

BTO 2014.217(s) | September 2014

## BTO rapport

Rol van drinkwater,  
biofilm en temperatuur  
op groei van  
opportunistische  
pathogenen



# BTO

Rol van drinkwater, biofilm en temperatuur op groei van opportunistische pathogenen

BTO 2014.217(s) | September 2014

Opdrachtnummer

400554/007

Projectmanager

Luc Hornstra

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische activiteit

Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

Auteur

Paul W.J.J. van der Wielen

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Jaar van publicatie  
2014

Meer informatie

T 642

E [paul.van.der.wielen@kwrwater.nl](mailto:paul.van.der.wielen@kwrwater.nl)

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511  
F +31 (0)30 60 61 165  
E [info@kwrwater.nl](mailto:info@kwrwater.nl)  
I [www.kwrwater.nl](http://www.kwrwater.nl)

**KWR** Watercycle  
Research  
Institute

BTO 2014.217(s) | September 2014 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

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



# Samenvatting

Het BTO-onderzoek naar opportunistische pathogenen heeft laten zien dat bepaalde opportunistische pathogenen kunnen worden aangetroffen in het gedistribueerde drinkwater en biofilm uit het distributiesysteem. Onduidelijk is echter welke factoren een rol spelen bij de vermeerdering van deze organismen in het drinkwatermilieu. Daarom is een studie uitgevoerd waarin wordt achterhaald of een aantal opportunistische pathogenen zich weten te vermeerderen in het drinkwater en/of biofilm en wat het effect van temperatuur is op groei van deze organismen.

## *Groei in drinkwater en/of biofilm*

De groei van patiënt- en milieustammen (waaronder drinkwaterstammen) van *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium intracellulare* en *Mycobacterium peregrinum* werd getest op groei in gepasteuriseerd drinkwater van twee verschillende pompstations. De resultaten lieten zien dat alleen de stammen van *P. aeruginosa* in staat waren om zich te vermeerderen in het drinkwater. De substraataffiniteit van *P. aeruginosa*-cellen is echter laag, waardoor het maar zeer de vraag is of *P. aeruginosa* ook in staat is zich te vermeerderen in drinkwater wanneer natuurlijke drinkwaterbacteriën aanwezig zijn. De stammen van de overige opportunistische pathogenen konden zich niet vermeerderen in gepasteuriseerd drinkwater. In een vervollexperiment is achterhaald of de stammen van *A. fumigatus*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. avium* en *M. kansasii* zich weten te vermeerderen in biofilms op PVC-P onder statische condities in drinkwater. De resultaten lieten zien dat alleen de patiëntstam van *S. maltophilia* niet in staat was zich te vermeerderen in de biofilm. De andere onderzochte opportunistische pathogenen wisten de biofilms te koloniseren en zich te vermeerderen in de biofilm. De resultaten van deze experimenten laten dus zien dat *A. fumigatus*, *P. aeruginosa*, *M. avium* en *M. kansasii* hun niche hebben in de biofilm en de verwachting is dat, wanneer deze organismen voorkomen in het drinkwaterdistributiesysteem, deze organismen zich voornamelijk vermeerderen in de biofilm op de buiswand en/of sediment.

## *Invloed van temperatuur*

De groei van patiënt- en milieustammen van de verschillende opportunistische pathogenen bij verschillende temperaturen is getest door de organismen als reïncultuur uit te platen op agarmedia en deze agarplaten te incuberen bij verschillende temperaturen. De resultaten lieten zien dat *A. fumigatus*, *F. oxysporum*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. avium*, *M. peregrinum* en *M. intracellulare* in staat waren om zich te vermeerderen bij temperaturen die in Nederland voorkomen in het drinkwaterdistributiesysteem. Het blijft echter onduidelijk of deze organismen ook bij dergelijke temperaturen kunnen groeien in natuurlijke biofilms onder dynamische condities. In een aanvullende studie is daarom onderzocht wat de invloed is van temperatuur op de groei van *M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* in biofilms op PVC-P ringen in biofilmmonitoren die worden gevoed met drinkwater van verschillende temperaturen. *M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* werden sporadisch waargenomen in deze biofilms, maar ze waren niet in staat om stabiele populaties met relatief hoge aantallen te bereiken. Hierdoor is het lastig om betrouwbare conclusies te trekken over de invloed van temperatuur op de groei van deze drie organismen in biofilms onder dynamische condities.

Het DNA van *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* is echter wel op enig moment aangetroffen in de drinkwaterbiofilms die zich ontwikkelen op PVC-P ringen bij temperaturen lager dan 25°C. Dit resultaat is een indicatie dat deze twee opportunistische pathogenen in staat zijn om onder dynamische condities drinkwaterbiofilms te koloniseren die zich hebben gevormd op materialen die relatief zeer groeibevorderend zijn en zich in deze biofilms kunnen handhaven en mogelijk ook vermeerderen bij drinkwatertemperaturen die ook voorkomen in Nederlandse drinkwaterdistributiesystemen en drinkwaterinstallaties.

# Inhoud

1	Introductie	7
1.1	Achtergrond en doel	7
2	Groei in drinkwater en/of biofilm	9
2.1	Materiaal en methoden	9
2.2	Resultaten	10
2.3	Discussie	19
2.4	Conclusies	20
2.5	Aanbevelingen	21
3	Effect van temperatuur op groei van opportunistische ziekteverwekkers	23
3.1	Materiaal en Methoden	23
3.2	Resultaten	24
3.3	Discussie	30
3.4	Conclusies	31
3.5	Aanbevelingen	32
4	Conclusies en Aanbevelingen	33
4.1	Conclusies	33
4.2	Aanbevelingen	34
5	Referenties	35





# 1 Introductie

## 1.1 Achtergrond en doel

Het drinkwater wordt in Nederland gedistribueerd zonder desinfectiemiddel. Groei van micro-organismen met ziekteverwekkende eigenschappen, b.v. *Legionella pneumophila*, vormt een mogelijke bedreiging voor de onberispelijke kwaliteit van het drinkwater. Een literatuurstudie, uitgevoerd binnen het BTO-project 'Invloed van opwarming door klimaatverandering op nagroei in het leidingnet', heeft laten zien dat in Nederland, evenals in andere landen, behalve *L. pneumophila* ook andere opportunistisch-ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater voorkomen (van der Wielen & van der Kooij, 2009). Aanvullend onderzoek in het BTO heeft vervolgens aangetoond dat *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* en *Aspergillus fumigatus* sporadisch worden aangetroffen in het gedistribueerde drinkwater bemonsterd aan de tap (van der Wielen & van der Kooij, 2011; van der Wielen, 2014). Tevens heeft speerpuntonderzoek bij Oasen laten zien dat deze drie micro-organismen algemeen voorkomen in het distributiesysteem van ps Kamerik (van der Wielen, 2013). Omdat de aanwezigheid van deze organismen in het Nederlandse drinkwater een mogelijk gezondheidsrisico kan zijn voor de consument is aanvullend onderzoek naar de factoren die de groei van deze organismen versterken wenselijk. In het kader van opwarming door klimaatverandering is het bijvoorbeeld belangrijk te weten bij welke drinkwatertemperatuur deze opportunistisch ziekteverwekkende organismen zich gaan vermeerderen. Daarnaast is onduidelijk of deze micro-organismen zich weten te vermeerderen in het drinkwater of in de biofilm. Het doel van deze studie is daarom te achterhalen of een aantal opportunistische pathogenen zich weet te vermeerderen in het drinkwater of in de biofilm en wat het effect van temperatuur is op groei van deze organismen.



## 2 Groei in drinkwater en/of biofilm

### 2.1 Materiaal en methoden

#### 2.1.1 Stammen van micro-organismen

Tijdens de groeiproeven zijn verschillende opportunistische ziekteverwekkers en verschillende stammen (patiënt, drinkwater, milieu) gebruikt. De gebruikte organismen staan in Tabel 2.1.

**Tabel 2.1. De stammen van verschillende opportunistische ziekteverwekkers die bij (een deel van) de groeiproeven zijn gebruikt.**

Micro-organisme	Stam	Bron
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CBS 122886	Patiënt
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CBS 112389	Milieu
<i>Fusarium oxysporum</i>	CBS 125015	Patiënt
<i>Fusarium oxysporum</i>	CBS 117789	Milieu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KI 1.1/st 406	Patiënt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	M103998	Drinkwater
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	M113554	Patiënt
<i>Mycobacterium avium</i>	1011100204	Patiënt
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	1010901780	Patiënt
<i>Mycobacterium kansasii</i>	1011100194	Patiënt
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	DCZ1	Drinkwater

#### 2.1.2 Groeiproeven

De groeiproeven in drinkwater zijn uitgevoerd met drinkwater bereid uit grondwater en dat een relatief lage AOC-concentratie en biofilmvormingssnelheid (BVS) heeft (gedistribueerd drinkwater van ps Tull en 't Waal) en met drinkwater bereid uit oppervlaktewater en dat een hogere AOC-concentratie en BVS heeft (reinwater van ps Weesperkarspel).

#### **Groeiproef 1: Groei van opportunistisch pathogenen in drinkwater Tull en 't Waal**

- Maak entflesjes met de bovengenoemde 14 stammen
- **Het drinkwater van Tull en 't Waal** (getapt op het lab) wordt gepasteuriseerd en verdeeld over 28 verschillende AOC-kolven.
- Bovenstaande stammen (14 stuks) worden in duplo geënt aan het gepasteuriseerde drinkwater (totaal dus 28 kolven) en geïncubeerd bij 25°C.
- In de tijd wordt het ATP gehalte en aantal kolonievormende eenheden bepaald. De stammen van schimmels, *Pseudomonas* en *Stenotrophomonas* worden uitgeplaat op R2A medium; De *Mycobacterium*-stammen worden uitgeplaat op Middlebrook 7H10 agarmedium.

### Groeiproef 2: Groei van opportunistisch pathogenen in reinwater Weesperkarspel

- Maak entflesjes met de bovengenoemde 14 stammen
- Het uitgaand reinwater van ps Weesperkarspel (uitgaand reinwater) is onder gekoelde condities naar het laboratorium getransporteerd, gepasteuriseerd en verdeeld over 28 verschillende AOC-kolven.
- Bovenstaande stammen (14 stuks) worden in duplo geënt aan het gepasteuriseerde drinkwater (totaal dus 28 kolven) en geïncubeerd bij 25°C.
- In de tijd wordt het ATP gehalte en aantal kolonievormende eenheden bepaald. De stammen van schimmels, *Pseudomonas* en *Stenotrophomonas* worden uitgeplaat op R2A medium; de *Mycobacterium*-stammen worden uitgeplaat op Middlebrook 7H10.

### Groeiproef 3: Groei van opportunistisch pathogenen in biofilm op zacht PVC

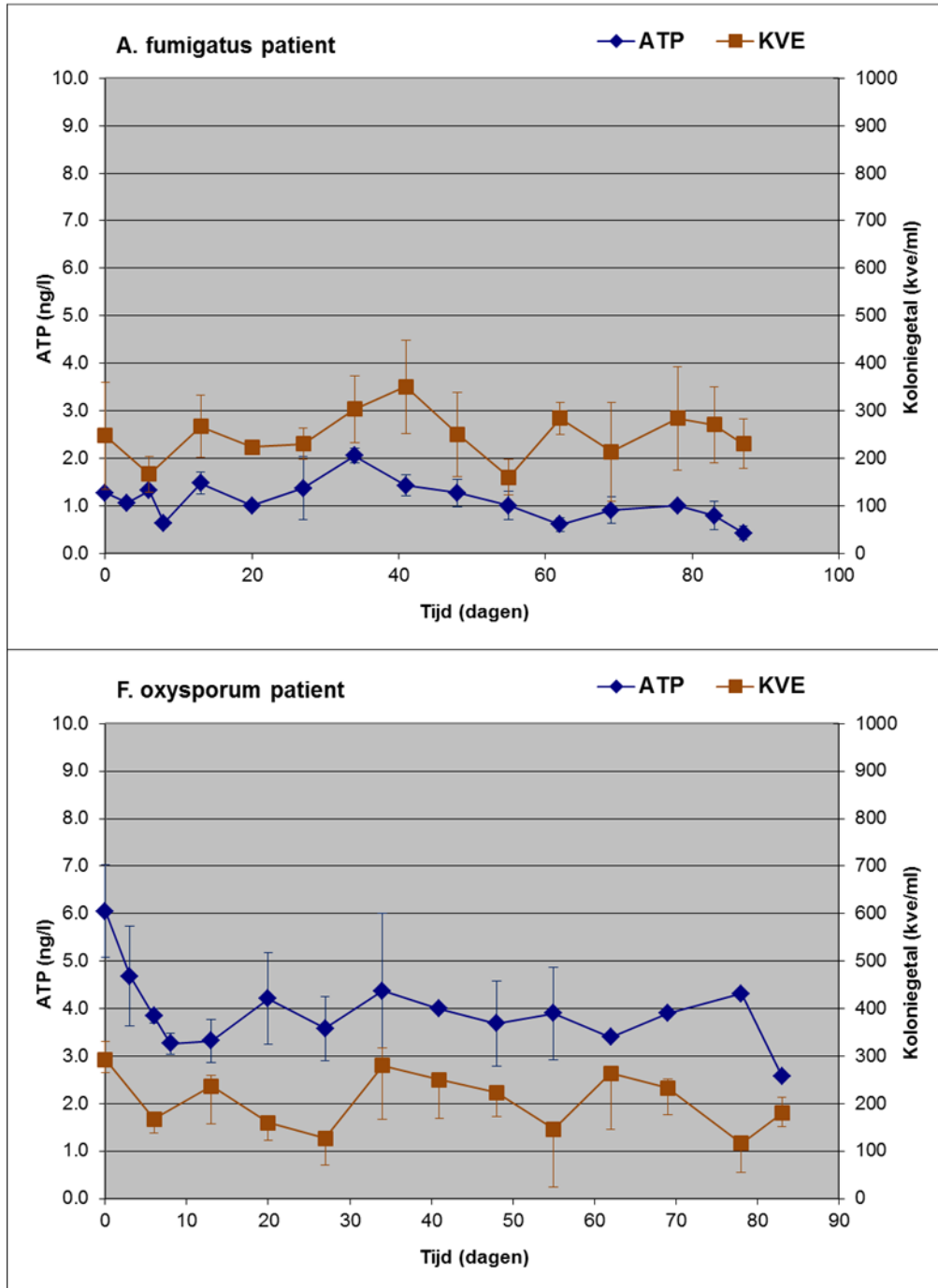
- Maak entflesjes met de bovengenoemde 14 stammen.
- Maak 30 flessen met per fles 6 stukjes PVC-P (zacht PVC), gedistribueerd drinkwater van ps Tull en 't Waal en nitraat/fosfaat oplossing.
- Ent de kolven in duplo met de bovengenoemde stammen (eindconcentratie:  $1 \times 10^4$  kve in 900 ml) en incubeer bij 25°C. Ververs na 14 dagen het drinkwater en ververs het drinkwater vervolgens wekelijks.
- Op gezette tijden (1<sup>e</sup> keer na 7 dagen vervolgens om de 14 dagen) wordt water uit de flessen bemonsterd en geanalyseerd op het aantal genkopieën van de verschillende organismen. Voor *P. aeruginosa* wordt ook monster uitgeplaat op een selectief medium voor *P. aeruginosa*.
- Op gezette tijden worden materiaalstukjes uit de flessen gehaald (dag 28, 56, 84 en 112) en wordt de biofilm losgetrild met HES. Daarna wordt het aantal genkopieën van de verschillende organismen bepaald. Voor *P. aeruginosa* wordt ook een watermonster uitgeplaat op een selectief medium voor *P. aeruginosa*.

## 2.2 Resultaten

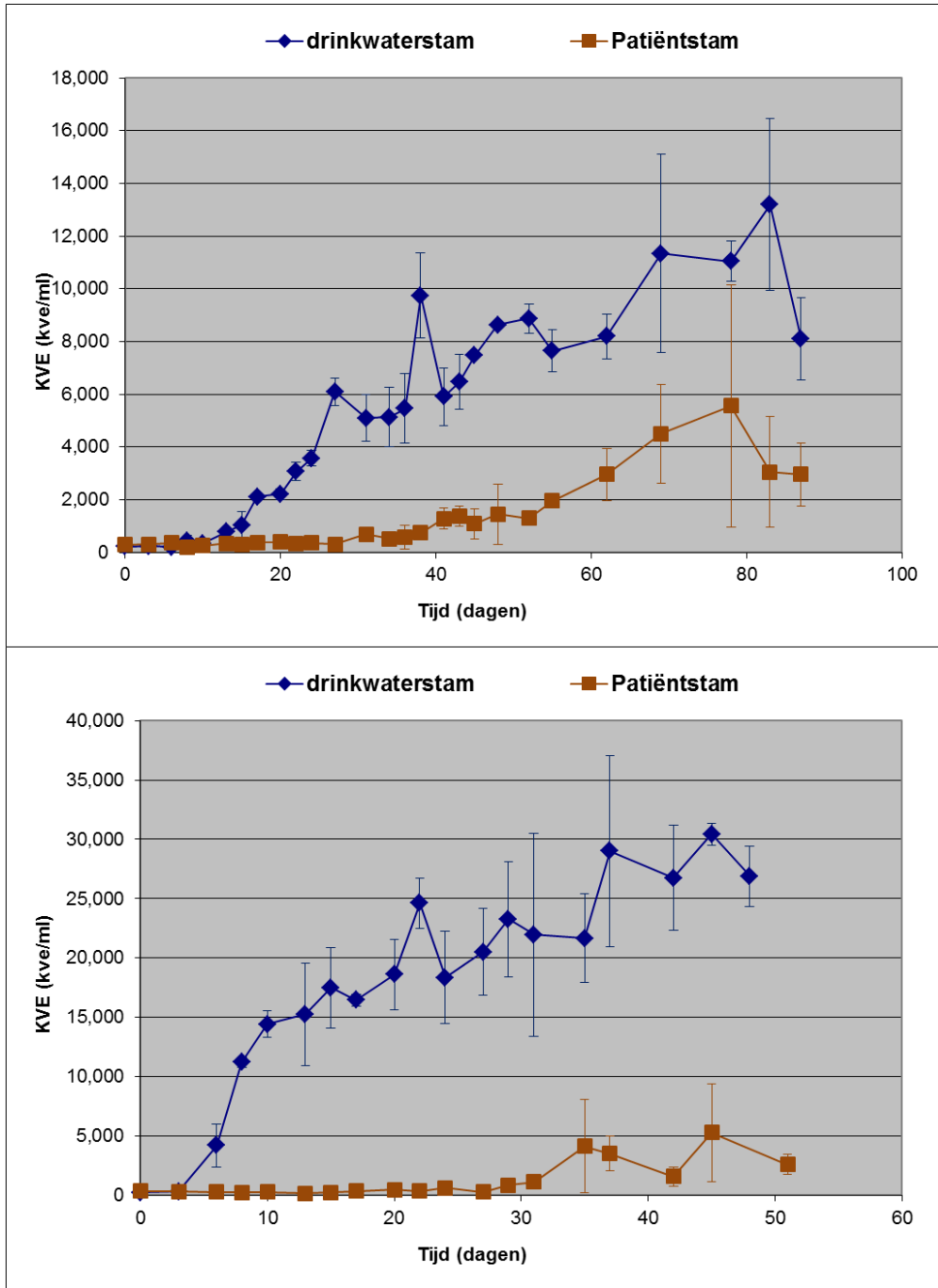
### 2.2.1 Groei in drinkwater

De patiëntstammen van *A. fumigatus* en *F. oxysporum* waren niet in staat zich te vermeerderen in het drinkwater van Nieuwegein, maar ze waren wel in staat om zich ruim 80 dagen te handhaven in het drinkwater (Figuur 2.1). Dezelfde resultaten werden gevonden voor de milieustammen van *A. fumigatus* en *F. oxysporum*. Vermeerdering van deze patiënt- en milieustammen werd ook niet waargenomen wanneer ze werden toegevoegd aan het gepasteuriseerde drinkwater van ps Weesperkarspel.

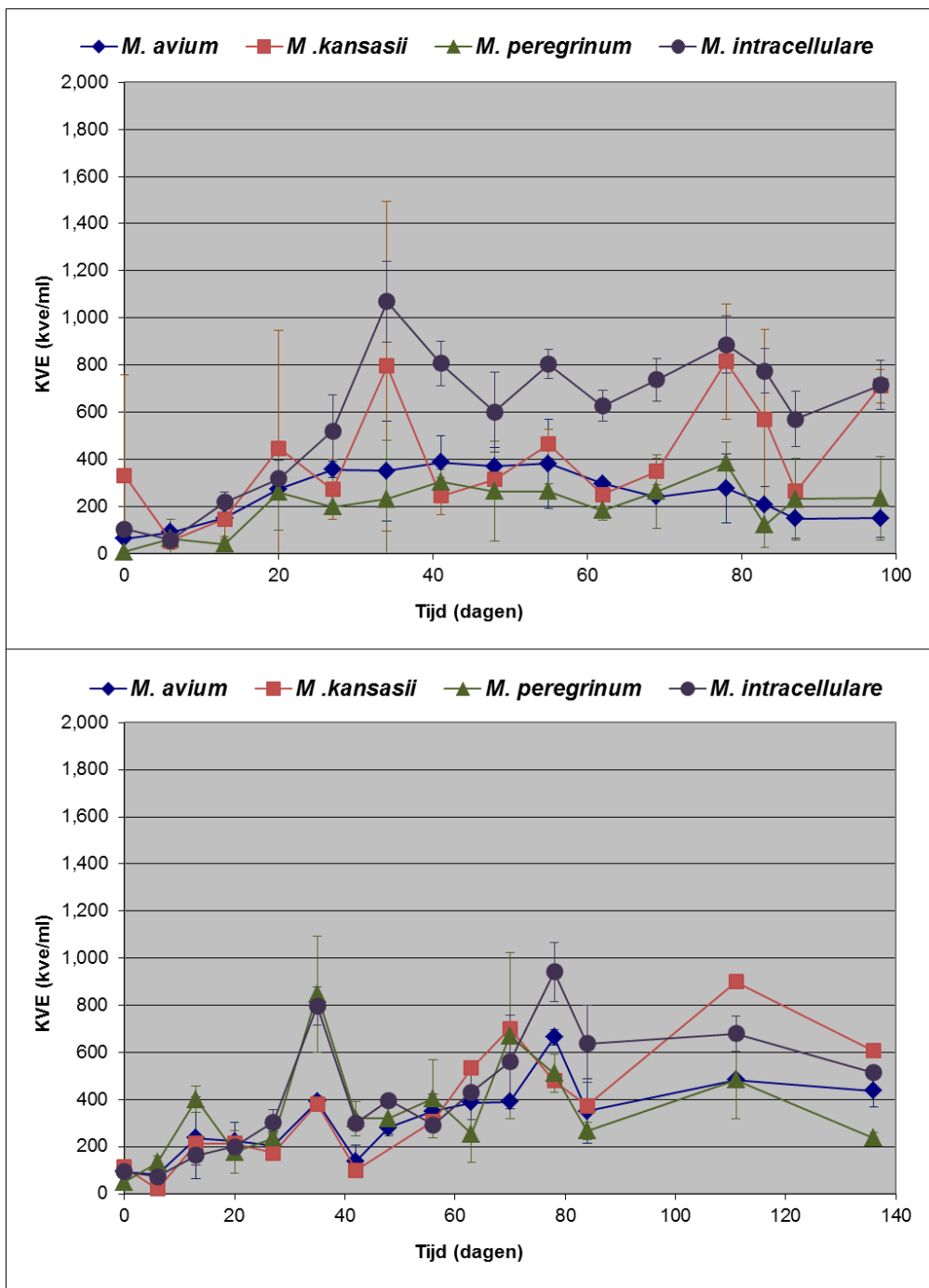
De drinkwaterstam van *P. aeruginosa* was goed in staat zich te vermeerderen in het gepasteuriseerde drinkwater van ps Tull en 't Waal en in het gepasteuriseerde reinwater van ps Weesperkarspel, waarbij de hoogste aantallen werden waargenomen in het reinwater van ps Weesperkarspel (Figuur 2.2). Ook de patiëntstam van *P. aeruginosa* wist zich te vermeerderen in beide gepasteuriseerde watertypen, maar de lag-fase was veel langer en de maximale kolonievormende eenheden beduidend lager.



Figuur 2.1 Groei van patiëntstammen van *A. fumigatus* en *F. oxysporum* in het gepasteuriseerde drinkwater van ps Tull en 't Waal.

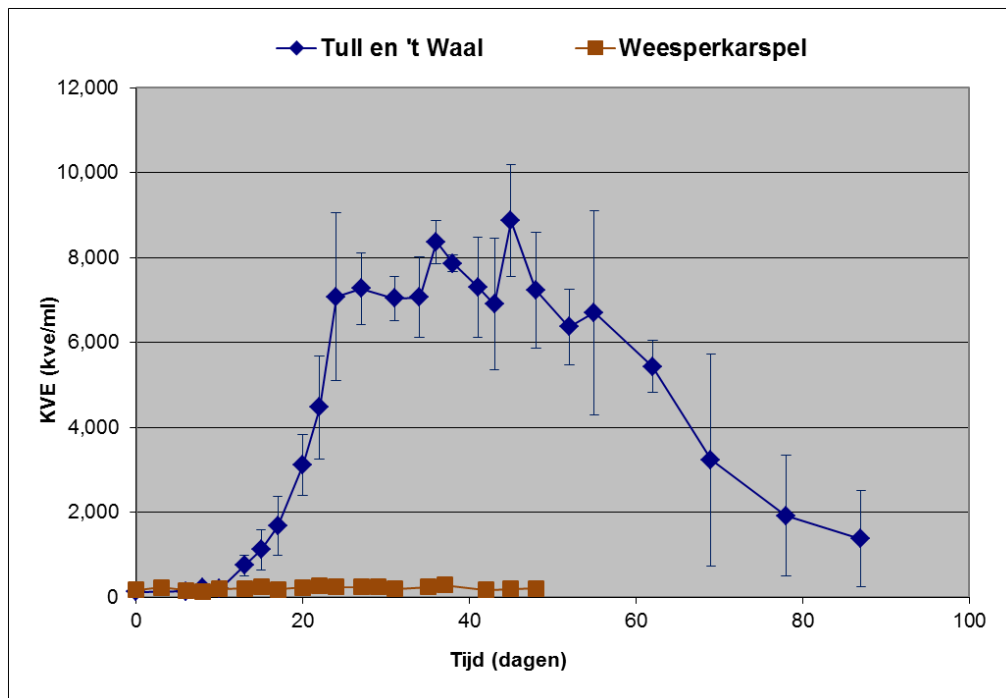


Figuur 2.2 Groei van drinkwater- en patiëntstam van *P. aeruginosa* in het gepasteuriseerde drinkwater van ps Tull en 't Waal (boven) en in het gepasteuriseerde reinwater van ps Weesperkarspel (onder).



Figuur 2.3 Groei van een patiëntstam van *M. avium*, *M. kansasii*, *M. peregrinum* en een drinkwaterstam van *M. intracellulare* in het gepasteuriseerde drinkwater van ps Tull en 't Waal (boven) en in het gepasteuriseerde reinwater van ps Weesperkarspel (onder).

De groei van vier verschillende *Mycobacterium*-soorten is ook getest in het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal en het reinwater van ps Weesperkarspel na pasteurisatie (Figuur 2.3). De vier *Mycobacterium*-soorten wisten zich niet goed te vermeerderen in deze watermonsters, want er werd slechts een zeer beperkte toename van het aantal kolonievormende eenheden verkregen en de aantallen kwamen nooit boven de 1100 kve/ml. Wel kunnen deze soorten zich tot ± 140 dagen handhaven in het drinkwater.



**Figuur 2.4** Groei van een patiëntstam van *S. maltophilia* in het gepasteuriseerde drinkwater van ps Tull en 't Waal en in het gepasteuriseerde reinwater van ps Weesperkarspel.

De patiëntstam van *S. maltophilia* was in staat zich te vermeerderen in het gepasteuriseerde drinkwater van ps Tull en 't Waal, maar niet in het gepasteuriseerde reinwater van ps Weesperkarspel (Figuur 2.4).

### 2.2.2 Groei in de biofilms

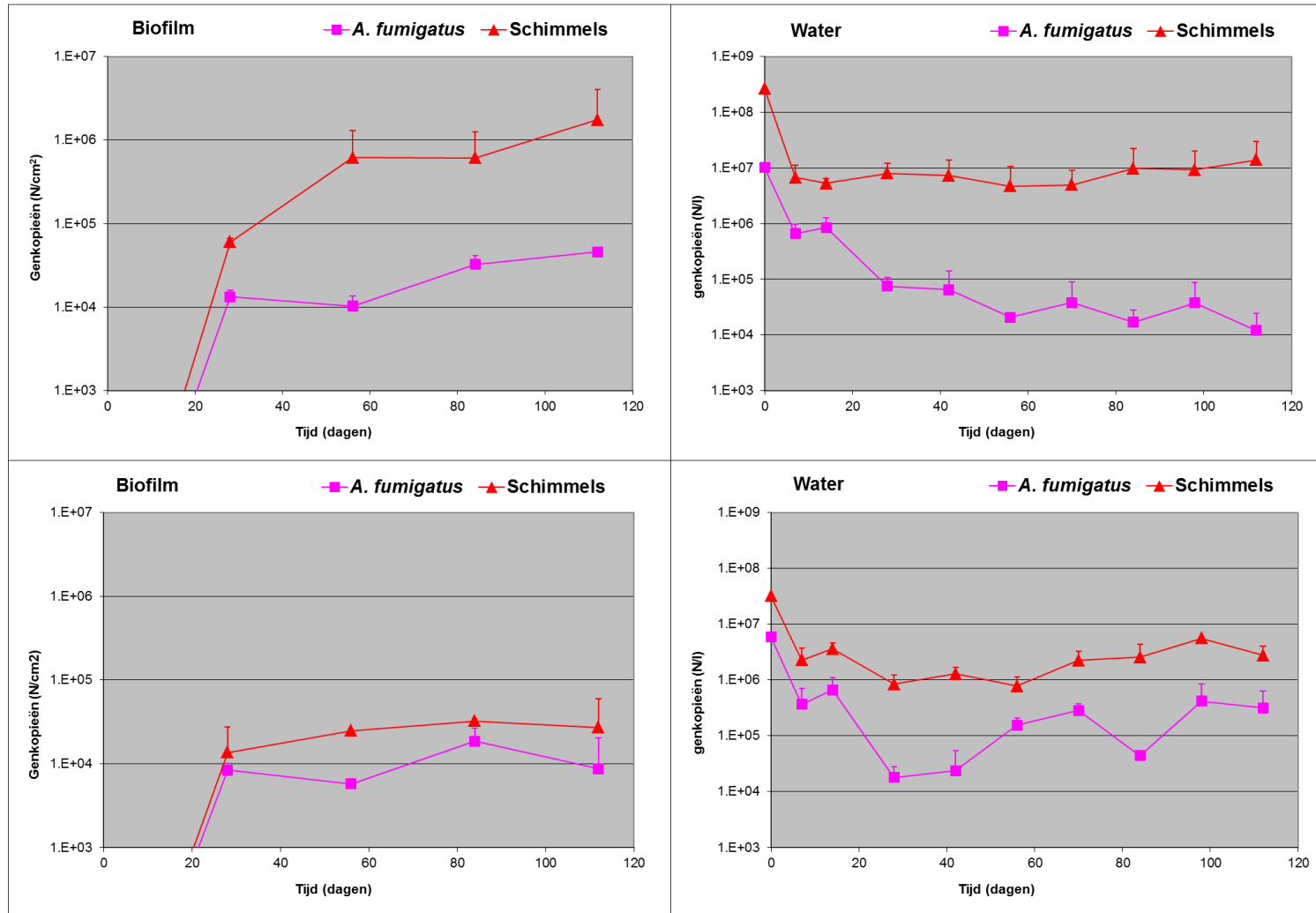
De verschillende stammen van opportunistische pathogenen werden ook getest voor vermeerdering in natuurlijke biofilms, die zich ontwikkelde op PVC-P (zacht PVC) dat onder statische condities in contact staat met drinkwater volgens het voorschrift van de BPP-test van drinkwater (met wekelijkse verversing van het drinkwater). In de tijd werd op vier momenten (dag 28, 56, 84 en 112) materiaal uitgenomen en werden de aantallen bepaald. Daarnaast werd ook onderzocht of vermeerdering optrad in het water door op een aantal momenten watermonsters te nemen vlak voor verversing.

#### *Aspergillus fumigatus*

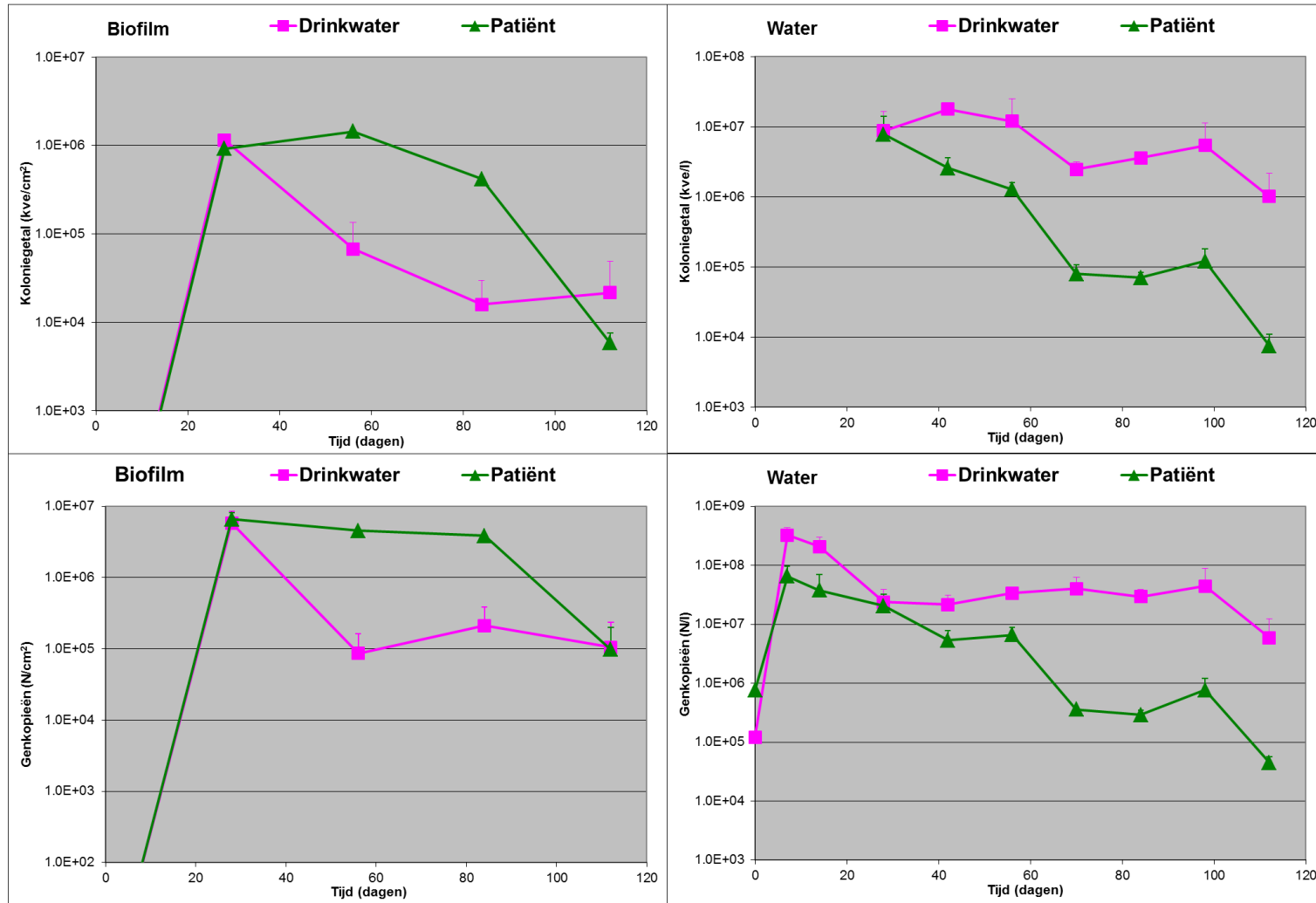
De patiëntstam en milieustam van *A. fumigatus* waren in staat zich te vermeerderen in de biofilm op het PVC-P materiaal (Figuur 2.5), waarbij de patiëntstam iets hogere aantallen bereikte dan de drinkwaterstam. Naast het aantal genkopieën van *A. fumigatus* zijn ook het aantal genkopieën van totaal aantal schimmels bepaald. Ook het totaal aantal schimmels nam toe op het PVC-P materiaal in de tijd, waarbij bij de ene test (met patiëntstam) hogere aantallen genkopieën van schimmels werd bereikt dan in de andere test (met drinkwaterstam).

In de waterfase vond geen vermeerdering plaats van de milieu- en/of patiëntstam van *A. fumigatus* (Figuur 2.5). Ook het totaal aantal schimmels nam niet toe in deze watermonsters.





Figuur 2.5 Verloop van het aantal 28S rRNA genkopieën van *A. fumigatus* en het aantal 18S rRNA genkopieën van schimmels in de tijd in de biofilm op PVC-P en in de waterfase van flessen met PVC-P stukjes en die zijn geïnoculeerd met een patiëntstam (boven) en drinkwaterstam (onder) van *A. fumigatus*.



Figuur 2.6 Verloop van het aantal kolonievormende eenheden (kve) (boven) en het aantal *recA* genkopieën (onder) van *P. aeruginosa* in de tijd in de biofilm op PVC-P en in de waterfase van flessen met PVC-P stukjes en die zijn geïnoculeerd met een patiëntstam en drinkwaterstam van *P. aeruginosa*.

### *Pseudomonas aeruginosa*

Een drinkwaterstam en patiëntstam van *P. aeruginosa* waren ook in staat zich te vermeerderen in de biofilm (Figuur 2.6) en deze vermeerdering werd zowel waargenomen met kolonievormende eenheden als met het aantal genkopieën. De aantallen van *P. aeruginosa* waren het hoogst in het begin (dag 28) en namen daarna af, waarbij de afname van de drinkwaterstam eerder plaatsvond dan de afname van de patiëntstam.

In de waterfase vond ook vermeerdering van beide stammen van *P. aeruginosa* plaats (Figuur 2.6), dus *P. aeruginosa* is niet alleen in staat om in de biofilm zich te vermeerderen maar ook in de waterfase waar ook een deel van de voedingsstoffen van het materiaal terecht komt. Ook in de waterfase werd een piek waargenomen kort nadat de proef was gestart (dag 7), waarna de aantallen weer afnamen.

Het aantal genkopieën van *P. aeruginosa* was hoger dan het aantal kolonievormende eenheden, waarschijnlijk omdat één *P. aeruginosa* cel meer kopieën van het desbetreffende gen bevat. De trend (toename, afname en/of stabilisatie) in de aantallen genkopieën en in het aantal kolonievormende eenheden was echter over het algemeen wel vergelijkbaar.

### *Stenotrophomonas maltophilia*

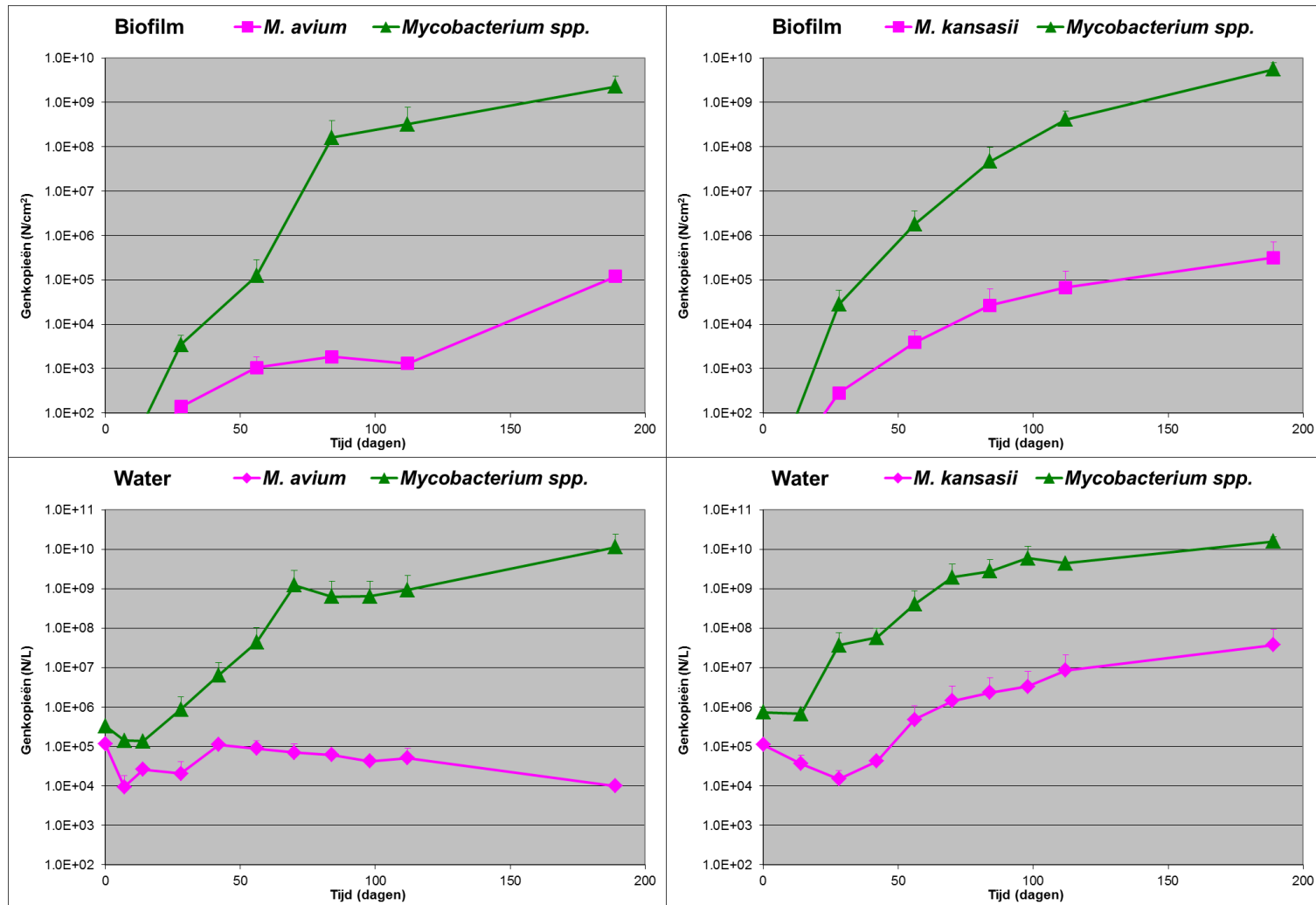
De patiëntstam van *S. maltophilia* werd na inzetten van de materiaalproef niet gedetecteerd in de biofilm of de waterfase. Blijkbaar was deze stam dus niet in staat zich te vermeerderen in de biofilm op PVC-P of in de waterfase.

### *Mycobacterium avium* en *Mycobacterium kansasii*

De patiëntstam van *M. avium* was in staat om zich te vermeerderen in de biofilm op PVC-P (Figuur 2.7). Hierbij namen de aantallen langzaam toe in de tijd, waarbij de hoogste aantallen werden gemeten op het laatste meetpunt (dag 189). Ondanks dat *M. avium* zich in staat is te vermeerderen in de biofilm is het aantal genkopieën van *M. avium* slechts een kleine fractie van het totaal aantal genkopieën van *Mycobacterium* in de biofilm. In de waterfase bleef *M. avium* relatief stabiel in de tijd, met een lichte afname aan het einde van de meetperiode. *M. avium* lijkt dus niet in staat om zich te vermenigvuldigen in de waterfase.

De patiëntstam van *M. kansasii* was ook in staat om zich te vermeerderen in de biofilm op PVC-P (Figuur 2.7), waarbij de aantallen langzaam toenamen in de tijd en de hoogste aantallen genkopieën werden waargenomen op het laatste meetpunt (dag 189). Het aantal genkopieën van *M. kansasii* was licht hoger dan het aantal genkopieën van *M. avium*, maar deze aantallen laten zich minder gemakkelijk vergelijken omdat verschillende genen zijn geamplificeerd en het niet duidelijk is of het aantal kopieën van deze genen hetzelfde zijn in de cel. Wel zijn het aantal genkopieën van *M. kansasii* ook een kleine fractie ten aanzien van het aantal genkopieën van alle *Mycobacterium*-soorten (Figuur 2.7).

Het aantal genkopieën van *M. kansasii* in de waterfase namen na een korte afname in de beginperiode toe met de tijd (Figuur 2.7). Dit duidt er op dat *M. kansasii* wel in staat was zich te vermeerderen in drinkwater dat in contact staat met stukjes PVC-P. Ook in de waterfase was het aantal genkopieën van *M. kansasii* een fractie van het aantal genkopieën van de totale mycobacteriepopulatie.



Figuur 2.7 Verloop van aantal genkopieën van een patiëntstam van *M. avium* en *M. kansasii* in de tijd in de biofilm op PVC-P en in de waterfase met PVC-P. Naast *M. avium* en *M. kansasii* zijn ook het aantal genkopieën van *Mycobacterium spp.* bepaald en weergegeven.

### 2.3 Discussie

Van de onderzochte stammen van de verschillende opportunistische ziekteverwekkers bleek *P. aeruginosa* in staat om zich te vermeerderen in gepasteuriseerd drinkwater, terwijl *A. fumigatus*, *F. oxysporum* en de verschillende non-tuberculeuze mycobacteriën niet in staat waren zich te vermeerderen in gepasteuriseerd drinkwater. Een patiëntstam van *S. maltophilia* was wel in staat zich te vermeerderen in het gepasteuriseerde gedistribueerde drinkwater van ps Nieuwegein, maar niet in het gepasteuriseerde reinwater van ps Weesperkarspel. Omdat deze patiëntstam ook niet in staat was zich te vermenigvuldigen in drinkwater dat in contact staat met stukjes PVC-P, is de waargenomen groei in het **gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal verdacht. Mogelijk dat een infectie is opgetreden en een andere bacterie dan *S. maltophilia* is gaan groeien in het drinkwater**, maar dit is niet verder onderzocht. De groei van de andere opportunistische pathogenen was vergelijkbaar in het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal en reinwater van ps Weesperkarspel. Er lijkt dus geen invloed te zijn van de bron die is gebruikt voor de drinkwaterbereiding (grondwater vs oppervlaktewater) of het verschil in AOC en BVS tussen deze twee watertypen op de groei van opportunistische pathogenen.

De drinkwaterstam van *P. aeruginosa* nam eerder toe dan de patiëntstam en de drinkwaterstam bereikte ook een hoger groeimaximum dan de patiëntstam. Dit duidt er op dat de drinkwaterstam beter is aangepast aan groei in het drinkwater bij 25°C dan de patiëntstam. Het blijft echter wel onduidelijk of deze stammen van *P. aeruginosa* zich ook in drinkwater weten te vermenigvuldigen wanneer andere bacteriën aanwezig zijn in het drinkwater. Groeiproeven in het verleden hebben laten zien dat *P. aeruginosa* een lagere affiniteit heeft voor verschillende substraten dan andere bacteriën die van nature voorkomen in drinkwater (van der Kooij et al., 1982; van der Kooij & van der Wielen, 2014). Het is daarom onwaarschijnlijk dat *P. aeruginosa* ook in staat is zich te vermenigvuldigen in drinkwater wanneer de hoeveelheid afbreekbaar organisch stof in de µg per liter range is, zoals in het Nederlandse drinkwater meestal het geval is. Dit aspect kan worden onderzocht door ongepasteuriseerd drinkwater te inoculeren met *P. aeruginosa*.

De patiënt- en/of drinkwaterstammen van *A. fumigatus*, *P. aeruginosa*, *M. avium* en *M. kansasii* zijn in staat om zich te vermeerderen in de biofilm op PVC-P, terwijl *S. maltophilia* niet in staat was zich te vermeerderen. Deze groei treedt op door groeibevorderende stoffen die aanwezig zijn in PVC-P. In vergelijking tot de materialen die normaal worden toegepast in het drinkwaterdistributiesysteem (PVC-C, PVC-U, PE-80 en PE-100) is de biomassaproductiepotentie (dat een maat is voor de hoeveelheid groeibevorderende stoffen in het materiaal) van PVC-P 10 tot 100 keer hoger. Bij deze relatief hoge concentraties aan groeibevorderende stoffen zijn de verschillende opportunistische ziekteverwekkers (behalve de patiëntstam van *S. maltophilia*) in staat zich te vermeerderen in natuurlijk ontwikkelde biofilms. *A. fumigatus* en *M. avium* waren daarbij alleen in staat zich te vermeerderen in de biofilm en niet in het water, terwijl *P. aeruginosa* en *M. kansasii* zich ook konden vermeerderen in het drinkwater dat in contact staat met PVC-P en waar ook een natuurlijke microflora aanwezig was. *M. kansasii* was niet in staat te groeien in hetzelfde drinkwater van **Tull en 't Waal (na pasteurisatie) wanneer PVC-P niet aanwezig was**, terwijl *P. aeruginosa* veel trager groeide in gepasteuriseerd drinkwater van ps Tull en 't Waal. Deze verschillen in groei in de waterfase wordt veroorzaakt doordat de hoeveelheid substraat in het water dat in contact staat met PVC-P hoger zal zijn dan in het gedistribueerde drinkwater. Door deze hogere substraatconcentratie hebben bacteriën met een lage affiniteit voor nutriënten, maar een hoge groeisnelheid, de kans om zich in de waterfase te vermenigvuldigen.

De opportunistische ziekteverwekkers verschilden ook in mate van groei in de biofilm en/of waterfase. *P. aeruginosa* bereikte de hoogste aantallen in de biofilm na 28 dagen, terwijl de aantallen na 28 dagen weer afnamen. Een vergelijkbaar patroon werd waargenomen in de waterfase voor *P. aeruginosa*. Een waarschijnlijke verklaring hiervoor is dat *P. aeruginosa* een opportunistische groeiwijze heeft, dat inhoudt dat deze bacteriesoort een hogere maximale groeisnelheid heeft dan concurrerende micro-organismen en daarom in het begin snel in staat is zich te vermenigvuldigen wanneer er voldoende substraat voor groei aanwezig is. Nadat een deel van het substraat op is en de concurrerende micro-organismen zich ook zijn gaan vermeerderen, verliest *P. aeruginosa* de competitie omdat *P. aeruginosa* een lagere affiniteit heeft voor het substraat dan de concurrerende micro-organismen. Wanneer deze hypothese klopt, zal *P. aeruginosa* in de drinkwaterpraktijk zich weten te vermeerderen wanneer er tijdelijk een hogere substraatconcentratie in het drinkwatermilieu aanwezig is. Wanneer het gewenst is om te onderzoeken of deze hypothese klopt, dan zijn aanvullende experimenten nodig.

*A. fumigatus*, *M. avium* en *M. kansasii* bereiken hun maximale aantallen pas op een later moment in de biofilm en lijken gedurende de 112 dagen van het onderzoek niet af te nemen. Deze micro-organismen hebben mogelijk een relatief hoge affiniteit voor het substraat waarop ze groeien en kunnen daardoor concurreren met andere micro-organismen in de biofilm. Het is echter wel waargenomen dat deze drie micro-organismen niet tot de dominante micro-organismen in de biofilm behoren, dat betekent dat ze niet in staat zijn zich te vermeerderen op de substraten die voor de meeste groei van micro-organismen zorgen. Het zou dus kunnen zijn dat deze drie micro-organismen op specifieke substraten groeien die in minder hoge concentratie aanwezig zijn of die minder energierijk zijn. Wanneer het wenselijk is om deze groeisubstraten te identificeren, is aanvullend onderzoek nodig.

#### 2.4 Conclusies

Een drinkwater- en patiëntstam van *P. aeruginosa* zijn in staat om zich te vermenigvuldigen in het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal en reinwater van ps Weesperkarspel wanneer het water is gepasteuriseerd en er dus geen natuurlijke microflora in het water aanwezig is.

Een drinkwater- en/of patiëntstam van *A. fumigatus*, *F. oxysporum*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. peregrinum* en *M. intracellulare* zijn niet in staat om zich te vermeerderen in het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal en reinwater van ps Weesperkarspel wanneer het water is gepasteuriseerd en geen natuurlijke microflora bevat.

Een drinkwater- en/of patiëntstam van *A. fumigatus*, *P. aeruginosa*, *M. avium* en *M. kansasii* zijn in staat zich te vermeerderen in de biofilm dat is gevormd op PVC-P. *P. aeruginosa* en *M. kansasii* zijn ook in staat zich te vermeerderen in het drinkwater dat in contact staat met PVC-P.

Een patiëntstam van *S. maltophilia* is niet in staat zich te vermeerderen in de biofilm dat is gevormd op PVC-P of in het water dat in contact staat met PVC-P.

*A. fumigatus*, *P. aeruginosa*, *M. avium* en *M. kansasii* lijken dus hun niche te hebben in de biofilm en de verwachting is dat, wanneer deze organismen voorkomen in het drinkwaterdistributiesysteem, deze organismen zich voornamelijk vermeerderen in de biofilm op de buiswand en/of sediment.

*P. aeruginosa* zou zich ook in het drinkwater kunnen vermeerderen, maar onduidelijk is of deze groei ook optreedt wanneer een natuurlijke microflora met concurrerende micro-organismen aanwezig is in het drinkwater.

### 2.5 Aanbevelingen

De resultaten laten zien dat *A. fumigatus*, *P. aeruginosa*, *M. avium* en *M. kansasii* hun niche hebben in de biofilm. Deze resultaten lijken er dus op te wijzen dat de groei van deze micro-organismen in het drinkwaterdistributiesysteem kan worden beperkt door de mate van biofilmvorming te beperken. Beheersmaatregelen die de mate van biofilmvorming zouden kunnen beperken zijn (i) verlagen van afbreekbare stoffen in het drinkwater, (ii) gebruik van inerte materialen in het distributiesysteem en (iii) verlaging van het ijzergehalte. Aanvullend onderzoek is echter nodig om het effect van dergelijke beheersmaatregelen op de groei van deze opportunistische ziekteverwekkers te bepalen, voordat definitief kan worden geconcludeerd of het beperken van biofilmvorming de groei van deze organismen terugdringt.





## 3 Effect van temperatuur op groei van opportunistische ziekteverwekkers

### 3.1 Materiaal en Methodes

#### 3.1.1 Temperatuurbereik opportunistische ziekteverwekkers

Het temperatuurbereik van de stammen van de verschillende opportunistische ziekteverwekkers (Tabel 2.1) werd bepaald door de organismen op een geschikt agarmedium uit te platen, de agarplaten gedurende 15 dagen te incuberen bij de temperaturen 15, 20, 25, 30, 35, 40 en 45°C en regelmatig visueel te scoren of er groei is opgetreden. De groei van de stammen van *A. fumigatus* en *P. aeruginosa* werden ook nog getest bij 10°C en 50°C (behalve patiëntstam van *P. aeruginosa*, die alleen werd getest bij 45°C).

#### 3.1.2 Effect van temperatuur op groei van opportunistische pathogenen in biofilmmonitoren

Het effect van temperatuur op de groei van de volgende opportunistisch pathogenen werd bepaald in de biofilmmonitoren:

*Pseudomonas aeruginosa* stam KI 1.1/st 406 (patiëntstam)

*Mycobacterium avium* 1011100204 (patiëntstam)

*Aspergillus fumigatus* CBS 122886 (patiëntstam)

Het effect van de temperatuur op deze organismen werd getest in de penta- of hexamonitor. Dit zijn monitoren waar vijf (penta) of zes (hexa) traditionele biofilmmonitoren naast elkaar zijn geplaatst en die afzonderlijk op een bepaalde drinkwatertemperatuur kunnen worden bedreven (van der Kooij et al., 2009).

De zes kolommen in de hexamonitor werden gevuld met ringen van PVC-P (20 stuks; lengte ca 2 cm en inwendige diameter 1,15 cm) en de temperatuur van het voedende water werd voor iedere kolom ingesteld op: 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C en 40°C. Bovenin iedere kolom werden twee stukjes PVC-P geplaatst met biofilm waarin *P. aeruginosa* stam KI 1.1/st 406 is gegroeid in een batch test (inoculaties). De recirculatie werd vervolgens gestart (150 l/uur) voor de temperaturen 15, 20, 25 en 40°C, terwijl de kolommen die op 30 en 35°C werden bedreven, vanaf het begin werden verversd (1 tot 2 liter per uur). Deze verversing was nodig om te zorgen dat de temperatuur niet te hoog opliep. Op dag 17 werd gestart met continue verversing van het water (1 tot 2 liter per uur) voor alle kolommen. De inoculaties werden tijdens de eerste bemonstering (na 17 dagen) uit de biofilmmonitors verwijderd.

De vijf kolommen in de pentamonitor werden gevuld met ringen van PVC-P (20 stuks; lengte ca 2 cm en inwendige diameter 1,15 cm) en de temperatuur van het voedende water werd voor iedere kolom ingesteld op: 20°C, 25°C, 30°C, 35°C en 40°C. Bovenin iedere kolom werden twee stukjes PVC-P geplaatst met biofilm waarin *M. avium* stam 1011100204 is

gegroeid in een batch test. De recirculatie werd vervolgens gestart (150 l/uur). Op dag 17 werd gestart met continue verversing van het water (1 tot 2 liter per uur). De inoculaties werden tijdens de eerste bemonstering (na 14 dagen) uit de biofilmmonitors verwijderd.

Nadat de metingen met *M. avium* in de pentamonitor waren afgerond en het systeem was schoongemaakt, werden de vijf kolommen in de pentamonitor gevuld met nieuwe ringen van PVC-P (20 stuks; lengte ca 2 cm en inwendige diameter 1,15 cm) en de temperatuur van het voedende water werd voor iedere kolom ingesteld op: 20°C, 25°C, 30°C, 35°C en 40°C. Bovenin iedere kolom werden twee stukjes PVC-P geplaatst met biofilm waarin *A. fumigatus* CBS 122886 is gegroeid in een batch test. De recirculatie werd vervolgens gestart (150 l/uur) voor de temperaturen 20, 25 en 40°C, terwijl de kolommen die op 30 en 35°C werden bedreven, vanaf het begin werden verversd (1 tot 2 liter per uur). Deze verversing was nodig om te zorgen dat de temperatuur niet te hoog opliep. Op dag 9 werd gestart met continue verversing van het water (1 tot 2 liter per uur) bij alle kolommen. De inoculaties werden tijdens de eerste bemonstering (na 17 dagen) uit de biofilmmonitors verwijderd.

Wekelijks werd het water van de kolommen bemonsterd en werd per kolom één ring uitgehaald. Het materiaal van de ringen werd met sonicatie losgetrild in 30 ml steriel water. Hier werden de volgende analyses op gedaan:

- ATP
- Koloniegetallen van *P. aeruginosa* bij de hexamonitor
- Filtratie voor DNA-isolatie
  - o Na isolatie uitvoeren van qPCR voor *P. aeruginosa* (hexamonitor), *M. avium* (pentamonitor) en *A. fumigatus* (pentamonitor).

## 3.2 Resultaten

### 3.2.1 Temperatuurbereik opportunistische pathogenen

In een eerste stap werd onderzocht bij welke temperatuurrange de reïncultures van de verschillende stammen van de diverse opportunistische ziekteverwekkers kunnen groeien en de resultaten hiervan zijn weergegeven in Tabel 3.1. De resultaten laten zien dat de patiënt- en milieustam van *A. fumigatus* hetzelfde temperatuurbereik hebben voor groei. Dit temperatuurbereik was relatief groot en deze stammen waren in staat te groeien van 15°C tot 50°C of hoger. Het temperatuurbereik van de patiënt- en milieustam van *F. oxysporum* verschilt van elkaar. De milieustam was in staat om bij hogere temperaturen (40°C als maximum) te groeien dan de patiëntstam (35°C). Dit is tegen de verwachting, omdat de patiëntstam beter geïmplementeerd zou kunnen zijn aan de lichaamstemperatuur van mensen. Beide stammen waren wel in staat te groeien bij de laagste temperatuur die is getest voor deze stammen (15°C).

De patiënt- en milieustam van *P. aeruginosa* hebben een vergelijkbare temperatuurrange voor groei, hoewel voor de patiëntstam groei boven 45°C niet is getest en het dus mogelijk is dat deze stam bij hogere temperaturen kan groeien dan de drinkwaterstam (die wel voor groei bij 50°C is getest). De temperatuurrange waarbij de stammen van *P. aeruginosa* kunnen groeien is breed en zelfs bij 10°C werd nog groei waargenomen. De patiëntstam van *S. maltophilia* was ook in staat om bij relatief lage temperatuur te groeien (in ieder geval tot

15°C), maar 40°C was de hoogste temperatuur waar nog groei van *S. maltophilia* werd waargenomen.

**Tabel 3.1** De minimale, maximale en optimumtemperatuur voor groei van de verschillende stammen van de opportunistische ziekteverwekkers tijdens kweek op een geschikt agarmedium.

Micro-organisme	Bron	Temperatuur (°C)		
		Minimum	Optimum	Maximum
<i>A. fumigatus</i> CBS 122886	Patiënt	15	35 - 45	≥ 50
<i>A. fumigatus</i> CBS 112389	Milieu	15	35 - 45	≥ 50
<i>F. oxysporum</i> CBS 125015	Patiënt	≤ 15	20 - 30	35
<i>F. oxysporum</i> CBS 117789	Milieu	≤ 15	20 - 30	40
<i>P. aeruginosa</i> KI 1.1/st406	Patiënt	≤ 10	25 - 40	≥ 45
<i>P. aeruginosa</i> M103998	Drinkwater	≤ 10	25 - 40	45
<i>S. maltophilia</i> M113554	Patiënt	≤ 15	25 - 35	40
<i>M. avium</i> 1011100204	Patiënt	20	30 - 40	≥ 45
<i>M. peregrinum</i> 1010901780	Patiënt	≤ 15	30 - 35	35
<i>M. kansasii</i> 1011100194	Patiënt	25	30 - 35	40
<i>M. intracellulare</i> DCZ1	Drinkwater	≤ 15	30 - 40	≥ 45
<i>L. pneumophila</i> <sup>a</sup>	Drinkwater/patiënt	20	30 - 40	> 42
<i>L. anisa</i> <sup>a</sup>	Drinkwater	< 20	25 - 30	37

<sup>a</sup> gegevens komen uit van der Kooij et al. 2009

Drie van de vier *Mycobacterium*-soorten hebben een kleiner temperatuurbereik voor groei en dit temperatuurbereik verschilt tussen de soorten. *M. avium* en *M. kansasii* waren minder goed in staat om bij lagere temperaturen te groeien, terwijl *M. peregrinum* minder goed in staat was om bij hogere temperaturen te groeien. *M. intracellulare* had wel een breed temperatuurbereik en bij alle geteste temperaturen werd groei van dit organisme waargenomen.

Ter vergelijking zijn ook het temperatuurbereik van *L. pneumophila* en *L. anisa* weergegeven die in een eerder experiment zijn bepaald (van der Kooij et al., 2009). *L. pneumophila* was niet in staat om bij temperaturen beneden 20°C zich te vermeerderen, terwijl *L. anisa* niet in staat was zich te vermeerderen bij temperaturen hoger dan 37°C.

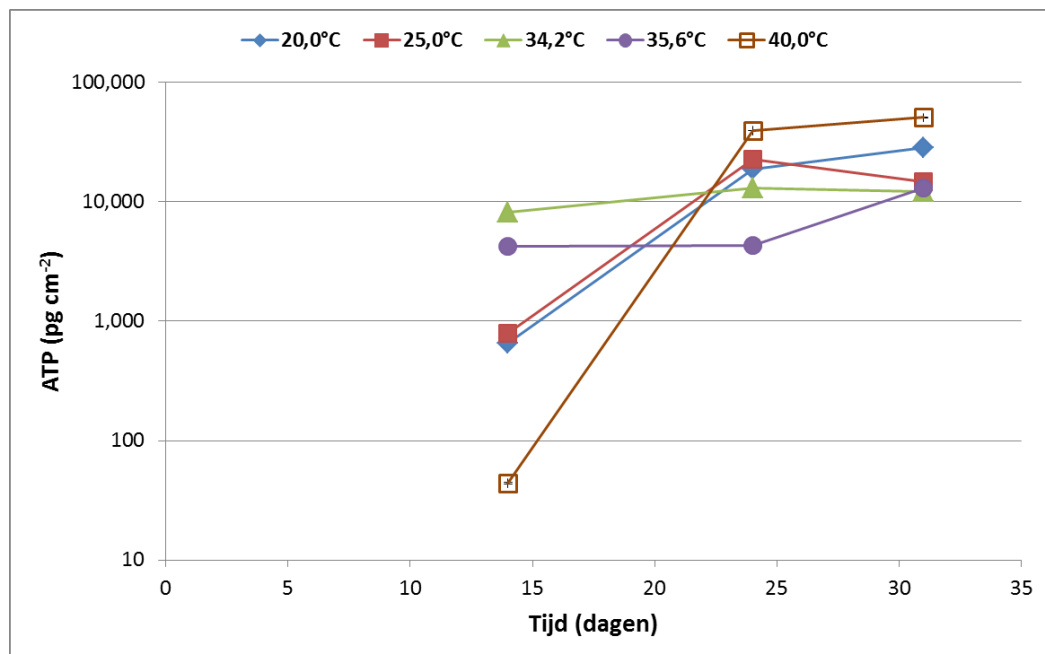
De resultaten laten zien dat de meeste opportunistische pathogenen een breed temperatuurbereik voor groei hebben en dat de meeste organismen in staat zijn om te groeien bij relatief lage en hoge temperaturen. Onduidelijk is echter of deze organismen ook in staat zijn om zich te vermeerderen bij lage en hoge temperatuur wanneer andere micro-organismen aanwezig zijn. Daarom is in een vervolgstudie bepaald of *A. fumigatus*, *P. aeruginosa* en *M. avium* in staat zijn zich te vermeerderen in een natuurlijke biofilm die zich heeft ontwikkeld op PVC-P ringen en die werd gevoed met drinkwater van verschillende temperaturen.

### 3.2.2 Effect van temperatuur op groei van opportunistische pathogenen in biofilmmonitor

#### 3.2.2.1 Mycobacterium avium

##### Temperatuur en ATP

De opzet was om groei van *M. avium* te testen in biofilmmonitors die werden doorstroomd met drinkwater en waarbij de temperatuur 20, 25, 30, 35 en 40°C zou zijn. Hiervoor werd op dag 1 de temperatuur ingesteld, waarna de biofilmmonitors een aantal weken hebben gedraaid. Gedurende de looptijd van het experiment bleken in sommige monitoren de temperatuur te zijn veranderd, waardoor de gemiddelde temperatuur iets afweek van de vooraf geplande temperatuur. Uiteindelijk was de groei van *M. avium* in de biofilmmonitor daarom bepaald bij 20,0; 25,0; 34,2; 35,6 en 40,0°C.



Figuur 3.1 De ATP-concentratie van de biofilm op PVC-P in de biofilmmonitors die bij verschillende temperaturen werden bedreven.

De ATP-concentratie van de biofilm nam toe van dag 0 tot dag 24, waarna de ATP-concentratie tot dag 31 stabiel bleef (Figuur 3.1). Er waren kleine verschillen tussen ATP-concentratie bij de verschillende temperaturen. De hoogste ATP-concentratie in de periode van dag 24 tot dag 31 werd waargenomen bij 40°C, terwijl de laagste ATP-concentratie in die periode bij 35,6°C werd gedetecteerd.

##### Genkopieën van *Mycobacterium avium*

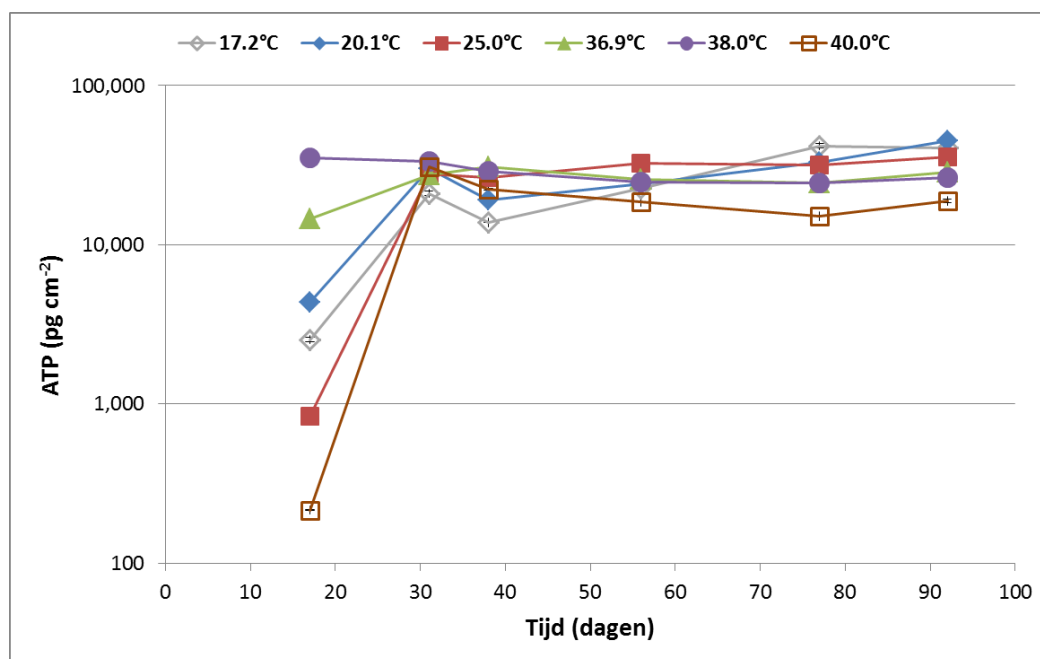
Het 16S rRNA gen van *M. avium* werd alleen teruggevonden op dag 24 in de biofilm van de biofilmmonitors die werden bedreven bij een temperatuur van 25,0 en 40,0°C. Op de overige dagen en in de andere biofilmmonsters waren alle monsters negatief voor het 16S rRNA gen van *M. avium*. Blijkbaar lukte het dus onvoldoende om *M. avium* te laten groeien in deze natuurlijke biofilms. Onderzoek naar het voorkomen van *M. avium* in het Nederlandse

drinkwater heeft in de tussentijd laten zien dat *M. avium* niet wordt aangetroffen in het Nederlandse drinkwater. Het Nederlandse drinkwater lijkt daarmee geen rol te spelen in de verspreiding van *M. avium*. Daarom is besloten om de experimenten met *M. avium* in de biofilmmonitor bij verschillende temperaturen niet door te zetten en/of te herhalen.

### 3.2.2.2 *Pseudomonas aeruginosa* Temperatuur en ATP

De experimenten met *P. aeruginosa* in de biofilmmonitor werden uiteindelijk ook bij iets andere temperaturen uitgevoerd dan gepland, namelijk bij 17,2; 20,1; 25,0; 36,9; 38,0 en 40,0°C.

Van dag 0 tot dag 31 nam de ATP-concentratie van de biofilm toe, waarna de ATP-concentratie relatief stabiel bleef tot dag 92 (Figuur 3.2). De ATP-concentraties in de biofilm waren vergelijkbaar voor de verschillende temperaturen en varieerde tussen de 14.000 en 42.000 pg ATP/cm<sup>2</sup>.



Figuur 3.2 De ATP-concentratie van de biofilm op PVC-P in de biofilmmonitors die bij verschillende temperaturen werden bedreven.

### Kolonievormende eenheden en genkopieën van *Pseudomonas aeruginosa*

De aantallen *P. aeruginosa* werden bepaald met een kweekmethode en kwantitatieve PCR en deze aantallen zijn weergegeven in Tabel 3.2 en 3.3. Kolonievormende eenheden van *P. aeruginosa* werden in de biofilm van sommige monitoren teruggevonden op dag 17, 31 en 38 (Tabel 3.2). De hoogste aantallen werden aangetroffen op dag 17 bij 25°C en 40°C. Op dag 31 en 38 werd in slechts één biofilmmonitor kweekbare *P. aeruginosa* aangetroffen, maar deze aantallen waren zeer laag. Bij de biofilmmonitoren die bij 17,2 en 20,1°C werden bedreven, werden kweekbare *P. aeruginosa* cellen op geen van de monsterdagen aangetroffen.

Op dag 38 werd in de biofilmmonitor bij 20,1°C het *recA* gen van *P. aeruginosa* aangetroffen (136 gk/cm<sup>2</sup>) en op dag 92 in de biofilmmonitor bij 38,0°C (198 gk/cm<sup>2</sup>). Alle overige monsters waren negatief, waarbij wordt opgemerkt dat de monsters die op dag 17 werden genomen, niet zijn geanalyseerd voor het aantal *recA* genkopieën van *P. aeruginosa*. Het *recA* gen van *P. aeruginosa* werd dus in andere monsters aangetroffen dan de monsters die

**Tabel 3.2. Het aantal kolonievormende eenheden per cm<sup>2</sup> van *P. aeruginosa* in de biofilm op PVC-P bij verschillende temperaturen**

Dag	17,2°C	20,1°C	25,0°C	36,9°C	38,0°C	40,0°C
17	< 2	< 2	12	< 2	< 2	2
31	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,16	< 0,01
38	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,79	< 0,01	< 0,01
56	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
77	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
92	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

**Tabel 3.3. Het aantal *recA* genkopieën per cm<sup>2</sup> van *P. aeruginosa* in de biofilm op PVC-P bij verschillende temperaturen**

Dag	17,2°C	20,1°C	25,0°C	36,9°C	38,0°C	40,0°C
31	< 99	< 178	< 128	< 148	< 166	< 146
38	< 195	136	< 171	< 364	< 830	< 265
56	< 28	< 9,7	< 21	< 63	< 69	< 164
77	< 1300	< 561	< 704	< 109	< 91	< 163
92	< 900	< 331	< 120	< 118	198	< 53

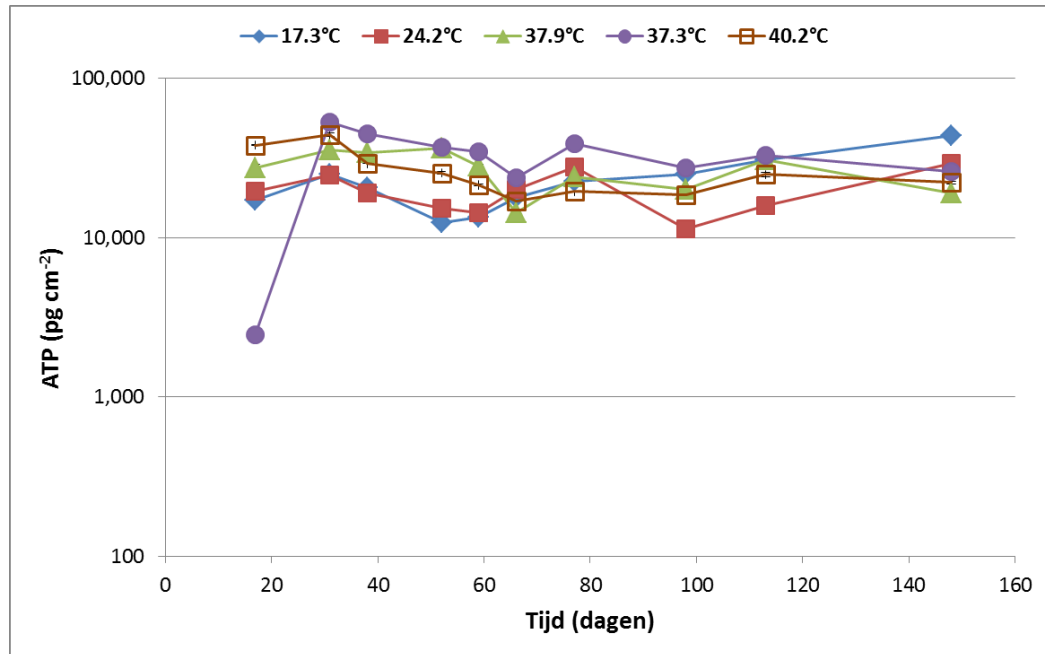
positief waren voor kweekbare *P. aeruginosa*. De aantallen kweekbare *P. aeruginosa* waren echter dusdanig laag, dat deze onder de detectiegrens van de kwantitatieve PCR-methode lagen. Voor de monsters waar wel het *recA* gen, maar geen kweekbare *P. aeruginosa* werden aangetroffen, zou het kunnen zijn dat het DNA van dode en/of viable but non culturable *P. aeruginosa* cellen is gedetecteerd. In een monster dat positief was voor het DNA van *P. aeruginosa*, heeft *P. aeruginosa* zich in ieder geval op een bepaald moment weten te vestigen en handhaven in de biofilm, maar onduidelijk is of dit DNA afkomstig is van levende of dode cellen.

In zijn totaliteit waren er maar enkele biofilmmonsters positief voor *P. aeruginosa* en lagen de aantallen vaak rond de detectiegrens. Het lijkt dus met de gekozen opzet van de biofilmmonitors niet gelukt om een stabiele populatie van *P. aeruginosa* in de biofilmmonitor te krijgen, waardoor het moeilijk is om betrouwbare conclusies te trekken over de invloed van temperatuur op groei van *P. aeruginosa*. De positieve monsters werden gevonden in de biofilmmonitors die bij verschillende temperaturen (20,1 t/m 40°C) werden bedreven. Dit is een indicatie dat *P. aeruginosa* in staat is om zich bij die temperaturen (kort) te handhaven in een natuurlijke drinkwaterbiofilm.

### 3.2.2.3 *Aspergillus fumigatus* Temperatuur en ATP

De experimenten met *A. fumigatus* in de biofilmmonitor zijn uiteindelijk ook bij iets andere temperaturen uitgevoerd dan gepland, namelijk bij 17,3; 24,2; 37,9; 37,3 en 40,2°C.

Op dag 17 werd in de meeste monitoren al een relatief hoge en stabiele ATP-concentratie in de biofilm waargenomen, die op hetzelfde niveau bleef tot dag 148 (Figuur 3.3). Alleen in de biofilmmonitor bij 37,3°C werd de relatief hoge en stabiele ATP-concentratie pas op dag 31 bereikt. Vanaf dag 31 waren de ATP-concentraties in de biofilm vergelijkbaar voor de verschillende temperaturen en varieerden tussen de 11.000 en 53.000 pg ATP/cm<sup>2</sup>.



Figuur 3.3. De ATP-concentratie van de biofilm op PVC-P in de biofilmmonitors die bij verschillende temperaturen werden bedreven.

Tabel 3.4. Het aantal 28S rRNA genkopieën per cm<sup>2</sup> van *A. fumigatus* in de biofilm op PVC-P bij verschillende temperaturen

Dag	17,3°C	24,2°C	37,9°C	37,3°C	40,2°C
17	2010	3000	< 49	101	< 32
31	566	56	< 63	< 35	< 33
38	< 34	763	< 133	< 61	< 78
52	< 377	579	< 396	< 1370	< 767
59	< 1120	< 911	< 212	< 327	< 215
66	< 801	125	< 496	2400	410
77	< 54	393	< 179	< 290	< 262
98	< 186	218	181	< 152	< 223
113	267	92	60	827	228
148	< 353	< 964	< 152	< 1100	< 256

#### Genkopieën van *Aspergillus fumigatus*

Het 28S rRNA gen van *A. fumigatus* werd op enig moment in de biofilm van alle biofilmmonitoren gevonden (Tabel 3.4). De aantallen waren over het algemeen relatief laag en net boven de detectiegrens van de kwantitatieve PCR-methode. Het 28S rRNA gen werd gedetecteerd in acht van de tien biofilmringen in de monitor bij 24,2°C, waarbij de aantallen varieerden tussen 56 en 3000 gk/cm<sup>2</sup>. In de overige biofilmmonitoren werd het 28S rRNA

gen van *A. fumigatus* aangetroffen in twee of drie biofilmringen gedurende de meetperiode. Deze resultaten laten dus wederom zien dat het niet goed gelukt is om een stabiele populatie met relatief hoge aantallen *A. fumigatus* in de biofilm te krijgen. Hierdoor is het moeilijk om op basis van deze resultaten betrouwbare conclusies te trekken over het effect van de temperatuur op groei van *A. fumigatus* in een natuurlijke drinkwaterbiofilm. *A. fumigatus* werd dus wel op verschillende momenten aangetroffen in een aantal biofilmmonsters van iedere monitor. Dit is een indicatie dat *A. fumigatus* in staat is om zich bij de verschillende geteste temperaturen de biofilm te koloniseren en zich daarin te handhaven.

### 3.3 Discussie

uit de resultaten van de experimenten met de reïncultures blijkt dat de meeste opportunistische pathogenen in staat zijn om zich te vermeerderen bij temperaturen die langdurig kunnen voorkomen in het drinkwaterdistributiesysteem. Of vermeerdering van deze micro-organismen ook daadwerkelijk optreedt, is echter afhankelijk van een aantal andere factoren, waarvan de hoeveelheid afbreekbare stoffen en de aanwezigheid van andere micro-organismen de belangrijkste zijn. Zo is uit eerdere studies bijvoorbeeld gebleken dat *L. pneumophila* als reïncultuur in staat is om zich te vermeerderen bij 20°C, maar dat in natuurlijke biofilms *L. pneumophila* zich pas weet te vermeerderen wanneer de temperatuur 30°C of hoger is (van der Kooij et al., 2009). Dit verschil in minimale groeitemperatuur wordt veroorzaakt doordat bij temperaturen tussen 20 en 30°C andere micro-organismen beter in staat zijn om de niche van *L. pneumophila* te koloniseren. Het kan daarom niet op basis van deze reïncultuurproeven worden geconcludeerd dat de onderzochte opportunistische pathogenen in staat zijn om zich te vermeerderen in het drinkwaterdistributiesysteem wanneer de drinkwatertemperatuur 10-15°C of hoger is. Vandaar dat in een vervolgstap is bepaald wat de invloed van de drinkwatertemperatuur is wanneer deze organismen groeien in de biofilm op PVC-P in de biofilmmonitor.

De temperaturen in deze biofilmmonitoren varieerden van 17,2 tot 40,2°C. De lagere temperaturen die werden getest (< 25°C) zijn temperaturen die momenteel ook meer dan zeven dagen behaald kunnen worden op sommige locaties in het distributiesysteem (Agudelo-Vera et al. 2014). De hogere temperaturen (> 25°C) zijn temperaturen die voorkomen in de drinkwaterinstallaties in gebouwen. De resultaten van de hexa- en pentamonitor laten echter zien dat het niet goed is gelukt om een stabiele en relatief dominante populatie van *M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* te krijgen in de biofilm op de PVC-P ringen. Dit resultaat was onverwacht, omdat vergelijkbare experimenten met *L. pneumophila* en *L. anisa* hebben laten zien dat die twee micro-organismen probleemloos een stabiele populatie in de biofilm vormde met relatief hoge aantallen ( $10^6$  tot  $10^7$  kve/cm<sup>2</sup>). Dit verschil in resultaat tussen *L. pneumophila* en de andere opportunistische pathogenen laat zien dat de groei van *L. pneumophila* wordt bepaald door andere factoren dan de groei van *M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus*. *L. pneumophila* vermeerdert zich in protozoën die grazen op de biofilm, waardoor de biofilmconcentratie ook een rol speelt bij vermeerdering van *L. pneumophila*. De biofilmconcentratie in de experimenten met *L. pneumophila* (van der Kooij et al., 2009) wijken echter niet af van de biofilmconcentraties die zijn gevonden in de hier beschreven studie. Er was dus voldoende biofilm aanwezig voor protozoën om zich te vermeerderen en er zijn geen redenen om aan te nemen dat deze protozoën niet aanwezig waren in de biofilmmonitoren. Blijkbaar zijn *M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* niet in staat zich te vermeerderen in de protozoën die aanwezig zijn in de natuurlijke biofilm op de PVC-P ringen. Eerdere studies hebben laten zien dat *M. avium* en *P. aeruginosa* onder laboratoriumcondities en zonder concurrerende micro-organismen in staat zijn om zich te vermeerderen in bepaalde protozoën (Steinert et al., 1998; Michel et al., 1995), maar deze groei-strategie is dus niet opgetreden in de



biofilmmonitoren. Wanneer het wenselijk is om te achterhalen welke factoren de groei van *M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* in de biofilm bepalen, zal aanvullend onderzoek nodig zijn.

Doordat er geen stabiele en dominante populatie van *M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* werd verkregen in de biofilmmonitoren, is de precieze invloed van temperatuur op groei van deze micro-organismen in de drinkwaterbiofilm moeilijk te achterhalen. Voor *P. aeruginosa* en zeker *A. fumigatus* geldt dat ook bij temperaturen onder de 25°C DNA van deze organismen is aangetroffen in de drinkwaterbiofilm. Dit resultaat is een indicatie dat deze twee micro-organismen de biofilm kunnen koloniseren en handhaven bij drinkwatertemperaturen onder de 25°C. Onduidelijk is of het DNA afkomstig is van dode of levende cellen, waardoor het niet gemakkelijk is om een uitspraak te doen of deze twee micro-organismen ook in staat waren zich te vermeerderen in de biofilm. Het DNA van *A. fumigatus* is echter wel gedurende een periode van 113 dagen waargenomen, en gezien de hoge biologische activiteit in de biofilm is het niet aannemelijk dat dode cellen gedurende zo lange tijd niet worden afgebroken door andere bacteriën of schimmels of opgenomen door grazende protozoën. Dit resultaat lijkt er dus op te wijzen dat *A. fumigatus* in staat was zich ook te vermeerderen in de biofilm. Op basis van de resultaten van dit onderzoek is het dus niet geheel uit te sluiten dat *A. fumigatus* en *P. aeruginosa* zich weten te vermeerderen in het distributiesysteem wanneer de temperatuur lager is dan 25°C. Beide micro-organismen zijn ook gevonden in het gedistribueerde drinkwater en in biofilms uit het distributiesysteem wanneer de drinkwatertemperatuur onder de 25°C is (van der Wielen et al., 2011, van der Wielen, 2013; van der Wielen, 2014). Die resultaten lijken dus ook aan te geven dat deze organismen in staat zijn zich te vermeerderen bij temperaturen die normaal voorkomen in Nederlandse drinkwaterdistributiesystemen.

De experimenten zijn uitgevoerd met PVC-P, dat een worstcase materiaal is voor groei van micro-organismen. Het grootste deel van de materialen in het distributiesysteem bestaat uit asbest-cement, PVC-C en gietijzer, materialen die beduidend minder groeibevorderend zijn dan PVC-P. De groeipotentie van de meeste rubbersoorten (natuurlijk en synthetisch) is wel vergelijkbaar met PVC-P en deze rubberen materialen worden ook in het distributiesysteem toegepast. Het totale oppervlakte van rubber is echter zeer beperkt, maar zouden wel hotspots kunnen zijn voor groei van deze opportunistische pathogenen, zoals ook is waargenomen voor *Legionella* in thermostatische mengkranen (van Hoof et al., 2014).

Om een betrouwbaarder beeld te krijgen over de invloed van temperatuur op vermeerdering van opportunistische ziekteverwekkers in drinkwaterbiofilms, kunnen eventuele vervolggexperimenten beter onder statische condities worden uitgevoerd. De resultaten van hoofdstuk 2 hebben namelijk laten zien dat stabiele populaties van *A. fumigatus* en *P. aeruginosa* wel worden verkregen in de biofilm op PVC-P, wanneer het PVC-P materiaal onder statische condities bij 30°C wordt geïncubeerd.

### 3.4 Conclusies

De onderzochte stammen van *A. fumigatus*, *F. oxysporum*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. avium*, *M. peregrinum* en *M. intracellulare* zijn als reïncultuur in staat om zich te vermeerderen op een agarmedium bij temperaturen die in Nederland voorkomen in het drinkwaterdistributiesysteem.

*M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* zijn niet in staat om stabiele populaties met relatief hoge aantallen te bereiken in biofilms die zich vermeerderen op PVC-P ringen in biofilmmonitoren die worden gevoed met drinkwater van verschillende temperaturen.

In tegenstelling tot *L. pneumophila* zijn *M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* niet in staat om zich te vermeerderen in protozoën die aanwezig zijn op de biofilm die zich heeft gevormd op PVC-P ringen in biofilmmonitoren die worden gevoed met drinkwater van verschillende temperaturen.

De invloed van temperatuur op de groei van *M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* in natuurlijke drinkwaterbiofilms onder dynamische condities kan niet betrouwbaar worden bepaald met de uitgevoerde experimenten in biofilmmonitoren. Het DNA van *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* is echter wel op enig moment aangetroffen in de drinkwaterbiofilms die zich ontwikkelen bij temperaturen lager dan 25°C. Dit resultaat is een indicatie dat deze twee opportunistische pathogenen in staat zijn om onder dynamische condities drinkwaterbiofilms te koloniseren die zich hebben gevormd op materialen die relatief zeer groeibevorderend zijn en zich in deze biofilms kunnen handhaven en mogelijk ook vermeerderen bij drinkwatertemperaturen die ook voorkomen in Nederlandse drinkwaterdistributiesystemen en drinkwaterinstallaties.

### 3.5 Aanbevelingen

Doordat geen stabiele populaties van *M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* in de biofilmmonitoren werd verkregen, is het moeilijk om betrouwbare conclusies te trekken over de rol van de temperatuur bij de groei van deze organismen in het drinkwaterdistributiesysteem. Het lijkt dat *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* in staat zijn zich bij temperaturen tussen 17 en 25°C te vermeerderen. In dat geval is het lastig om beheersmaatregelen te definiëren voor het distributiesysteem, omdat temperaturen van 17°C op de meeste plaatsen in het distributiesysteem worden behaald en niet alleen op specifieke hotspotlocaties.

Het is echter wel aan te bevelen om deze experimenten te herhalen op PVC-P materiaal onder statische condities, waarbij de temperatuur wordt gevarieerd tussen 10 en 40°C. Op die manier wordt het effect van een breder temperatuurbereik op de groei van deze micro-organismen bepaald en kunnen betrouwbaardere conclusies over de rol van temperatuur worden getrokken. Die informatie geeft de drinkwaterbedrijven verdere duidelijkheid of de groei van deze micro-organismen meer gerelateerd zal zijn aan drinkwaterinstallatie, drinkwaterdistributiesysteem of beiden.

Tevens is het belangrijk om te achterhalen waarom deze drie micro-organismen geen stabiele populaties ontwikkelden in de biofilmmonitoren, omdat *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* wel worden aangetroffen in het drinkwaterdistributiesysteem. Wanneer duidelijker wordt welke factoren in het distributiesysteem de groei van deze micro-organismen veroorzaakt, kunnen er ook gerichtere beheersmaatregelen worden gedefinieerd en het effect daarvan op de groei van deze micro-organismen worden onderzocht.

## 4 Conclusies en Aanbevelingen

### 4.1 Conclusies

#### 4.1.1 Groei in drinkwater en/of biofilm

Een drinkwater- en patiëntstam van *P. aeruginosa* zijn in staat om zich te vermenigvuldigen in het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal en reinwater van ps Weesperkarspel wanneer het water is gepasteuriseerd en er dus geen natuurlijke microflora in het water aanwezig is.

Een drinkwater- en/of patiëntstam van *A. fumigatus*, *F. oxysporum*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. peregrinum* en *M. intracellulare* zijn niet in staat om zich te vermeerderen in het gedistribueerde drinkwater van ps Tull en 't Waal en reinwater van ps Weesperkarspel wanneer het water is gepasteuriseerd en geen natuurlijke microflora bevat.

Een drinkwater- en/of patiëntstam van *A. fumigatus*, *P. aeruginosa*, *M. avium* en *M. kansasii* zijn in staat zich te vermeerderen in de biofilm dat is gevormd op PVC-P. *P. aeruginosa* en *M. kansasii* zijn ook in staat zich te vermeerderen in het drinkwater dat in contact staat met PVC-P.

Een patiëntstam van *S. maltophilia* is niet in staat zich te vermeerderen in de biofilm dat is gevormd op PVC-P of in het water dat in contact staat met PVC-P.

*A. fumigatus*, *P. aeruginosa*, *M. avium* en *M. kansasii* lijken dus een belangrijke niche te hebben in de biofilm en de verwachting is dat, wanneer deze organismen voorkomen in het drinkwaterdistributiesysteem, deze organismen zich voornamelijk vermeerderen in de biofilm op de buiswand en/of sediment.

*P. aeruginosa* zou zich ook in het drinkwater kunnen vermeerderen, maar onduidelijk is of deze groei ook optreedt wanneer een natuurlijke microflora met concurrerende micro-organismen aanwezig is in het drinkwater.

#### 4.1.2 Effect van temperatuur

De onderzochte stammen van *A. fumigatus*, *F. oxysporum*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. avium*, *M. peregrinum* en *M. intracellulare* zijn als reïncultuur in staat om zich te vermeerderen op een agarmedium bij temperaturen die in Nederland voorkomen in het drinkwaterdistributiesysteem.

*M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* zijn niet in staat om stabiele populaties met relatief hoge aantallen te bereiken in biofilms die zich vermeerderen op PVC-P ringen in biofilmmonitoren die worden gevoed met drinkwater van verschillende temperaturen.

In tegenstelling tot *L. pneumophila* zijn *M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* niet in staat om zich te vermeerderen in protozoën die aanwezig zijn op de biofilm die zich heeft gevormd op PVC-P ringen in biofilmmonitoren die worden gevoed met drinkwater van verschillende temperaturen.

De invloed van temperatuur op de groei van *M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* in natuurlijke drinkwaterbiofilms onder dynamische condities kan niet betrouwbaar worden bepaald met de uitgevoerde experimenten in biofilmmonitoren. Het DNA van *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* is echter wel op enig moment aangetroffen in de drinkwaterbiofilms op PVC-P ringen die zich ontwikkelen bij temperaturen lager dan 25°C. Dit resultaat is een indicatie dat deze twee opportunistische pathogenen in staat zijn om onder dynamische condities drinkwaterbiofilms te koloniseren die zich hebben gevormd op materialen die relatief zeer groeibevorderend zijn en zich in deze biofilms kunnen handhaven en mogelijk ook vermeerderen bij drinkwatertemperaturen die ook voorkomen in Nederlandse drinkwaterdistributiesystemen en drinkwaterinstallaties.

## 4.2 Aanbevelingen

### 4.2.1 Groei in drinkwater en/of biofilm

De resultaten laten zien dat *A. fumigatus*, *P. aeruginosa*, *M. avium* en *M. kansasii* hun niche hebben in de biofilm. Deze resultaten lijken er dus op te wijzen dat de groei van deze micro-organismen in het drinkwaterdistributiesysteem kan worden beperkt door de mate van biofilmvorming te beperken. Beheersmaatregelen die de mate van biofilmvorming zouden kunnen beperken zijn (i) verlagen van afbreekbare stoffen in het drinkwater, (ii) gebruik van inerte materialen in het distributiesysteem en (iii) verlaging van het ijzergehalte. Aanvullend onderzoek is echter nodig om het effect van dergelijke beheersmaatregelen op de groei van deze opportunistische ziekteverwekkers te bepalen, voordat definitief kan worden geconcludeerd of het beperken van biofilmvorming de groei van deze organismen terugdringt.

### 4.2.2 Effect van temperatuur

Doordat geen stabiele populaties van *M. avium*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* in de biofilmmonitoren werd verkregen, is het moeilijk om betrouwbare conclusies te trekken over de rol van de temperatuur bij de groei van deze organismen in het drinkwaterdistributiesysteem. Het lijkt dat *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* in staat zijn zich bij temperaturen tussen 17 en 25°C te vermeerderen. In dat geval is het lastig om beheersmaatregelen te definiëren voor het distributiesysteem, omdat temperaturen van 17°C op de meeste plaatsen in het distributiesysteem worden behaald en niet alleen op specifieke hotspotlocaties.

Het is echter wel aan te bevelen om deze experimenten te herhalen op PVC-P materiaal onder statische condities, waarbij de temperatuur wordt gevarieerd tussen 10 en 40°C. Op die manier wordt het effect van een breder temperatuurbereik op de groei van deze micro-organismen bepaald en kunnen betrouwbaardere conclusies over de rol van temperatuur worden getrokken. Die informatie geeft de drinkwaterbedrijven verdere duidelijkheid of de groei van deze micro-organismen meer gerelateerd zal zijn aan drinkwaterinstallatie, drinkwaterdistributiesysteem of beiden.

Tevens is het belangrijk om te achterhalen waarom deze drie micro-organismen geen stabiele populaties ontwikkelden in de biofilmmonitoren, omdat *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* wel worden aangetroffen in het drinkwaterdistributiesysteem. Wanneer duidelijker wordt welke factoren in het distributiesysteem de groei van deze micro-organismen veroorzaakt, kunnen er ook gerichtere beheersmaatregelen worden gedefinieerd en het effect daarvan op de groei van deze micro-organismen worden onderzocht.

## 5 Referenties

Agudelo-Vera, C., M. Blokker, P.W.J.J. van der Wielen & B. Raterman. 2014. Drinking water temperatures in future urban areas. BTO report, in preparation, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.

Michel, R., H. Burghardt and H. Bergmann. 1995. *Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. Zentralbl. Hyg. Umweltmed. 196(6), 532-544.

Steinert, M., K. Birkness, E. White, B. Fields and F. Quinn. 1998 *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. Applied and Environmental Microbiology 64(6), 2256-2261.

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. Applied and Environmental Microbiology 44(5), 1086-1095.

van der Kooij, D., A. Brouwer-Hanzens and H.R. Veenendaal. 2009. Invloed van de watertemperatuur op de groei van *Legionella pneumophila* en *Legionella anisa* in biofilms. Rapportnummer KWR 09.056. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.

van der Kooij, D. and P.W.J.J. van der Wielen. 2014. General Introduction. In: Microbial Growth in Drinking-Water Supplies, D. van der Kooij and P.W.J.J. van der Wielen (eds), IWA Publishing, London, pp 1-32.

van der Wielen, P.W.J.J. en D. van der Kooij. 2009. Literatuurstudie naar opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen die zich in drinkwater kunnen vermeerderen. Eigenschappen en prioritering aanvullend onderzoek in relatie tot opwarming van het leidingwater. Rapportnummer BTO(s) 2009.001, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.

van der Wielen, P.W.J.J. en D. van der Kooij. 2011. Opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater. Rapportnummer BTO 2011.035, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.

van der Wielen, P.W.J.J. 2013. Micro-organismen in sedimentfracties en op de buiswand in het voorzieningsgebied van Kamerik. Rapportnummer KWR 2013.019, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.

van der Wielen, P.W.J.J. 2014. Effect van waterkwaliteit, seizoen, drinkwaterinstallatie en verblijftijd/afstand op opportunistische pathogenen in drinkwater. Rapportnummer BTO 2014.015, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.

van Hoof, J., L. M. Hornstra, E. van der Blom, O.W.W. Nuyten & P.W.J.J. van der Wielen. 2014. The presence and growth of *Legionella* species in thermostatic shower mixer taps: an exploratory field study. Building Serv. Eng. Res. Technol. accepted.