatertemperatuur;
- Over het algemeen had het seizoen geen invloed op het ATP-gehalte in het distributiesysteem;
- De invloed van temperatuur op groei/voorkomen van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen kan niet worden onderzocht met inventariserend onderzoek in distributiesystemen in de praktijk.

5.2 Opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen

5.2.1 Schimmels en *Aspergillus fumigatus*

- Het 18S rRNA gen van schimmels komt algemeen voor in het Nederlandse drinkwater bereid met oppervlaktewater of grondwater;
- Schimmels zijn in staat zich te vermeerderen tijdens distributie van het drinkwater in het leidingnet;
- Het temperatuurverschil tussen de winter en zomer had alleen invloed op het aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels in het voorzieningsgebied van ps Weesperkarspel, in de andere voorzieningsgebieden niet, dus het temperatuurverschil alleen veroorzaakt geen hogere aantallen schimmels in het gedistribueerde drinkwater;
- De mate van nagroei in het gedistribueerde drinkwater lijkt het aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels in drinkwater te beïnvloeden. De hoogste aantallen genkopieën werden waargenomen in gedistribueerd drinkwater met een relatief hoge ATP-concentratie, terwijl de laagste aantallen werden waargenomen in gedistribueerd drinkwater met een relatief lage ATP-concentratie;
- In de binneninstallatie van gebouwen in het voorzieningsgebied van ps Kralingen en ps Berenplaat vindt vermeerdering van schimmels plaats;
- In het gedistribueerde drinkwater van ps Weesperkarspel is in de zomer het 28S rRNA gen van *A. fumigatus* aangetroffen; in de andere zeven distributiesystemen was het aantal *A. fumigatus* lager dan 4 cellen per liter. Er zijn dus omstandigheden in de zuivering, het voorzieningsgebied en/of het gedistribueerde water van ps Weesperkarspel die gunstig zijn voor *A. fumigatus*; deze omstandigheden zijn niet aanwezig bij de andere pompstations;
- Het aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels in gedistribueerd drinkwater is niet direct lineair gerelateerd aan ATP, het aantal bacteriecellen, KG22 of het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas*;
- De gezondheidskundige betekenis van de aanwezigheid van DNA van schimmels en *A. fumigatus* in het drinkwater is onduidelijk.

5.2.2 Mycobacteriën en *Mycobacterium avium*

- Het *Hsp65* gen van mycobacteriën komt algemeen voor in het Nederlandse drinkwater bereid met oppervlaktewater of grondwater;

- Mycobacteriën zijn in staat zich te vermeerderen tijdens distributie van het drinkwater in het leidingnet;
- Het temperatuurverschil tussen de winter en zomer van 2010 had geen invloed op het aantal *Hsp65* genkopieën van mycobacteriën in het gedistribueerde drinkwater van acht voorzieningsgebieden, dus (verschillende) mycobacteriesoorten zijn waarschijnlijk in staat te groeien bij hoge en lage temperaturen;
- De ATP-concentratie in het gedistribueerde drinkwater heeft geen invloed op het aantal *Hsp65* genkopieën van mycobacteriën in het gedistribueerde drinkwater in Nederland;
- In de binneninstallatie van gebouwen in het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat vindt vermeerdering van mycobacteriën plaats;
- Het aantal 16s rRNA genkopieën van *M. avium* in het drinkwater uit acht distributiesystemen was lager dan 200 per liter. In de binneninstallaties van gebouwen in het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat werd *M. avium* ook niet aangetroffen.
- Het aantal *Hsp65* genkopieën van mycobacteriën in gedistribueerd drinkwater is niet gerelateerd aan ATP, het aantal bacteriecellen, KG22 of het aantal kolonievormende eenheden van *Aeromonas*;
- De gezondheidskundige betekenis van de aanwezigheid van DNA van mycobacteriën in drinkwater is onduidelijk.

5.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

- Het *regA* gen van *P. aeruginosa* komt sporadisch voor in het gedistribueerde Nederlandse drinkwater bereid met grondwater of oppervlaktewater;
- Het *regA* gen van *P. aeruginosa* werd niet aangetroffen in de reinwatermonsters. Dit duidt erop dat het organisme in staat is zich te vermeerderen in het distributiesysteem;
- De binneninstallatie van gebouwen in het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat lijkt geen invloed te hebben op groei van *P. aeruginosa* in het water;
- In 2010 had het seizoen (winter of zomer) geen effect op het aantreffen van het *regA* gen van *P. aeruginosa* in het gedistribueerde drinkwater, dus de aanwezigheid van het *regA* gen van *P. aeruginosa* in drinkwater wordt tot een temperatuur van circa 20°C niet beïnvloed;
- De ATP-concentratie in het gedistribueerde drinkwater heeft geen invloed op het aantal *regA* genkopieën van *P. aeruginosa* in het gedistribueerde drinkwater in Nederland;
- Het aangetroffen DNA van *P. aeruginosa* kwam niet van cellen die in staat waren te groeien op een selectief agarmedium voor *P. aeruginosa*. Waarschijnlijk komt dit omdat de cellen van nietkweekbare stammen kwamen of omdat de cellen niet levensvatbaar waren;
- De gezondheidskundige betekenis van de aanwezigheid van DNA van *P. aeruginosa* in het gedistribueerde drinkwater is onduidelijk.

5.2.4 *Stenotrophomonas maltophilia*

- Het *chitA* gen van *S. maltophilia* komt sporadisch voor in het gedistribueerde Nederlandse drinkwater bereid uit grondwater of oppervlaktewater;
- Het aantreffen van het *chitA* gen van *S. maltophilia* in het gedistribueerde drinkwater was in 2010 seizoensafhankelijk; in de winter werd het *chitA* gen van *S. maltophilia* niet gedetecteerd in de acht onderzochte distributiesystemen, terwijl in de zomer het *chitA* gen van *S. maltophilia* sporadisch werd gedetecteerd in gedistribueerd drinkwater. De toename van de drinkwatertemperatuur tot circa 20°C in de zomer resulteert dus in hogere aantallen *S. maltophilia* in het gedistribueerde drinkwater.

- Het *chitA* gen van *S. maltophilia* werd in geen van de reinwatermonsters aangetroffen. Dit duidt erop dat het organisme in de zomer in staat is zich te vermeerderen in het distributiesysteem;
- In de binneninstallatie van gebouwen in het distributiesysteem van ps Kralingen en ps Berenplaat vindt vermeerdering van *S. maltophilia* plaats;
- De ATP-concentratie in het gedistribueerde drinkwater heeft geen invloed op het aantal *chitA* genkopieën van *S. maltophilia* in het gedistribueerde drinkwater;
- De gezondheidskundige betekenis van de aanwezigheid van DNA van *S. maltophilia* in het gedistribueerde drinkwater is onduidelijk.

5.2.5 *Acanthamoeba* spp.

- DNA van *Acanthamoeba* spp. werd in geen van de onderzochte distributiesystemen aangetroffen, zodat het aantal *Acanthamoeba* cellen in het onderzochte gedistribueerde drinkwater lager dan 1 cel per liter was.

5.2.6 *Legionella pneumophila*

- Het *mip* gen van *L. pneumophila* werd sporadisch aangetroffen in het Nederlandse drinkwater;
- In 2010 had het seizoen geen invloed op het aantreffen van het *mip* gen van *L. pneumophila* in het gedistribueerde drinkwater. De toename van de drinkwatertemperatuur tot circa 20°C in de zomer heeft dus geen invloed op het aantal *L. pneumophila* in het gedistribueerde drinkwater.
- Het aangetroffen DNA van *L. pneumophila* kwam niet van cellen die in staat waren te groeien op een selectief agarmedium voor *Legionella*. Waarschijnlijk komt dit omdat de cellen van nietkweekbare stammen kwamen, omdat de cellen niet levensvatbaar waren of omdat het medium werd overgroeid met andere legionellasoorten;
- De gezondheidskundige betekenis van de aanwezigheid van DNA van *L. pneumophila* in het drinkwater is onduidelijk.

5.3 Overig

- De ATP-concentratie van het (gedistribueerde) drinkwater is een betrouwbaardere parameter voor de hoeveelheid actieve biomassa dan het aantal cellen bepaald met flowcytometrie of microscopie;
- Met behulp van een momentane uitgebreide meetcampagne in het distributiesysteem worden geen locaties geïdentificeerd waar de microbiologische waterkwaliteit minder goed is;
- Een seizoensinvloed werd waargenomen op het aantal KG22, KG37, *Aeromonas*30 en *Aeromonas*37; deze aantallen lagen in de zomer hoger dan in de winter. Waarschijnlijk is de drinkwatertemperatuur, direct of indirect, verantwoordelijk voor deze hogere aantallen;
- De ratio van KG37:KG22 of *Aeromonas*37:*Aeromonas*30 kan niet worden gebruikt als eenvoudige indicatorparameter voor het signaleren van de invloed van een toenemende watertemperatuur op nagroei of van verschuivingen in de samenstelling van de bacterieflora in het drinkwater.

6 Aanbevelingen

6.1 Groei van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater

- Het effect van temperaturen tussen de 20 en 30°C onder laboratoriumcondities onderzoeken op de groei van (opportunistische ziekteverwekkende) schimmelsoorten, Mycobacterium-soorten, *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* in drinkwatergerelateerde biofilms;
- Aantallen opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen bepalen in water uit de drinkwaterzuivering, reinwater, water uit het distributiesysteem en water uit de binneninstallatie. Door locaties specifiek te kiezen kan ook het effect van grondstof, biologische stabiliteit, afstand en verblijftijd in distributiesysteem en leidingmateriaal van de binneninstallatie op voorkomen van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen worden bepaald. Het effect van leidingmateriaal op groei van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen kan tevens onder laboratoriumcondities worden bepaald;
- Drinkwatermonsters uit landen met warm klimaat (bv Nederlandse Antillen) analyseren met de in dit rapport toegepaste qPCR-methoden;
- Het effect van sedimenthoeveelheid en sedimentsamenstelling op groei van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen bepalen door spuiwater uit het distributiesysteem van verschillende pompstations op sediment(samenstelling) en opportunistische ziekteverwekkers te analyseren en groeiproeven met sediment op het laboratorium uit te voeren;
- De ontwikkelde dood/levend assay voor qPCR toepassen in combinatie met de qPCR methode voor schimmels, mycobacteriën, *A. fumigatus*, *M. avium*, *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* op drinkwater- en spuiwatermonsters uit de praktijk.

6.2 Populatiesamenstelling opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen

- De soortensamenstelling van de schimmel- en *Mycobacterium*-populaties bepalen in gedistribueerd drinkwater van verschillende pompstations bemonsterd in winter en zomer door toepassing van sequentiemethoden;
- Opportunistisch ziekteverwekkende schimmels (o.a. *A. fumigatus*), mycobacteriën (o.a. *M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi*), *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* uit drinkwater isoleren en met genotyperingsmethoden vergelijken met isolaten uit patiënten.

6.3 Methodeontwikkeling

- Kweekmethoden voor schimmels, mycobacteriën, *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* testen op drinkwater en met sequentieanalyses de gensequentie van geïsoleerde kolonies vergelijken met de gensequenties verkregen met de PCR-methode;
- Een specifieke (moleculaire) kwantificeringsmethode ontwikkelen voor *M. kansasii*, *M. xenopi*, *Fusarium oxysporum* en *Burkholderia cepacia* complex;
- Testen of de dood/levend assay voor qPCR-methoden ook kan worden toegepast op de qPCR-methode voor de kwantitatieve detectie van schimmels, *A. fumigatus*, mycobacteriën, *M. avium*, *P. aeruginosa* en *S. maltophilia*.

7 Literatuur

0. **Anaïssie, E.J., R. T. Kuchar, J. H. Rex, A. Francesconi, M. Kasai, F. M. Muller, M. Lozano-Chiu, R. C. Summerbell, M. C. Dignani, S. J. Chanock, and T. J. Walsh.** 2001. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clin Infect Dis* **33**:1871-8.
1. **Anaïssie, E. J., S. L. Stratton, M. C. Dignani, C. K. Lee, R. C. Summerbell, J. H. Rex, T. P. Monson, and T. J. Walsh.** 2003. Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. *Blood* **101**:2542-2546.
2. **Anaïssie, E. J., S. L. Stratton, M. C. Dignani, R. C. Summerbell, J. H. Rex, T. P. Monson, T. Spencer, M. Kasai, A. Francesconi, and T. J. Walsh.** 2002. Pathogenic *Aspergillus* species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study. *Clin. Infect. Dis.* **34**:780-789.
3. **Aronson, T., A. Holtzman, N. Glover, M. Boian, S. Froman, O. G. Berlin, H. Hill, and G. Stelma, Jr.** 1999. Comparison of large restriction fragments of *Mycobacterium avium* isolates recovered from AIDS and non-AIDS patients with those of isolates from potable water. *J Clin Microbiol* **37**:1008-12.
4. **Arvanitidou, M., K. Kanellou, T. C. Constantinides, and V. Katsouyannopoulos.** 1999. The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. *Lett Appl Microbiol* **29**:81-4.
5. **Baggelaar, P. K., Y.C. Drost, G. Nauta & D. van der Kooij.** 1992. Landelijk overzicht van *Aeromonas* bacteriën in drinkwater. In: *Aeromonas* in drinkwater. Vóórkomen, bestrijding, betekenis. D. van der Kooij (ed), pp 14-26.
6. **Carson, L. A., L. A. Bland, L. B. Cusick, M. S. Favero, G. A. Bolan, A. L. Reingold, and R. C. Good.** 1988. Prevalence of nontuberculous mycobacteria in water supplies of hemodialysis centers. *Appl Environ Microbiol* **54**:3122-5.
7. **Carson, L. A., N. J. Petersen, M. S. Favero, and S. M. Aguero.** 1978. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Appl Environ Microbiol* **36**:839-46.
8. **Carter, G., M. Wu, D. C. Drummond, and L. E. Bermudez.** 2003. Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *J Med Microbiol* **52**:747-52.
9. **Castellani, A.** 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.* **42**:225-226.
10. **Chiodini, R. J.** 1990. Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* and organisms of the *Mycobacterium avium* complex by restriction polymorphism of the rRNA gene region. *J. Clin. Microbiol.* **28**:489-494.
11. **Covert, T. C., M. R. Rodgers, A. L. Reyes, and G. N. Stelma, Jr.** 1999. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **65**:2492-6.
12. **Engel, H. W., L. G. Berwald, and A. H. Havelaar.** 1980. The occurrence of *Mycobacterium kansasii* in tapwater. *Tubercle* **61**:21-6.
13. **Falkinham, J. O., 3rd, C. D. Norton, and M. W. LeChevallier.** 2001. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* **67**:1225-31.
14. **Feazel, L. M., L. K. Baumgartner, K. L. Peterson, D. N. Frank, J. K. Harris, and N. R. Pace.** 2009. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:16393-9.

15. **Fischeder, R., R. Schulze-Robbecke, and A. Weber.** 1991. Occurrence of mycobacteria in drinking water samples. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **192**:154-8.
16. **Fisman, D. N., S. Lim, G. A. Wellenius, C. Johnson, P. Britz, M. Gaskins, J. Maher, M. A. Mittleman, C. V. Spain, C. N. Haas, and C. Newbern.** 2005. It's not the heat, it's the humidity: wet weather increases legionellosis risk in the greater Philadelphia metropolitan area. *J Infect Dis* **192**:2066-73.
17. **Frankova, E., and M. Horecka.** 1995. Filamentous soil fungi and unidentified bacteria in drinking water from wells and water mains near Bratislava. *Microbiol Res* **150**:311-3.
18. **Frumkin, H., J. Hess, G. Lubber, J. Malilay, and M. McGeehin.** 2008. Climate change: the public health response. *Am J Public Health* **98**:435-45.
19. **Glasmacher, A., S. Engelhart, and M. Exner.** 2003. Infections from HPC organisms in drinking-water amongst the immunocompromised, p. 137-145. *In* J. Bartram, J. Cotruvo, M. Exner, C. Fricker, and A. Glasmacher (ed.), *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-Water Safety*. World Health Organization, Cornwall, UK.
20. **Gottlich, E., W. van der Lubbe, B. Lange, S. Fiedler, I. Melchert, M. Reifenrath, H. C. Flemming, and S. de Hoog.** 2002. Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *Int J Hyg Environ Health* **205**:269-79.
21. **Grabinska-Loniewska, A., T. Konilowicz-Kowalska, G. Wardzynska, and K. Boryn.** 2007. Occurrence of fungi in water distribution system. *Polish J. of Environ. Stud.* **16**:539-547.
22. **Hageskal, G., A.K. Knutsen, P. Gaustad, G.S. de Hoog and I. Skaar.** 2006. Diversity and significance of mold species in Norwegian drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:7586-7593.
23. **Hageskal, G., P. Gaustad, B. T. Heier, and I. Skaar.** 2007. Occurrence of moulds in drinking water. *J Appl Microbiol* **102**:774-80.
24. **Haines, A., A. J. McMichael, and P. R. Epstein.** 2000. Environment and health: 2. Global climate change and health. *CMAJ* **163**:729-34.
25. **Hall-Stoodley, L., C. W. Keevil, and H. Lappin-Scott.** 1999. *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* biofilm formation under high and low nutrient conditions. *J. Appl. Microbiol.* **85**:60S-69S.
26. **Hammes, F.** 2010. Biological stability: growth potential measurements and advanced monitoring of water treatment and distribution systems. Workshop: Microbial processes during water treatment and distribution, 14 december 2010, Oasen, Gouda.
27. **Hedstrom, R. C., C. R. Funk, J. B. Kaper, O. R. Pavlovskis, and D. R. Galloway.** 1986. Cloning of a gene involved in regulation of exotoxin A expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **51**:37-42.
28. **Herrera, M. L., A. C. Vallor, J. A. Gelfond, T. F. Patterson, and B. L. Wickes.** 2009. Strain-dependent variation in 18S ribosomal DNA Copy numbers in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* **47**:1325-32.
29. **Hillebrand-Haverkort, M. E., A. H. Kolk, L. F. Kox, J. J. Ten Velden, and J. H. Ten Veen.** 1999. Generalized mycobacterium genavense infection in HIV-infected patients: detection of the mycobacterium in hospital tap water. *Scand J Infect Dis* **31**:63-8.
30. **Hinzelin, F., and J. C. Block.** 1985. Yeasts and filamentous fungi in drinking water. *Environmental Technology Letters* **6**:101-106.
31. **Hussein, Z., O. Landt, B. Wirths, and N. Wellinghausen.** 2009. Detection of non-tuberculous mycobacteria in hospital water by culture and molecular methods. *Int J Med Microbiol* **299**:281-90.
32. **Kanzler, D., W. Buzina, A. Paulitsch, D. Haas, S. Platzer, E. Marth, and F. Mascher.** 2008. Occurrence and hygienic relevance of fungi in drinking water. *Mycoses* **51**:165-9.
33. **Kirschner, R. A., B. C. Parker, and J. O. Falkinham.** 1999. Humic and fulvic acids stimulate the growth of *Mycobacterium avium*. *FEMS Microbiol Ecol* **30**:327-332.

34. **Kovats, R. S., D. Campbell-Lendrum, and F. Matthies.** 2005. Climate change and human health: estimating avoidable deaths and disease. *Risk Anal* **25**:1409-18.
35. **Le Dantec, C., J. P. Duguet, A. Montiel, N. Dumoutier, S. Dubrou, and V. Vincent.** 2002. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* **68**:5318-25.
36. **Lee, D. G., S. J. Kim, and S. J. Park.** 2006. Effect of reservoirs on microbiological water quality in a drinking water distribution system. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**:1060-1067.
37. **Levin, R. B., P. R. Epstein, T. E. Ford, W. Harrington, E. Olson, and E. G. Reichard.** 2002. U.S. drinking water challenges in the twenty-first century. *Environ Health Perspect* **110 Suppl 1**:43-52.
38. **Nagy, L. A., and B. H. Olson.** 1982. The occurrence of filamentous fungi in drinking water distribution systems. *Can J Microbiol* **28**:667-71.
39. **Niemi, R. M., S. Knuth, and K. Lundstrom.** 1982. Actinomycetes and Fungi in Surface Waters and in Potable Water. *Appl Environ Microbiol* **43**:378-388.
40. **Papapetropoulou, M., J. Iliopoulou, G. Rodopoulou, J. Detorakis, and O. Paniara.** 1994. Occurrence and antibiotic-resistance of *Pseudomonas* species isolated from drinking water in southern Greece. *J Chemother* **6**:111-6.
41. **Patz, J. A., D. Campbell-Lendrum, T. Holloway, and J. A. Foley.** 2005. Impact of regional climate change on human health. *Nature* **438**:310-7.
42. **Pedro-Botet, M. L., I. Sanchez, M. Sabria, N. Sopena, L. Mateu, M. Garcia-Nunez, and C. Rey-Joly.** 2007. Impact of copper and silver ionization on fungal colonization of the water supply in health care centers: implications for immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* **45**:84-6.
43. **Pryor, M., S. Springthorpe, S. Riffard, T. Brooks, Y. Huo, G. Davis, and S. A. Sattar.** 2004. Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. *Water Sci Technol* **50**:83-90.
44. **Reitler, R., and R. Seligmann.** 1957. *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water. *J. Appl. Bact.* **20**:145-150.
45. **Rusin, P. A., J. B. Rose, C. N. Haas, and C. P. Gerba.** 1997. Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Rev Environ Contam Toxicol* **152**:57-83.
46. **Schubert, R., and U. Blum.** 1974. Zur Frage der Erweiterung der hygienischen Wasserkontrolle auf den Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa*. *Gas- und Wasserfach* **115**:224-226.
47. **Schubert, R., and P. Scheiber.** 1975. Das Vorkommen von *Pseudomonas aeruginosa* im Grundwasser, Oberflächenwasser und in Wasserversorgungsleitungen in tropischen Gebieten. *Gas- und Wasserfach* **116**:413-415.
48. **Schulze-Robbecke, R., B. Janning, and R. Fischeder.** 1992. Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. *Tubercle Lung Dis.* **73**:141-144.
49. **Shehabi, A. A., H. Masoud, and F. A. Maslamani.** 2005. Common antimicrobial resistance patterns, biotypes and serotypes found among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patient's stools and drinking water sources in Jordan. *J Chemother* **17**:179-83.
50. **Solomon, S., D. Qin, M. Manning, M. Marquis, K. Averyt, M. M. B. Tignor, and H. L. Miller.** 2007. *Climate Change 2007. The Physical Science Basis.*, vol. Cambridge University Press, Cambridge, England.
51. **Szewzyk, U., R. Szewzyk, W. Manz, and K. H. Schleifer.** 2000. Microbiological safety of drinking water. *Annu Rev Microbiol* **54**:81-127.
52. **Theron, J., and T. E. Cloete.** 2002. Emerging waterborne infections: contributing factors, agents, and detection tools. *Crit Rev Microbiol* **28**:1-26.]

53. **Torvinen, E., S. Suomalainen, M. J. Lehtola, I. T. Miettinen, O. Zacheus, L. Paulin, M. L. Katila, and P. J. Martikainen.** 2004. Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Appl Environ Microbiol* **70**:1973-81.
54. **Tsintzou, A., A. Vantarakis, O. Pagonopoulou, A. Athanassiadou, and M. Papapetropoulou.** 2000. Environmental mycobacteria in drinking water before and after replacement of the water distribution network. *Water, Air, and Soil Pollution* **120**:273-282.
55. **Valster, R. M., B.A. Wullings, G.L. Bakker en D. van der Kooij.** 2010. Vrijlevende protozoa in het reine water en in het distributiesysteem van twee grondwaterpompstations. BTO 2010.019, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
56. **van der Kooij, D., J. P. Oranje, and W. A. Hijnen.** 1982. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in tap water in relation to utilization of substrates at concentrations of a few micrograms per liter. *Appl Environ Microbiol* **44**:1086-95.
57. **van der Kooij, D., A. Brouwer-Hanzens en H.R. Veenendaal.** 2009. Invloed van de watertemperatuur op de groei van *Legionella pneumophila* en *Legionella anisa* in biofilms. KWR 09.056, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
58. **van der Kooij, D., A. Brouwer-Hanzens en H.R. Veenendaal.** 2010. Invloed van de temperatuur op de groei van *Legionella pneumophila* in een vloeibaar medium en in biofilms. KWR 2010.057, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
59. **van der Wielen, P.W.J.J. en D. van der Kooij.** 2009a. Literatuurstudie naar opportunistisch-ziekteverwekkende micro-organismen die zich kunnen vermeerderen in drinkwater. BTO 2009.001(s), KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
60. **van der Wielen, P.W.J.J. en D. van der Kooij.** 2009b. Invloed van watersamenstelling, afstand en seizoen op het ATP-gehalte in water en in sediment uit het leidingnet van zes pompstations. BTO 2009.044, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
61. **van der Wielen, P.W. J. J. en D. van der Kooij.** 2011a. Inventarisatie van *Aeromonas* en koloniegetal 22°C in drinkwater en relaties met fysisch/chemische parameters. BTO 2011.001, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
62. **van der Wielen, P.W.J.J., R. Italiaander en L. Heijnen.** 2011b. Kwantitatieve detectiemethoden voor opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater. BTO 2011.034(s), KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
63. **van Ingen, J.** 2009. Nontuberculous mycobacteria. From gene sequences to clinical relevance. PhD thesis, Radboud University Nijmegen.
64. **van Ingen, J., H. Blaak, J. de Beer, A. M. de Roda Husman, and D. van Soolingen.** 2010. Rapidly growing nontuberculous mycobacteria cultured from home tap and shower water. *Appl Environ Microbiol* **76**:6017-9.
65. **Veenendaal, H. en D. van der Kooij.** 2007. Een specifieke kweekmethode voor *Legionella pneumophila*. *H2O* **40(5)**:36-38.
66. **Verweij, P. E., J. F. Meis, V. Christmann, M. Van der Bor, W. J. Melchers, B. G. Hilderink, and A. Voss.** 1998. Nosocomial outbreak of colonization and infection with *Stenotrophomonas maltophilia* in preterm infants associated with contaminated tap water. *Epidemiol Infect* **120**:251-6.
67. **Vesper, S. J., R. A. Haugland, M. E. Rogers, and A. N. Neely.** 2007. Opportunistic Aspergillus pathogens measured in home and hospital tap water by quantitative PCR (QPCR). *J Water Health* **5**:427-31.
68. **von Reyn, C. F., R. D. Waddell, T. Eaton, R. D. Arbeit, J. N. Maslow, T. W. Barber, R. J. Brindle, C. F. Gilks, J. Lumio, J. Lahdevirta, and et al.** 1993. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. *J Clin Microbiol* **31**:3227-30.

69. **Warris, A., P. Gaustad, J. F. Meis, A. Voss, P. E. Verweij, and T. G. Abrahamsen.** 2001. Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. *J Hosp Infect* **47**:143-8.
70. **Wilkinson, F. H., and K. G. Kerr.** 1998. Bottled water as a source of multi-resistant *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* species for neutropenic patients. *Eur J Cancer Care (Engl)* **7**:12-4.
71. **Williams, M. M., M. A. Yakrus, M. J. Arduino, R. C. Cooksey, C. B. Crane, S. N. Banerjee, E. D. Hilborn, and R. M. Donlan.** 2009. Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria. *Appl Environ Microbiol* **75**:2091-8.
72. **Wullings, B., G. Wubbels, H. Veenendaal en D. van der Kooij.** 2007. Snelle, kwantitatieve detectie van *Legionella pneumophila* in water met Q-PCR. *H2O* **40(5)**:39-41.
73. **Zacheus, O. M., and P. J. Martikainen.** 1995. Occurrence of heterotrophic bacteria and fungi in cold and hot water distribution system using water of different quality. *Can. J. Microbiol.* **41**:1088-1094.

I Monsterlocaties distributiesystemen

Distributiesysteem Leeuwarden

Hotspotlocaties:

Scheltemastate, Leeuwarden
Liauckemastate, Leeuwarden
Carolineburg, Leeuwarden
Uilenburgstate, Leeuwarden
Rooswinkelstate, Leeuwarden
Oenemastate, Leeuwarden
Bennemastate, Leeuwarden
Solckamastins, Leeuwarden
Dotingastate, Leeuwarden

Distributiesysteem Breda

Referentielocaties:

Kortenaerlaan, Breda
Rozenlaan, Breda
Landkaartje, Breda
Koekoekstraat, Breda
Brusselstraat, Breda

Hotspotlocaties

Laagerf, Breda
Cannaetserf, Breda
Grensoord, Breda
Oppermoeren, Breda
Roerdomp, Breda

Distributiesysteem Almere

Referentielocaties:

Brederostraat, Almere
Nescioplantsoen, Almere
Grace Kellystraat, Almere
Romy Schneiderweg, Almere
Leguaanstraat, Almere
Haasweg, Almere

Hotspotlocaties

's Hertogenboschplein, Almere
Gorinchemgracht, Almere
Dordrechtplein, Almere
Gipskruidweg, Almere
Saffraanplein, Almere
Sesamstraat, Almere

Distributiesysteem ps Scheveningen

Referentielocaties:

Groningsestraat, Den Haag
Else Mauhslaan, Den Haag
De Savornin Lohmanlaan, Den Haag
Groot hoefijzerlaan, Wassenaar
Graaf Florisstraat, Voorburg

Hotspotlocaties

Leeuwenhoekweg, Bergschenhoek
Ereprijsveld, Nieuwekerk a/d IJssel
Fresiaveld, Nieuwekerk a/d IJssel
Onderlangs Blokker, Zoetermeer
Wingerd, Den Haag
Meerkoetstraat, Den Haag

Distributiesysteem ps Kralingen

Referentielocaties:

Buitenwatersloot, Delft
Wateringseweg, Delft
Parkzoom, Delft
De Baronie, Capelle a/d IJssel
Willemsplein, Rotterdam

Hotspotlocaties

Abtswoude, Delft
Delfgauwseweg, Delft
Essebaan, Capelle a/d IJssel
Noordsingel, Rotterdam
Zagwijnpad, Delft
Mariniershof, Rotterdam

Distributiesysteem ps Berenplaat

Referentielocaties:

Hoenderparklaan, Kwintsheul
Delftweg, Rotterdam
Aesopusplaats, Rotterdam
Zwanenhoek, Spijkenisse
Admiraal de Ruyterstraat, Schiedam

Hotspotlocaties

Dorpsdijk, Rhoon
Lange Wateringkade, Kwintsheul
Europaweg, Rotterdam
Groene Hilledijk, Rotterdam
Hellevoetstraat, Schiedam
Middelbroekweg, Naaldwijk
Hoofdstraat, De Lier
Schiestraat, Spijkenisse

Distributiesysteem ps Weesperkarspel

Referentielocaties:

Muntbergweg, Amsterdam
Flierbosdreef, Amsterdam
Kruislaan, Amsterdam
IJdoornlaan, Amsterdam-Noord
Zuiderijdijk, Amsterdam-Noord

Hotspotlocaties

Sniep, Diemen
Remmerdenplein, Amsterdam
Pampusweg, Muiden
Googweg, Muiderberg
Cruquiusweg, Amsterdam
Gruttoplein, Diemen
Amerbos, Amsterdam
Verrijn Stuartweg, Diemen

Distributiesysteem ps Andijk

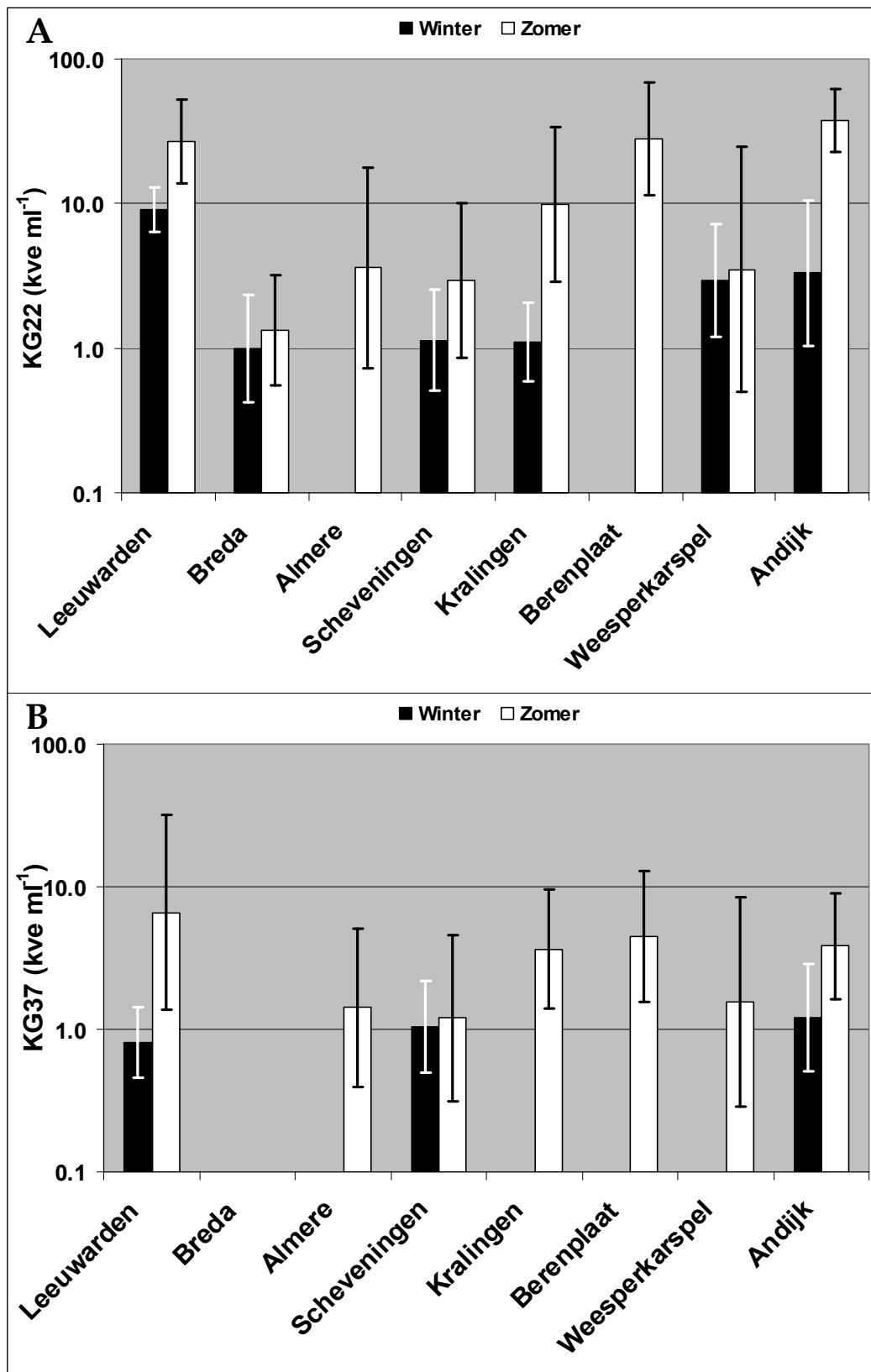
Referentielocaties:

Prinsenstraat, Enkhuizen
De Gauw, Grootebroek
Purmerendweg, Purmerend
Heideweg, Volendam
Korenmolenlaan, Bovenkarspel
Breitnerhof, Westerblokker

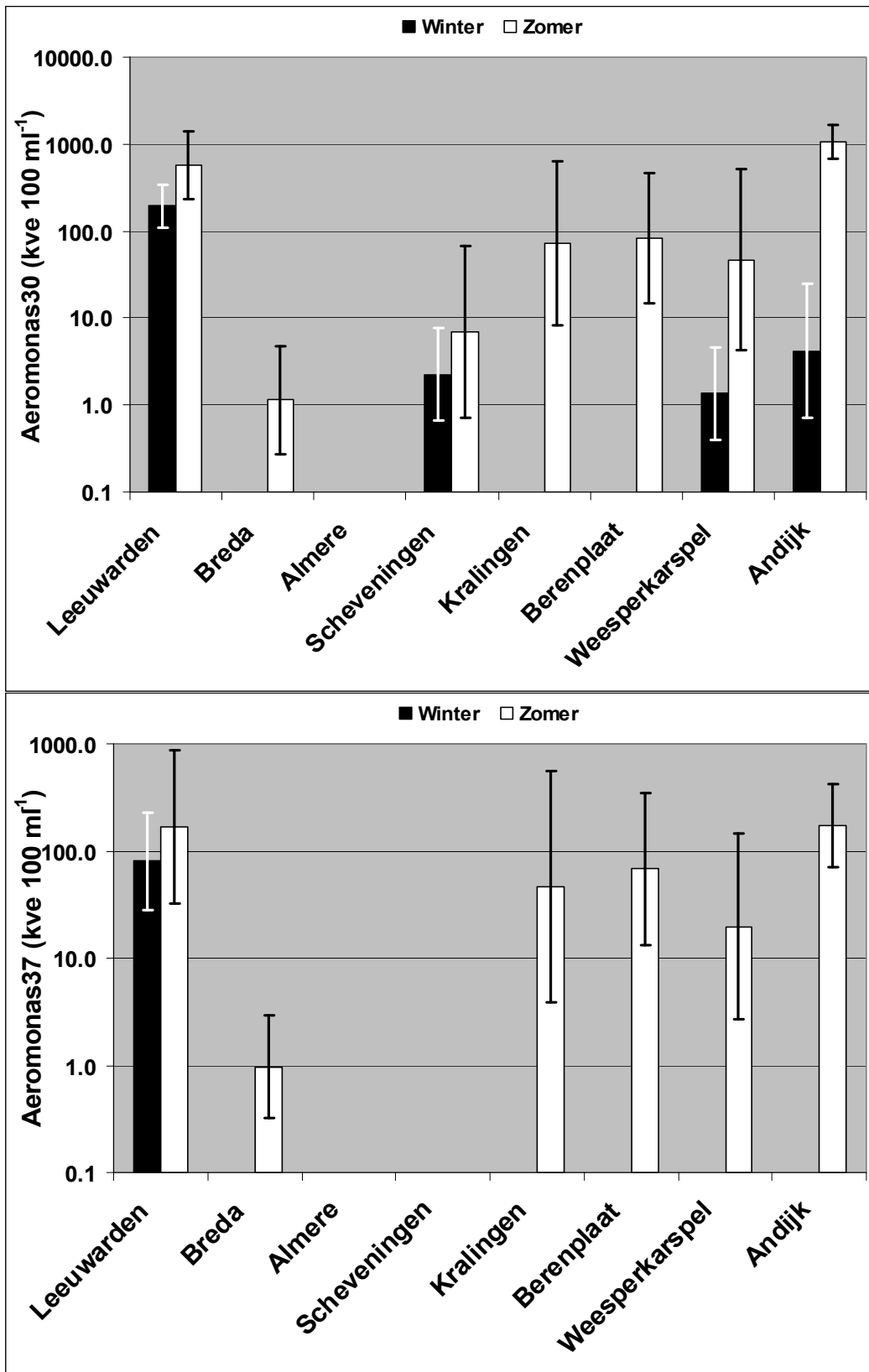
Hotspotlocaties

Stanfriesweg, Enkhuizen
Hoflandstraat, Grootebroek
Toereppel, Enkhuizen
Naardermeer, Purmerend
Galjoen, Volendam
Kadijk, Venhuizen
Wentelaar, Westwoud

II Resultaten KG22, KG37, Aeromonas30 en Aeromonas37



Figuur II.1 Het geometrisch gemiddelde van KG22(A) en KG37 (B) \times / geometrische standaard deviatie in het gedistribueerde drinkwater van acht distributiesystemen in de winter en zomer.



Figuur II.2 Het geometrisch gemiddelde van *Aeromonas* bij 30°C (A) en *Aeromonas* bij 37°C (B) \times / geometrische standaard deviatie in het gedistribueerde drinkwater van acht distributiesystemen in de winter en zomer.

