



BTO 2016.022 | December 2016

BTO rapport

**Rol van
leidingmateriaal bij
groei van micro-
organismen en
opportunistische
pathogenen**

BTO

Rol van leidingmateriaal bij groei van micro-organismen en opportunistische pathogenen

BTO 2016.022 | December 2016

Opdrachtnummer

400554/007; 400554/009

Projectmanager

Luc Hornstra/Michiel Hootsman

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische activiteit

Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

Auteurs

Paul van der Wielen en Ludmila Bereschenko

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar.

Jaar van publicatie
2016

Meer informatie

Dr. Paul W. J. J. van der Wielen
T 642
E 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
I info@kwrwater.nl
| www.kwrwater.nl

Keywords

Biologische activiteit, leidingmateriaal,
BPP, opportunistische pathogenen



BTO 2016.022 | December 2016 © 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.

Lijst van afkortingen

PE - polyethyleen

PEX-A - polyethyleen gecrosslinkt met de peroxidemethode

PEX-C - polyethyleen gecrosslinkt met electron-beam-processing

PVC-C - nagechloreerde polyvinylchloride

PVC-U - niet gemodificeerd polyvinylchloride

PVC-P - weekgemaakt polyvinylchloride

RVS - roestvrijstaal

EPDM - ethyleen-propyleen-dieen monomeer (synthetisch rubber)

ATP - adenosinetrifosfaat

gk - genkopieën

BP - biomassaproductie

BPP - biomassaproductiepotentie

AGP - *Aeromonas* groei potentie

PaGP - *Pseudomonas aeruginosa* groeipotentie

AfGP - *Aspergillus fumigatus* groeipotentie

MkGP - *Mycobacterium kansasii* groeipotentie

AOC - gemakkelijk assimileerbaar organisch koolstof

BVS - biofilmvormingssnelheid

Samenvatting

Inleiding

Onderzoek bij KWR in het verleden heeft laten zien dat het leidingmateriaal PE meer groeibevorderende stoffen afgeeft dan PVC-C of PVC-U. Doordat groei van micro-organismen op dergelijke stoffen in het distributiesysteem zou kunnen leiden tot nagroeiproblemen, heeft KWR het advies aan de drinkwaterbedrijven gegeven om terughoudend te zijn in het gebruik van PE-materiaal. De afgelopen tien jaar is het gebruik van PE-materialen in het distributiesysteem toegenomen. De reden hiervoor is dat PE-materiaal een aantal voordelen heeft ten opzichte van het gebruik van PVC-U. Daarnaast is de dichtheid van het PE-materiaal steeds hoger geworden. Mogelijk dat PE met deze hogere dichtheid minder groeibevorderende stoffen afgeeft. Daarom is binnen het thematische deel van het BTO een onderzoek uitgevoerd om de biomassaproductiepotentie (BPP) van PE-materialen van verschillende dichtheid en van verschillende fabrikanten te vergelijken en is achterhaald in hoeverre een drinkwaterstam van *Aeromonas* zich op deze materialen weet te vermeerderen tijdens de BPP-test. Eén van de nagroeiproblemen die kan optreden is de vermeerdering van bepaalde opportunistische pathogenen in het distributiesysteem. Daarom is tevens onderzocht in hoeverre de opportunistische pathogenen *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium avium* en *Mycobacterium kansasii* zich weten te vermeerderen tijdens de BPP-test op diverse leidingmaterialen die worden toegepast in het drinkwaterdistributiesysteem en de drinkwaterinstallaties.

Doel

- De invloed van de dichtheid van PE op de BPP vaststellen;
- Achterhalen in hoeverre de groeibevorderende eigenschappen van PE verschillen tussen fabrikanten;
- De invloed van PE-materialen op de vermeerdering van *Aeromonas* vaststellen;
- De invloed van verschillende leidingmaterialen op de groei van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus*, *S. maltophilia* en enkele non-tuberculeuze mycobacteriesoorten bepalen;
- Vaststellen van BPP-criterium voor materialen in het drinkwaterdistributiesysteem.

Materiaal en methoden

De BPP van PE-materialen met drie verschillende dichtheden en van drie fabrikanten, en van glas (negatieve controle), PVC-U en PVC-P (positieve controle) zijn bepaald met de BPP-test. Tevens is bij start van het experiment en na 126 dagen incubatie *Aeromonas* stam M800 toegevoegd aan de BPP-test. Op dag 126 is naast *Aeromonas* ook een mix van opportunistische pathogenen toegevoegd. De groei van opportunistische pathogenen is daarnaast ook op glas, koper, RVS, PVC-C, PE-40, PE-100, PEX-A, PEX-C, EPDM en PVC-P bepaald door op t=0 een mix van opportunistische pathogenen toe te voegen aan de BPP-test. Gedurende de incubatietijd werd zowel het water als de biofilm

van de materialen bemonsterd en onderzocht op ATP, *Aeromonas* en de toegevoegde opportunistische pathogenen.

Resultaten

De ATP-concentratie van het water en van de biofilm waren hoger op verschillende PE-materialen dan op PVC-U en glas. De BPP-waarden van de PE-materialen waren 7,8 tot 21,8 keer hoger dan die van glas, terwijl de BPP-waarde van PVC-U slechts 1,1 keer hoger was dan die van glas. De BPP-waarden van PE-materialen met verschillende dichtheden waren niet verschillend wanneer ze door dezelfde fabrikant werden geleverd. De BPP-waarden van de PE-materialen van fabrikant B waren echter wel beduidend hoger (2,5 tot 3,0 keer) dan de BPP-waarden van PE-materialen van fabrikant A of C.

Correlaties die in het verleden zijn waargenomen tussen de AOC-concentratie in het reinwater en biomassa-productie op glas en tussen de BVS en biomassa-productie op glas zijn gebruikt om een streefwaarde voor de BPP van materialen af te leiden. Deze afgeleide BPP-streefwaarde is 800 pg ATP cm². Materialen die een BPP-waarde hebben onder deze 800 pg ATP cm² verhogen de groei van micro-organismen niet meer dan reinwater met een AOC-concentratie en BVS-waarden onder de streefwwaarden voor biologische stabiliteit (AOC: 10 µg C l⁻¹; BVS: 10 pg ATP cm² d⁻¹).

Kweekbare *Aeromonas* werden niet aangetroffen op de verschillende geteste materialen wanneer *Aeromonas* op dag 0 of dag 126 werd toegevoegd aan de BPP-test. Het 16S rRNA gen van *Aeromonas* werd echter wel gedetecteerd op dag 56 en 112 op PVC-P en PE-100 van fabrikant B (*Aeromonas* toegevoegd op dag 0) en op PE-100 van fabrikant B gedurende de gehele incubatieperiode (dag 126 tot 237) wanneer *Aeromonas* werd toegevoegd op dag 126. PE-100 van fabrikant B was ook het PE-materiaal met één van de hoogste BPP-waarden voor PE in deze studie.

S. maltophilia werd in geen van de geanalyseerde monsters teruggevonden na inoculatie op dag 0 of dag 126. *P. aeruginosa* werd kortstondig (tot 20-40 dagen na inoculatie) gedetecteerd in water en biofilm van de meeste materialen na inoculatie op dag 0 en 126. Op EPDM en PVC-P (na inoculatie op dag 0) werd *P. aeruginosa* echter gedurende de hele incubatieperiode aangetroffen en deze twee materialen bevorderen dus duidelijk de groei van *P. aeruginosa* in de BPP-test.

Het 16S rRNA gen van *M. avium* werd voor de meeste geteste materialen niet of niet structureel aangetroffen in water of biofilm wanneer de materialen op dag 0 werden geïnoculeerd met dit organisme. PVC-P was hier een uitzondering op, waar *M. avium* gedurende de laatste periode van de incubatie (dag 84 tot 112) in relatief hoge aantallen werd aangetroffen. In contrast hiermee werd *M. kansasii* wel in water en biofilm van alle materialen gedurende de incubatieperiode waargenomen wanneer *M. kansasii* op dag 126 werd geïnoculeerd. De groeipotentie van *M. kansasii* op glas en PVC-U waren vergelijkbaar, maar voor de PE-materialen was de groeipotentie hoger (1,2 tot 2,9 keer).

De aantallen *A. fumigatus* in het water en de biofilm van de meeste materialen daalde in eerste instantie na inoculatie op dag 0, maar stabiliseerde vervolgens waardoor ze gedurende de hele incubatieperiode in het water en de biofilm werden waargenomen. Op PVC-P namen de aantallen *A. fumigatus* zelfs toe na inoculatie. De groeipotentie voor *A. fumigatus* was daardoor het hoogst voor PVC-P, terwijl de groeipotentie van de

kunststof materialen, RVS en EPDM licht verhoogd waren ten opzichte van glas. De groeipotentie van *A. fumigatus* op koper was duidelijk lager dan die van glas, wat duidt op remming van *A. fumigatus* door koper. Wanneer op dag 126 de BPP-testen werden geïnoculeerd met *A. fumigatus* dan namen de aantallen in de biofilm op alle materialen kortstondig toe en gedurende de hele incubatieperiode werd *A. fumigatus* aangetroffen in water en biofilm van alle materialen. De groeipotentie van *A. fumigatus* op de PE-materialen en PVC-U was wederom iets hoger dan de groeipotentie op glas.

Conclusies

De dichtheid van PE heeft weinig invloed op de BPP-waarde, terwijl de fabrikant van het PE-materiaal wel een invloed heeft op de BPP-waarde van het PE-materiaal. Doordat de resultaten slechts een momentopname zijn, kan op basis van deze resultaten niet worden geconcludeerd dat PE-materialen van de ene fabrikant structureel hoger liggen dan PE-materialen van andere fabrikanten. Wel kan worden geconcludeerd dat kwaliteitsverschillen tussen (batches van) PE-materialen met dezelfde dichtheid dusdanig groot kunnen zijn, dat ze een significant effect hebben op de mate waarin groeibevorderende stoffen worden afgegeven.

Een BPP-streefwaarde van 800 pg ATP cm⁻² is berekend voor materialen waarbij deze streefwaarde dezelfde mate van microbiële groei veroorzaakt als reinwater met de streefwaarde voor AOC en BVS.

Glas, PVC-U en de meeste PE-materialen bevorderen de groei van *Aeromonas* onder statische condities niet, maar wanneer het PE-materiaal relatief veel groeibevorderende stoffen afgeeft, kan *Aeromonas* zich in de biofilm vermeerderen. Hierbij wordt wel benadrukt dat deze *Aeromonas*-bacteriën niet kweekbaar zijn volgens de standaard kweekmethode voor *Aeromonas* in drinkwater.

Uit de resultaten van de incubatie-experimenten met opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen in de BPP-test voor materialen volgt dat het gebruik van EPDM en/of PVC-P het hoogste risico geeft voor groei van *P. aeruginosa*, *M. avium*, *M. kansasii* en *A. fumigatus*, zeker wanneer deze organismen aanwezig zijn als zich nog geen biofilm op het materiaal heeft gevormd. Het effect van de verschillende PE-materialen op groei van deze opportunistische ziekteverwekkers was over het algemeen beperkt. Alleen voor *M. kansasii* werd waargenomen dat het PE-materiaal met de hoogste BPP-waarden (PE van producent B) ook de hoogste *M. kansasii* aantallen had.

Aanbevelingen

Er wordt aanbevolen om als drinkwatersector de eis te hanteren dat alleen PE-materialen met een BPP-waarde van 800 pg ATP cm⁻² of lager worden toegepast in het drinkwaterdistributiesysteem. Zolang fabrikanten nog niet aan deze eis kunnen voldoen, is het advies om voorlopig terughoudend te blijven in het gebruik van PE-materiaal in het drinkwaterdistributiesysteem. In ieder geval tot duidelijk is dat wanneer een PE-type van een fabrikant een BPP-waarde van 800 pg ATP cm⁻² of lager heeft, deze waarde ook geldt voor andere batches van hetzelfde PE-type van dezelfde fabrikant.

Om een beter inzicht te krijgen in de oorzaak van de waargenomen verschillen tussen de PE-materialen, is het aanbevelingswaardig voor de kunststofsector om aanvullend onderzoek uit te voeren naar (i) de groeibevorderende eigenschappen van de

verschillende grondstoffen die worden toegepast in PE en (ii) groeibevorderende eigenschappen van het PE-materiaal te onderzoeken voor en na het trekken van de buis.

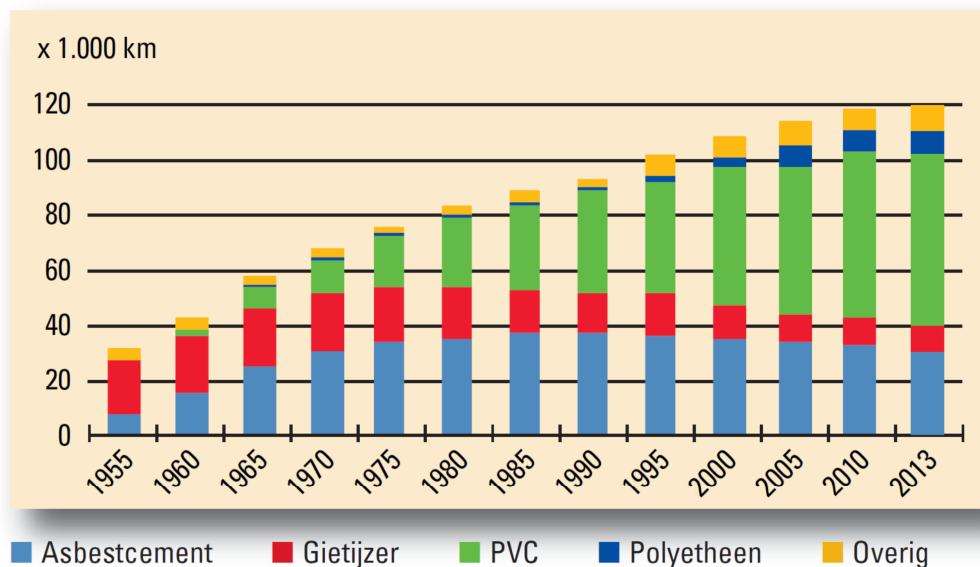
Inhoud

1	Introductie	9
1.1	Leidingmaterialen	9
1.2	Doel	11
2	Materiaal en Methoden	13
2.1	BPP en <i>Aeromonas</i> -groeipotentie van verschillende PE-materialen	13
2.2	Invloed van materialen op groei van opportunistische ziekteverwekkers	13
2.3	Analyses	14
3	Resultaten	15
3.1	Biomassaproductiepotentie PE-materialen	15
3.2	Invloed van materialen op groei van opportunistische ziekteverwekkers	21
4	Discussie	39
4.1	Invloed van materialen op groei van opportunistische pathogenen	39
4.2	Biomassaproductiepotentie PE-materialen	44
5	Conclusies en aanbevelingen	49
5.1	Conclusies	49
5.2	Aanbevelingen	50
6	Referenties	53

1 Introductie

1.1 Leidingmaterialen

Het Nederlandse drinkwater wordt via het distributiesysteem getransporteerd naar de klant. Tijdens dit transport in het distributiesysteem komt het drinkwater in contact met leidingmaterialen die in het distributiesysteem worden toegepast. In de afgelopen 60 jaar is het type leidingmateriaal veranderd onder invloed van de productie van synthetische polymeren (Figuur 1.1). Hierdoor is het relatieve aandeel van asbestcement en gietijzer in het distributiesysteem de afgelopen decennia flink afgenomen, terwijl het aandeel PVC-U sterk is toegenomen. Een andere trend is dat polyetheen de afgelopen tien jaar steeds vaker wordt toegepast. Naast het distributiesysteem stroomt het drinkwater ook door de drinkwaterinstallatie van gebouwen. Ook in gebouwen verandert het materiaalgebruik voor drinkwaterinstallaties, waarbij koper steeds vaker wordt vervangen door polyethyleen materialen.



Figuur 1.1. Materiaalgebruik in het distributiesysteem van 1955 t/m 2013 (uit Drinkwaterstatistieken 2014, Vewin).

Leidingmaterialen kunnen een invloed hebben op de waterkwaliteit doordat ze onder andere groeibevorderende stoffen kunnen afgeven of stoffen die de groei van micro-organismen remmen en/of beperken. In het verleden is door KWR (destijds nog Kiwa) de biomassaproductiepotentie (BPP) test voor materialen ontwikkeld, waarmee de groeibevorderende eigenschappen van materialen onder statische condities kan worden gekwantificeerd (van der Kooij et al. 2006). De resultaten van die test hebben laten zien dat materialen een aanzienlijke invloed kunnen hebben op de groei van micro-organismen. Zo is bijvoorbeeld waargenomen dat de hoeveelheid actieve biomassa meer dan 100 keer hoger kan zijn wanneer sommige rubbermaterialen worden gebruikt in vergelijking tot een inert materiaal als glas. PE-materialen kunnen ook een substantiële verhoging van de hoeveelheid actieve biomassa veroorzaken (tot

meer dan 10 keer in vergelijking met glas), terwijl PVC-C of PVC-U materialen de hoeveelheid actieve biomassa slechts zeer beperkt verhogen (van der Kooij et al. 2006, van der Kooij & Veenendaal, 2007a). Een verhoging van de actieve biomassa in het distributiesysteem kan tot problemen leiden, zoals groei van opportunistische ziekteverwekkers, esthetische klachten (geur/smaak, bruinwaterklachten en dierlijke organismen), technische klachten (dierlijke organismen die watermeters verstoppert, corrosie) en overschrijding van de wettelijke norm voor *Aeromonas*. Daarom is het verschil in BPP tussen PE en PVC-U/C de reden waarom KWR het advies aan de drinkwaterbedrijven heeft gegeven om terughoudend te zijn in het gebruik van PE-materiaal in het distributiesysteem.

In een BTO-project uit 2012 is onderzocht in hoeverre PE of PVC-U materiaal dat lang in het distributiesysteem heeft gelegen (25 tot 40 jaar) nog steeds evenveel groeibevorderende stoffen afgeeft dan materiaal dat slechts kort in het distributiesysteem heeft gelegen (< 1 jaar) (Bereschenko, 2013). De resultaten van die studie lieten zien dat de mate van afgifte van groeibevorderende stoffen niet lijkt te zijn afgenomen gedurende de tijd dat het materiaal in het distributiesysteem ligt. Daarnaast werd gezien dat de hoeveelheid actieve biomassa van de biofilm die op deze materialen is ontwikkeld gedurende de jaren dat het in het distributiesysteem ligt, vergelijkbaar is met de hoeveelheid actieve biomassa in de biofilm die wordt waargenomen met de BPP-methode. Dit laat zien dat de BPP-methode een goede voorspelling geeft van de hoeveelheid actieve biomassa die door het materiaal in de praktijk kan worden veroorzaakt.

De afgelopen tien jaar is het gebruik van PE-materialen in het distributiesysteem toegenomen (Figuur 1.1). De reden hiervoor is dat PE-materiaal een aantal voordelen heeft ten opzichte van het gebruik van PVC-U. Zo is PE-materiaal gemakkelijker te leggen, omdat het oprolbaar is en daardoor over een grote lengte kan worden gelegd zonder dat stukken aan elkaar moeten worden gelast. PVC-U daarentegen is niet oprolbaar, waardoor de stukken regelmatig aan elkaar moeten worden gelast. Daarnaast is PE ook flexibeler waardoor het bij zetting van de bodem minder snel zal breken dan PVC-U. Over de afgelopen decennia is de dichtheid van het PE-materiaal veranderd, waarbij het materiaal een steeds hogere dichtheid heeft gekregen. Mogelijk dat deze dichtheidsverandering ook een invloed heeft op de groeibevorderende stoffen die het materiaal afgeeft. Daarnaast is ook onduidelijk in hoeverre de groeibevorderende eigenschappen van PE-leidingmateriaal verschillen tussen fabrikanten.

Eén van de mogelijke problemen met verhoogde biofilmconcentraties die worden veroorzaakt door afgifte van groeibevorderende stoffen van materialen is dat bepaalde opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen zich weten te vermeerderen. Het effect van verschillende materialen op groei van *Legionella pneumophila* is in het verleden vastgesteld en de resultaten hebben laten zien dat wanneer groeibevorderende stoffen uit materialen een biofilmconcentratie van meer dan 400 pg ATP cm⁻² veroorzaken, *L. pneumophila* in staat is zich te vermeerderen (van der Kooij & Veenendaal, 2007b). Dergelijke biofilmconcentraties werden waargenomen bij PE-materialen, verschillende rubbertypen en PVC-P, maar niet voor PVC-C, PVC-U, RVS, koper en glas. Naast *L. pneumophila* kunnen ook andere opportunistische ziekteverwekkers (o.a. *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* en *Stenotrophomonas maltophilia*) zich in het drinkwaterecosysteem vermeerderen (van der Wielen & van der Kooij, 2011; van der Wielen, 2014). Onduidelijk is echter in

hoeverre de groeibevorderende stoffen van verschillende materialen de groei van deze organismen beïnvloed.

1.2 Doel

- De invloed van de dichtheid van PE op de BPP vaststellen;
- Achterhalen in hoeverre de groeibevorderende eigenschappen van PE verschillen tussen fabrikanten;
- De invloed van PE-materialen op de vermeerdering van *Aeromonas* vaststellen;
- De invloed van verschillende leidingmaterialen op de groei van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus*, *S. maltophilia* en enkele non-tuberculeuze mycobacteriesoorten bepalen;
- Vaststellen van BPP-criterium voor materialen in het drinkwaterdistributiesysteem.

2 Materiaal en Methoden

2.1 BPP en *Aeromonas*-groeipotentie van verschillende PE-materialen

2.1.1 Materialen

Polyethyleen (PE) leidingmaterialen van drie verschillende producenten (A, B en C) werden onderzocht op de BPP en *Aeromonas*-groeipotentie (AGP). PE-40 van producent A, PE-80 van producent B en C en PE-100 van alle drie de producenten werden in de experimenten gebruikt. Hierbij verwijst het getal achter PE naar de dichtheid van het PE-materiaal (pers. comm. Tinus de Lange, Wavin), waarbij een hogere waarde een hogere dichtheid aanduidt. Daarnaast werden ook PVC-U, glas (negatieve controle) en PVC-P (positieve controle) onderzocht.

2.1.2 Biomassaproductiepotentietest

De biomassaproductiepotentie (BPP) van de verschillende materialen werd bepaald met behulp van de BPP-test volgens NEN-EN 16421:2014. In het kort betekent dit dat van ieder materiaal in duplo stukken van 50 cm² werden gesneden. De materiaalstukken werden vervolgens toegevoegd aan een AOC-vrije fles waar 900 ml drinkwater van het KWR laboratorium aan werd toegevoegd. De flessen zijn vervolgens geënt met een rivierwater (NEN-EN 16421:2014) en *Aeromonas* stam M800. De flessen werden vervolgens gedurende 16 weken geïncubeerd bij 25°C, waarbij het drinkwater wekelijks werd verversd. Na 8, 12 en 16 weken werd het materiaal en het drinkwater bemonsterd en werd de ATP-concentratie van de biofilm en het water bepaald. Deze waarden werden vervolgens gebruikt om de BPP in pg ATP cm⁻² uit te rekenen.

2.1.3 *Aeromonas*-groeipotentie

In dezelfde BPP-test werd ook de *Aeromonas*-groeipotentie (AGP) van de verschillende materialen bepaald. Hiervoor werd, naast een rivierent, *Aeromonas* stam M800 op tijdstip 0 aan de flessen toegevoegd. Na 18 weken werd *Aeromonas* (samen met vier opportunistische pathogenen, zie paragraaf 2.2) opnieuw aan alle flessen toegevoegd en werden de flessen nogmaals 20 weken (totaal 36 weken) geïncubeerd bij 25°C met wekelijkse verversing van het drinkwater. Na 56, 84, 112, 126, 132, 139, 153, 181, 209 en 237 dagen werden het water en de materialen bemonsterd en geanalyseerd op ATP, kweekbare *Aeromonas* en aantal 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas*. De *Aeromonas*-aantallen bepaald met de qPCR op ieder meetmoment na de tweede inoculatie op week 20 werden vervolgens gebruikt om de AGP te berekenen. Hiervoor werden de aantallen in het water omgerekend naar de hoeveelheid oppervlakte van het materiaal dat in het water aanwezig was. Het *Aeromonas*-aantal in genkopieën (gk) cm⁻² werd vervolgens berekend door de som van de *Aeromonas*-aantallen in de biofilm en het water te nemen. Tot slot werd de AGP uitgerekend door het geometrisch gemiddelde te berekenen van de *Aeromonas*-aantallen (in gk cm⁻²) op dag 132, 139, 153, 181, 209 en 237.

2.2 Invloed van materialen op groei van opportunistische ziekteverwekkers

De invloed van materialen op groei van opportunistische ziekteverwekkers werd in twee fasen onderzocht. In de eerste fase werden de groeipotentie van *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium avium* en *Aspergillus fumigatus* op glas (negatieve controle), PVC-P (positieve controle), RVS, koper, PVC-C, PE-40, PE-100, PEX-A, PEX-C en EPDM onderzocht (Tabel 2.1). Deze groeipotentie werd bepaald door grotendeels het protocol van de BPP-test te volgen (NEN-EN 16241:2014)

zoals kort is beschreven in 2.1.2. Er zijn echter twee verschillen met de officiële BPP-test: i) bij start van de experimenten werd een inoculum met *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. avium* en *A. fumigatus* toegevoegd aan de flessen met materialen en ii) het water werd bemonsterd op dag 0, 7, 13, 27, 41, 55, 69, 83, 99 en 113 en de biofilm op dag 7, 27, 55, 83 en 113. De monsters werden geanalyseerd op ATP als maat voor de hoeveelheid actieve biomassa en kweekbare *P. aeruginosa*. Daarnaast werd DNA uit de monsters geïsoleerd en werden het aantal genkopieën van het *regA* gen van *P. aeruginosa*, 16S rRNA gen van *M. avium*, *chitA* gen van *S. maltophilia* en het 18S rRNA gen van *A. fumigatus* bepaald met behulp van qPCR (van der Wielen et al. 2014). Deze gegevens werden vervolgens gebruikt om de BPP van het materiaal te bepalen en om het geometrisch gemiddelde van iedere geteste opportunistische ziekteverwekker in de biofilm en water te berekenen, waarna de aantallen in het water werden omgerekend naar de hoeveelheid oppervlakte die in het water aanwezig was. Deze aantallen werden vervolgens opgeteld bij de aantallen van de biofilm, die op dezelfde dag werden bepaald. Daarna werd de groeipotentie van iedere opportunistische pathogeen bepaald door het geometrisch gemiddelde (\times / geometrische standaarddeviatie) van deze opgetelde aantallen op dag 7, 27, 55, 83 en 113 te berekenen.

Tabel 2.1. Materialen die zijn gebruikt in fase 1 en fase 2 van het onderzoek naar groei van opportunistische pathogenen.

Onderzoek	Onderzochte materialen
Fase 1	Glas, PVC-P, RVS, koper, PVC-C, PE-40, PE-100, PEX-A, PEX-C, EPDM
Fase 2	Glas, PVC-P, PVC-U, PE-40 A, PE-80 B, PE-80 C, PE-100 A, PE-100 B, PE-100 C

In de tweede fase werden dezelfde materialen onderzocht als beschreven in paragraaf 2.1.1 (Tabel 2.1). Zoals beschreven in paragraaf 2.1.2 werden op tijdstip 0 een rivierent en *Aeromonas* toegevoegd aan de flessen met de materialen. Na 18 weken werden *P. aeruginosa*, *M. kansasii*, *S. maltophilia* en *A. fumigatus* aan deze flessen met materialen toegevoegd. Op tijdstip 126, 132, 139, 153, 181, 209 en 237 dagen werden het water en de materialen bemonsterd en werden de volgende parameters gekwantificeerd: ATP, kweekbare *P. aeruginosa*, *regA* gen *P. aeruginosa*, 16S-23S ITS gen *M. kansasii*, *chitA* gen *S. maltophilia* en 18S rRNA gen van *A. fumigatus*. De groeipotentie van de verschillende pathogenen werd vervolgens berekend zoals in bovenstaande paragraaf is beschreven, maar dan met de aantallen verkregen op dag 132, 139, 153, 181, 209 en 237.

2.3 Analyses

De ATP-concentraties van de watermonsters en biofilmmonsters werden bepaald conform NEN-EN 16421. De kolonievormende eenheden van *Aeromonas* werden bepaald volgens NEN 6263, terwijl de kolonievormende eenheden van *P. aeruginosa* werden bepaald volgens ISO 16266. DNA van water- en biofilmmonsters werd geïsoleerd en gebruikt als template voor kwantitatieve PCR (qPCR) voor *Aeromonas* spp., *P. aeruginosa*, *M. avium*, *M. kansasii*, *S. maltophilia* en *A. fumigatus*. Een beschrijving van de verschillende qPCR-methoden zijn elders te vinden (van der Wielen et al. 2014; van der Wielen & Lut, 2016).

3 Resultaten

3.1 Biomassaproductiepotentie PE-materialen

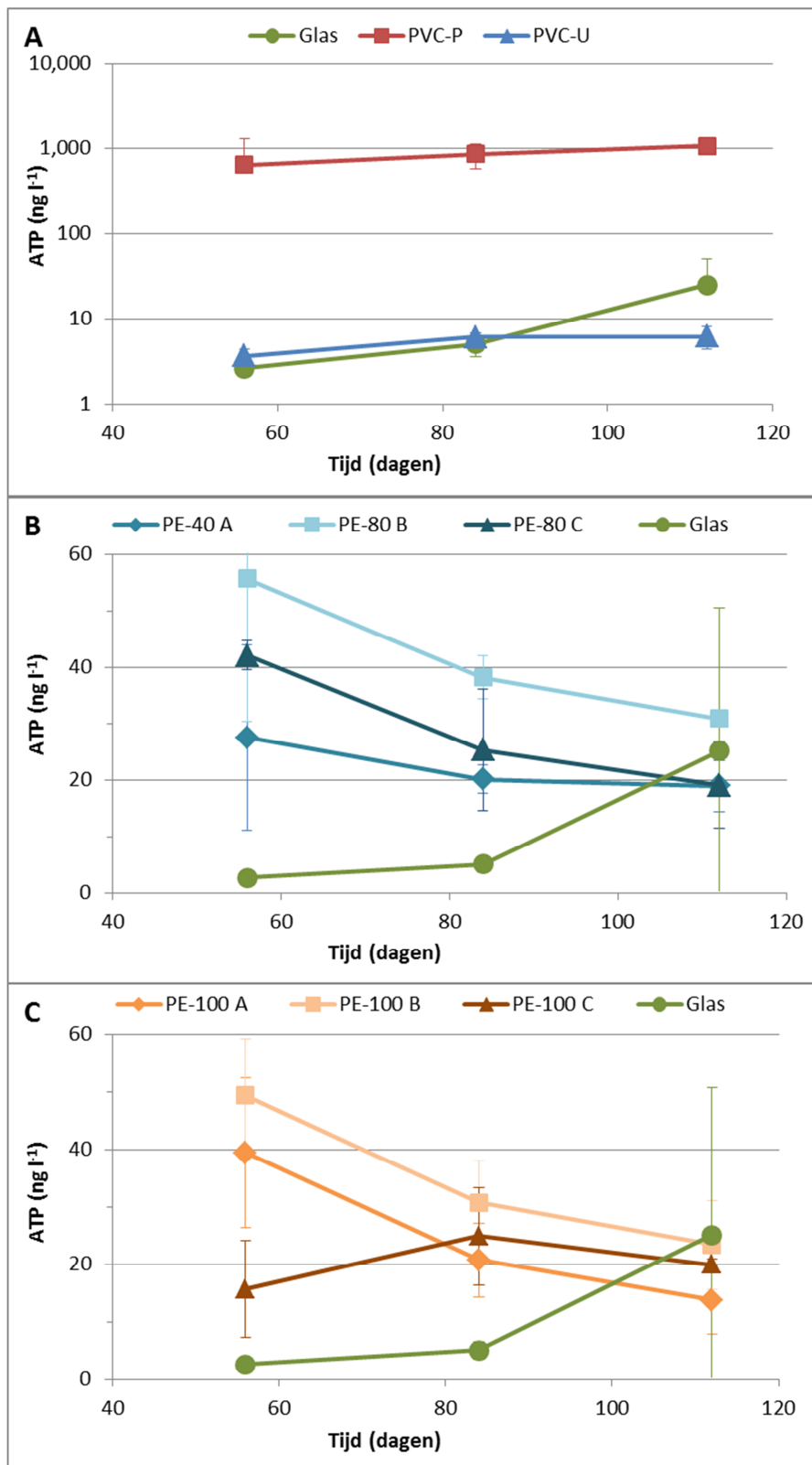
3.1.1 Planktonische groei en biofilmgroei

De ATP-concentraties van het water en de biofilm op de materialen voor dag 56, 84 en 112 zijn weergegeven in Figuur 3.1 en 3.2. Uit deze figuren volgt dat de ATP-concentraties in het water minder stabiel waren tijdens de periode van 56 t/m 112 dagen dan de ATP-concentraties van de biofilm. De resultaten laten zien dat de ATP-concentraties van het water over het algemeen onder de 10 ng l^{-1} lagen voor het inerte materiaal glas. Op dag 112 was de ATP concentratie van het water in contact met glas beduidend hoger ($25,1 \text{ ng ATP l}^{-1}$). Deze afwijkende hoge waarde werd veroorzaakt doordat één van de twee duplo flessen een hele hoge waarde had (43 ng ATP l^{-1}), terwijl de andere fles een ATP-waarde had die ook onder de 10 ng ATP l^{-1} lag. De ATP-concentratie van het water van de positieve controle (PVC-P) was ongeveer $1000 \text{ ng ATP l}^{-1}$ (Figuur 3.1). PVC-U, dat ook veelvuldig in het distributiesysteem als leidingmateriaal wordt gebruikt, liet vergelijkbare ATP-concentraties van het water zien dan die met glas werden gevonden. De ATP-concentraties van het water dat in contact staat met de verschillende PE-materialen waren duidelijk hoger (concentraties over het algemeen hoger dan 20 ng ATP l^{-1}) dan de ATP-concentraties die met glas of PVC-U werden gevonden. De hoogste ATP-concentraties in water met de PE-materialen werden waargenomen voor PE-80 en PE-100 van producent B.

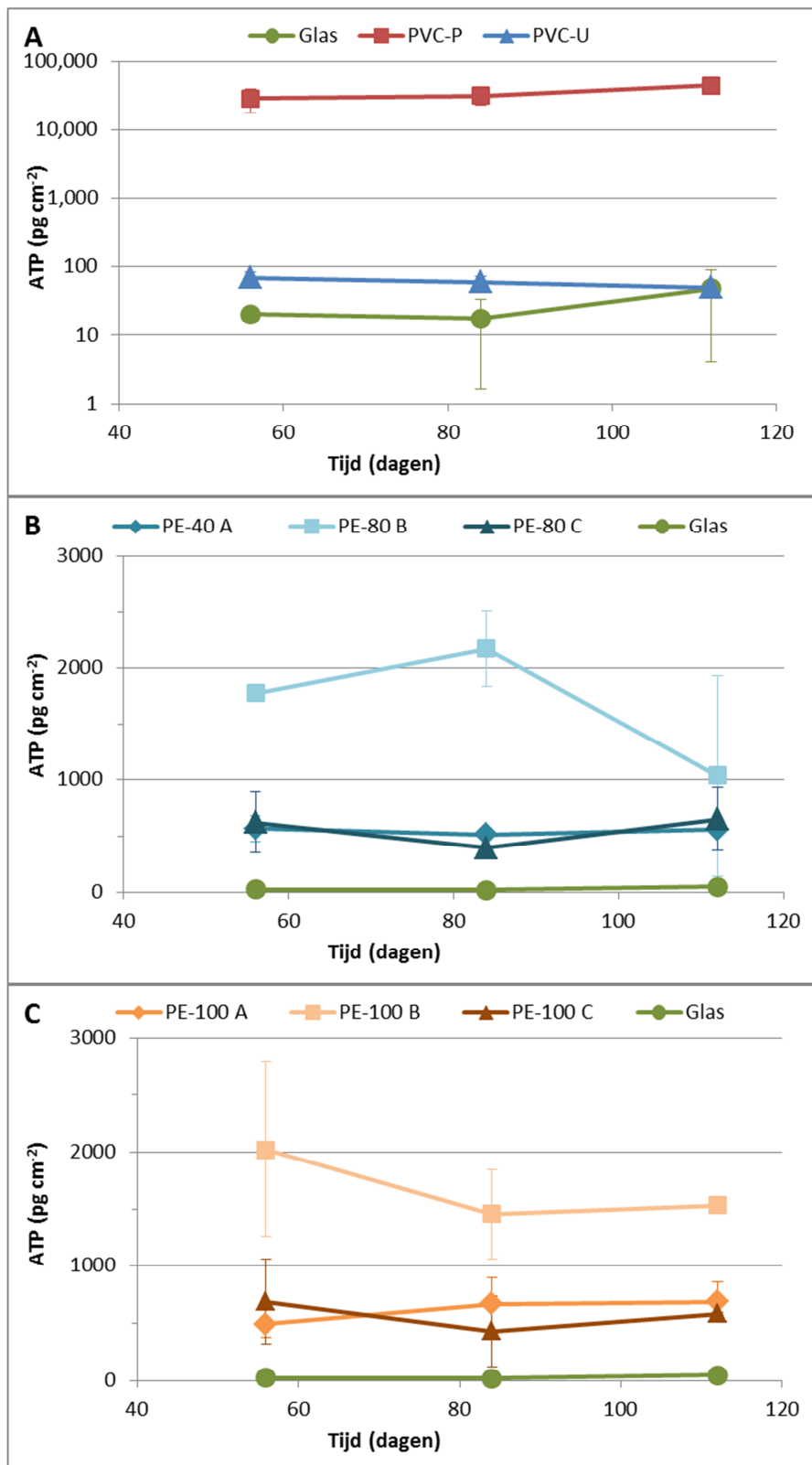
De biofilmconcentratie op glas was op dag 56 en 84 rond de $20 \text{ pg ATP cm}^{-2}$; op dag 112 werd op glas een hoge biofilmconcentratie in één van de twee flessen waargenomen ($78 \text{ pg ATP cm}^{-2}$), terwijl de biofilmconcentratie in de andere fles vergelijkbaar was met de eerdere waarden ($16 \text{ pg ATP cm}^{-2}$). De hoogste biofilmconcentraties werden waargenomen op PVC-P, dat als een positieve controle werd meegenomen in de test. De ATP-concentraties van de biofilm op PVC-U waren relatief laag ($< 70 \text{ pg ATP cm}^{-2}$), terwijl de ATP concentraties van de PE-materialen duidelijk hoger waren (over het algemeen $> 500 \text{ pg ATP cm}^{-2}$). De hoogste waarden werden waargenomen voor de twee PE-materialen van producent B ($> 1000 \text{ pg ATP cm}^{-2}$).

3.1.2 BPP-waarden

Met behulp van de ATP-concentratie van het water en de biofilm werd de BPP van elk materiaal berekend. De BPP-waarden van de materialen zijn weergegeven in Tabel 3.1, terwijl in Tabel 3.2 de BPP-waarden zijn gecorrigeerd voor de blanco (glas). Deze laatste waarden zijn berekend volgens NEN-EN 16421:2014 en deze waarden geven de BPP weer die door de groeibevorderende stoffen uit het materiaal zijn veroorzaakt. De BPP-waarde van het inerte materiaal (glas) was $85,6 \pm 103,1 \text{ pg ATP cm}^{-2}$. De relatief hoge standaarddeviatie van glas werd veroorzaakt door de afwijkende ATP-concentraties in één van de twee flessen op dag 112. Zonder die afwijkende waarden was de BPP van glas $44,0 \pm 14,2 \text{ pg ATP cm}^{-2}$. De ATP-waarden op het inerte materiaal glas voldoen wel aan de voorwaarde dat de BPP van glas in de test onder de $100 \text{ pg ATP cm}^{-2}$ moet zijn. De BPP van de positieve controle PVC-P was $39.983 \text{ pg ATP cm}^{-2}$, dat 467 keer hoger is dan van het inerte materiaal glas. De BPP-waarde van deze positieve controle voldoet ook aan de voorwaarden van de BPP-test waarin staat dat de BPP van PVC-P boven de $10.000 \text{ pg ATP cm}^{-2}$ moet zijn.



Figuur 3.1. ATP concentraties van het water dat in contact staat met verschillende leidingmaterialen tijdens de BPP-test. A: Glas, PVC-P en PVC-U (ATP-waarden uitgezet op logaritmische schaal i.t.t. Figuur B en C); B: PE-40 bedrijf A, PE-80 bedrijf B en C en glas; C: PE-100 van bedrijf A, B en C en glas.



Figuur 3.2. ATP concentraties van de biofilm op verschillende leidingmaterialen tijdens de BPP-test. A: Glas, PVC-P en PVC-U (ATP-waarden uitgezet op logaritmische schaal i.t.t. Figuur B en C); B: PE-40 bedrijf A, PE-80 bedrijf B en C en glas; C: PE-100 van bedrijf A, B en C en glas.

Tabel 3.1 De biomassaproductiepotentie van de verschillende materialen zonder correctie voor de blanco (glas).

Materiaal	Fabrikant	Biomassaproductiepotentie (pg ATP cm ⁻²)		Verhoging t.o.v glas
		Gemiddelde	Stdev	
Glas	-	85,6	103	-
PVC-P	-	39.983	8.090	467 keer
PVC-U	-	90,7	18	1,1 keer
PE-40	A	669	321	7,8 keer
PE-80	B	1.870	573	21,8 keer
PE-80	C	727	254	8,5 keer
PE-100	A	753	225	8,8 keer
PE-100	B	1.841	513	21,5 keer
PE-100	C	683	316	8,0 keer

De BPP-waarde van PVC-U was vergelijkbaar met de BPP-waarde van glas en dit materiaal geeft dus nauwelijks groeibevorderende stoffen af voor micro-organismen om op te groeien. Dit in tegenstelling tot de verschillende PE-materialen waar de BPP-waarden varieerden van 669 tot 1870 pg ATP cm⁻², wat 7,8 tot 21,8 keer hoger is dan de BPP-waarde van glas. De afgifte van groeibevorderende stoffen die uit het PE-materiaal beschikbaar komen voor groei van micro-organismen veroorzaken dus 7,8 tot 21,8 keer meer actieve biomassa dan uit een inert materiaal of het geteste PVC-U materiaal. De gegevens van Tabel 3.1 en 3.2 laten zien dat de BPP-waarden tussen PE-materialen ook behoorlijk kan verschillen. De BPP-waarden van PE-40 en PE-100 van producent A en van PE-80 en PE-100 van producent C waren vergelijkbaar, maar de BPP-waarden van PE-80 en PE-100 van producent B waren ongeveer 2,5 tot 3,0 keer hoger dan de BPP-waarden van de andere materialen. Deze resultaten laten zien dat er dus kwaliteitsverschillen tussen dezelfde PE-typen (zoals bijvoorbeeld PE-80 of PE-100) kunnen voorkomen.

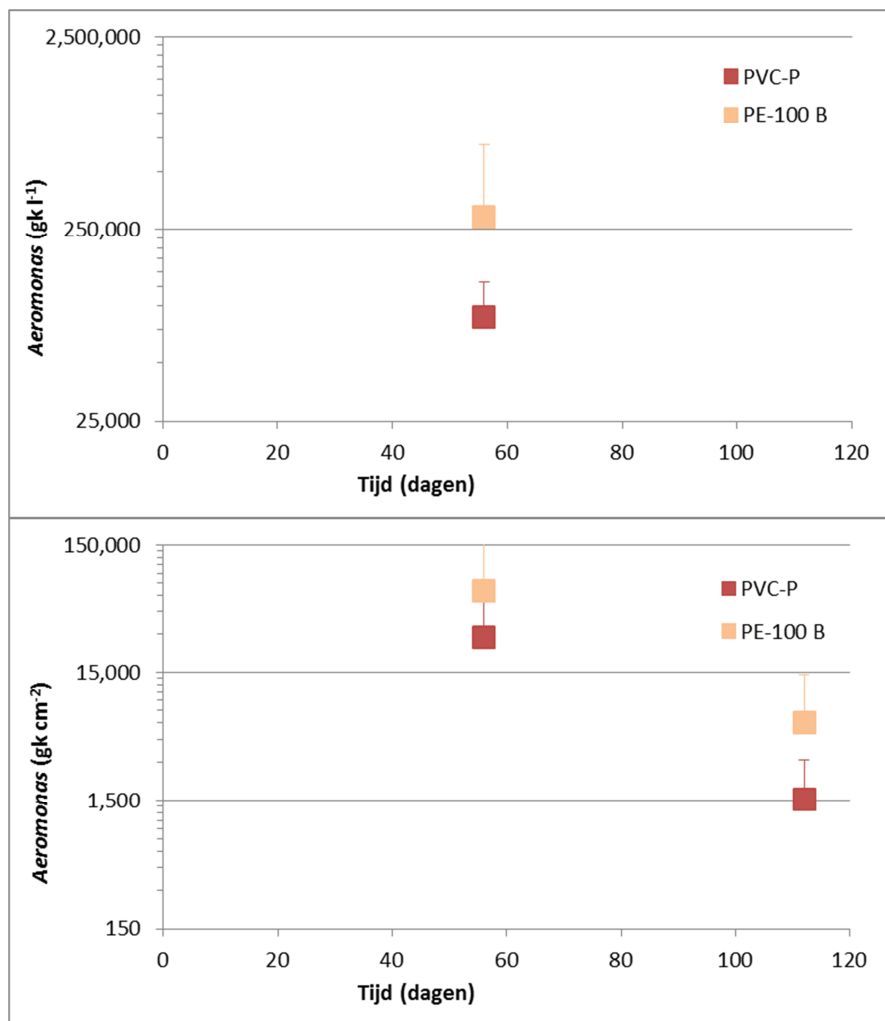
Tabel 3.2 De biomassaproductiepotentie van de verschillende materialen berekend volgens NEN-EN 16421:2014 (met correctie voor blanco glas).

Materiaal	Fabrikant	Biomassaproductiepotentie (pg ATP cm ⁻²)	
		Gemiddelde	Stdev
PVC-U	-	35,9	20,6
PE-40	A	583,3	337,2
PE-80	B	1784,1	544,7
PE-80	C	641,4	147,1
PE-100	A	667,7	194,5
PE-100	B	1755,8	523,7
PE-100	C	597,8	332,5

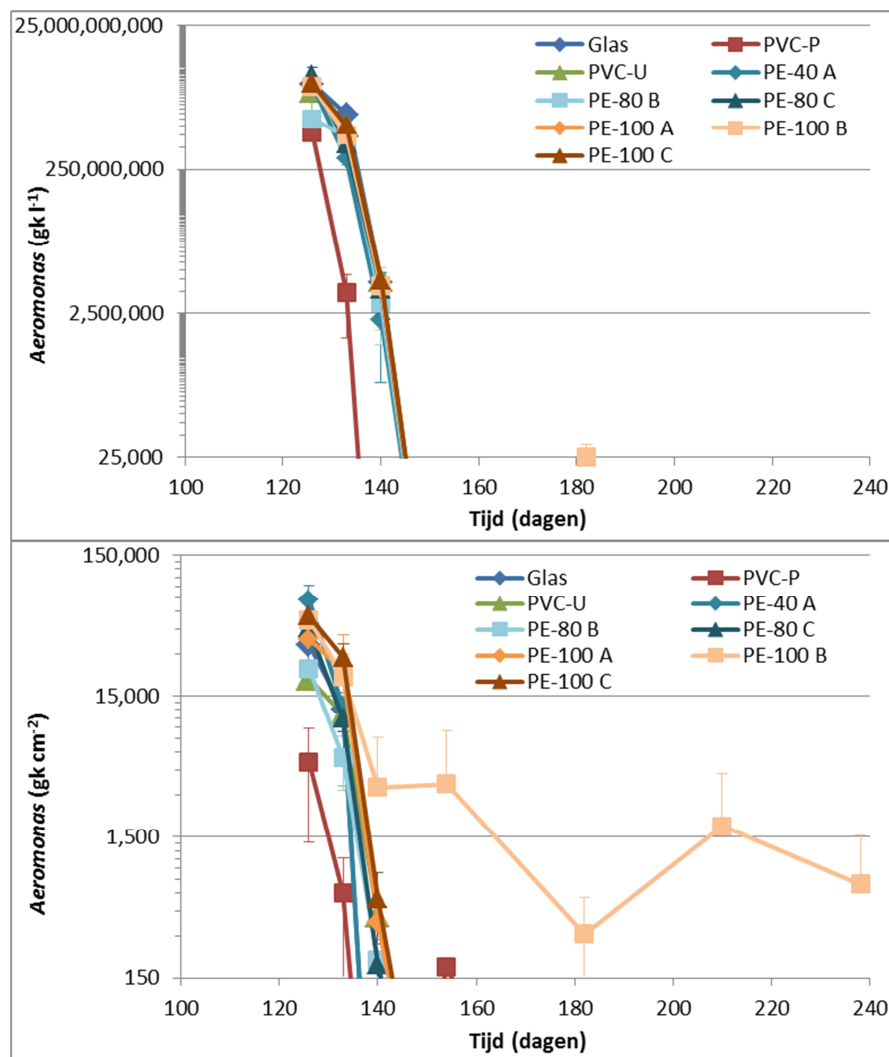
3.1.3 *Aeromonas*-groeipotentie materialen

Naast de BPP werd ook de *Aeromonas*-groeipotentie (AGP) van de verschillende materialen bepaald. Hiervoor werden de verschillende flessen met materialen op dag 0 geïnoculeerd met *Aeromonas* stam M 800 en werden op dag 56 en 112 het water en materiaal onderzocht op de aanwezigheid van *Aeromonas* door ze te kweken op een selectief agarmedium en het 16S rRNA gen van *Aeromonas* te kwantificeren met qPCR. In alle gevallen was de kweek negatief, maar op dag 56 werd het 16S rRNA gen van

Aeromonas in relatief hoge aantallen waargenomen met PVC-P en PE-100 van producent B (water en biofilm op materiaal) (Figuur 3.3). Op dag 112 werd het 16S rRNA gen van *Aeromonas* nog steeds in de biofilm op deze materialen aangetroffen, maar niet langer in het water. Het aantal genkopieën in de biofilm waren echter lager op dag 112 dan op dag 56. Het 16S rRNA gen van *Aeromonas* werd bij geen van de andere materialen aangetroffen (water en biofilm), wat betekent dat de aantallen lager waren dan $2,5 \times 10^4$ gk l^{-1} en $1,5 \times 10^2$ gk cm^{-2} . Gedurende de eerste 112 dagen was de AGP van de materialen dus laag, wanneer *Aeromonas* op dag 0 werd geïnoculeerd.



Figuur 3.3 Aantal genkopieën (gk) van het 16S rRNA gen van *Aeromonas* in het water in contact met PVC-P en PE-100 van producent B (boven) en van *Aeromonas* in de biofilm op PVC-P en PE-100 van producent B (onder).



Figuur 3.4 Aantal genkopieën (gk) van het 16S rRNA gen van *Aeromonas* in het water in contact met de verschillende geteste materialen (boven) en van *Aeromonas* in de biofilm op de verschillende geteste materialen (onder).

Een mogelijke verklaring voor deze lage AGP is dat *Aeromonas* niet behoort tot de bacteriën die primair groeien op de groeibevorderende stoffen die de materialen afgeven, maar dat ze afhankelijk zijn van nutriënten die worden vrijgemaakt door andere micro-organismen die wel op deze groeibevorderende stoffen groeien. Wanneer deze verklaring juist is, dan zijn levensvatbare *Aeromonas*-cellen mogelijk al afgestorven of verwijderd, voordat ze een kans hadden om zich secundair te vermeerderen in de biofilm en het water. Daarom werden de flessen met materialen op dag 126 opnieuw geïnoculeerd met *Aeromonas* stam M800 en werden op verschillende momenten de aantallen *Aeromonas* in het water en biofilm bepaald. Direct na het enten van *Aeromonas*, werden in het water van alle flessen kweekbare *Aeromonas*-aantallen gevonden (tussen 210 en 270 kve l⁻¹). Zeven, 14 en 112 dagen na het enten werden opnieuw kweekbare *Aeromonas*-aantallen bepaald van het water en op het materiaal, maar in geen enkel monster werden kweekbare *Aeromonas*-aantallen aangetroffen. Naast kweekbare *Aeromonas* werden ook het aantal 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas* bepaald en de aantallen die zijn aangetroffen in het water en de biofilm zijn weergegeven in Figuur 3.4. Bij alle materialen nam het aantal 16S rRNA genkopieën van

het water met dezelfde snelheid af na inoculatie met *Aeromonas* en na vier weken werden bij de meeste materialen geen 16S rRNA genkopieën in het water meer gedetecteerd. De enige uitzondering is het PE-100 van producent B, waar op dag 182 nog *Aeromonas* in het water werd waargenomen. Het aantal 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas* in de biofilm op de materialen nam ook relatief snel af en de aantallen in de biofilm waren na vier weken ook onder de detectielimiet, behalve voor PVC-P en PE-100 van producent B. PVC-P had nog één positief biofilmmonster na deze vier weken, terwijl op PE-100 van producent B het 16S rRNA gen van *Aeromonas* stabiliseerde rond 900 gk cm². Op dit materiaal lijkt *Aeromonas* zich dus in de biofilm te handhaven, maar deze *Aeromonas*-bacteriën waren niet kweekbaar. De berekende AGPs (bepaald met de qPCR voor *Aeromonas*) van de verschillende materialen zijn weergegeven in Tabel 3.2.1. De AGP van de meeste materialen waren vergelijkbaar met die van glas, wat betekent dat de meeste materialen die zijn getest de groei van *Aeromonas* niet bevorderen. Uitzonderingen hierop waren de PE-100 materialen van producent A en B. Het PE-100 materiaal van producent A zorgde voor een kleine verhoging (2,1 keer) van de AGP, maar het PE-100 materiaal van producent B verhoogde de AGP substantieel (466 keer)(Tabel 3.2.1). Het PE-100 materiaal van producent B is ook het materiaal met de hoogste BPP-waarde van de verschillende geteste PE-materialen. De resultaten laten dus zien dat de meeste PE-materialen de groei van *Aeromonas* onder statische condities niet bevorderen, maar wanneer het PE-materiaal relatief veel groeibevorderende stoffen afgeeft, kan *Aeromonas* zich in de biofilm handhaven. Hierbij wordt wel benadrukt dat deze *Aeromonas*-bacteriën niet kweekbaar waren volgens de standaard kweekmethode voor *Aeromonas* in drinkwater.

Tabel 3.2.1. De groeipotentie van *Aeromonas* stam M800 gedurende dag 132 tot 237 (PaGP₁₃₂₋₂₃₇) op verschillende materialen uitgedrukt in 16S rRNA genkopieën per cm² (gk cm²).

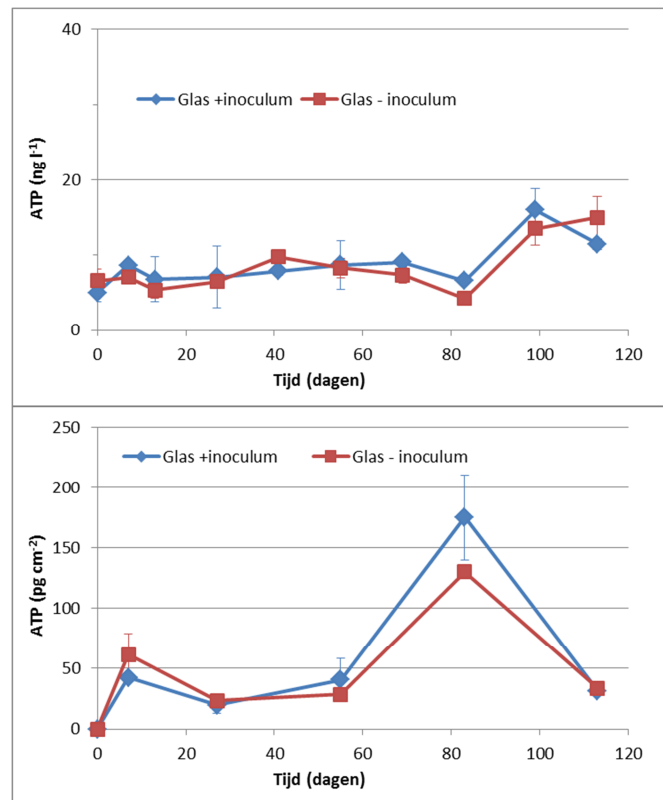
Materiaal	Fabrikant	AGP ₁₃₂₋₂₃₇ (gk cm ²)	
		Geom gemid	Verhoging t.o.v glas
Glas	-	17,4	
PVC-P	-	2,5	-
PVC-U	-	16,8	-
PE-40	A	11,3	-
PE-80	B	13,5	-
PE-80	C	14,9	-
PE-100	A	41,9	2,4
PE-100	B	8106	466
PE-100	C	17,0	-

3.2 Invloed van materialen op groei van opportunistische ziekteverwekkers

3.2.1 Fase 1: Effect van rubber, kunststof en metalen leidingmaterialen

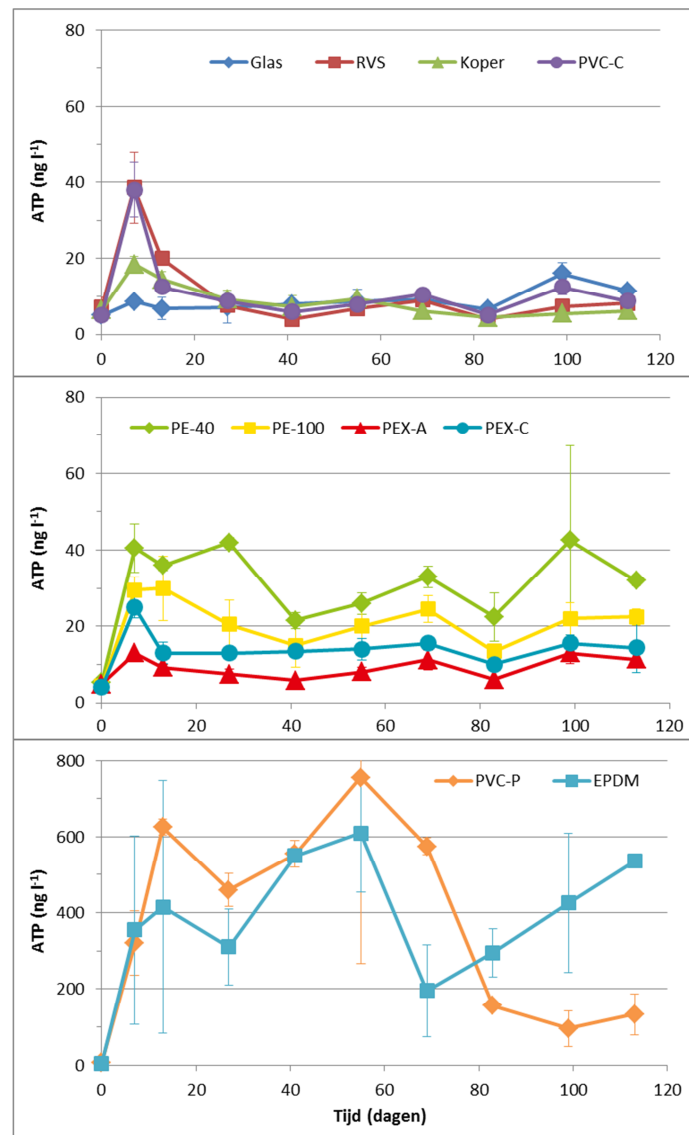
Als eerste is getest of het toevoegen van een mix van verschillende pathogenen aan de flessen met materialen een invloed had op de biomassavorming in het water en/of materialen gedurende de looptijd van het experiment. Om dit te onderzoeken werd deze mix van opportunistische pathogenen wel en niet toegevoegd aan het inerte materiaal glas, en werden gedurende 113 dagen water- en biofilmmonsters onderzocht op de hoeveelheid ATP. De resultaten lieten zien dat de biomassahoeveelheid in het water en de biofilm niet werd beïnvloed door het toevoegen van de ent met vier opportunistische pathogenen (Figuur 3. 5). Dit betekent dus dat het toevoegen van deze

ent geen invloed had op de mate van biomassavorming in de flessen met materialen en dat de groei van micro-organismen alleen werd veroorzaakt door de afbreekbare stoffen in het water en/of de materialen.



Figuur 3.5. ATP-vorming in het water en in de biofilm op glas met en zonder een ent van vier opportunistische ziekteverwekkers.

Daarnaast is ook onderzocht of in de flessen met glas en PVC- de onderzochte opportunistische pathogenen van nature aanwezig waren door geen mix van de vier opportunistische pathogenen toe te voegen. Geen van de onderzochte opportunistische pathogenen werden waargenomen in het water of de biofilm op glas en PVC-P zonder inoculatie. Dit betekent dat de resultaten van de experimenten niet worden verstoord door stammen van opportunistische pathogenen die van nature voorkomen in drinkwater.

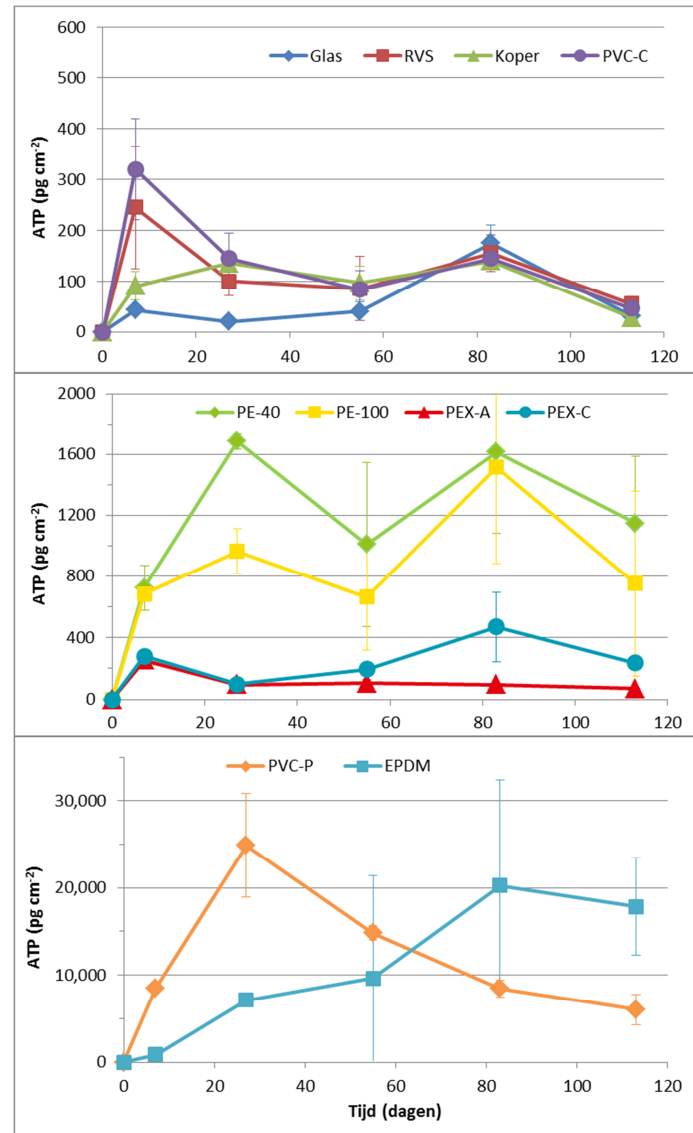


Figuur 3.6. Biomassaproductie in water (ng ATP l⁻¹) dat in contact staat met verschillende materialen.

3.2.1.1 Biomassaproductiepotentie materialen

De groei van micro-organismen in het water en op de biofilm van de verschillende materialen is weergegeven in Figuur 3.6 en 3.7. Uit deze figuren volgt dat de initiële groei van micro-organismen relatief snel was. De ATP-concentratie van het water had voor de meeste materialen een maximum op dag 7, waarna de ATP-concentratie weer afnam en stabiliseerde vanaf dag 40 (Figuur 3.6). Bij de materialen waar relatief veel groei in het water optrad (EPDM en PVC-P), werd de maximum ATP-concentratie in het water later bereikt en bleef de ATP-concentratie gedurende de incubatieperiode van 112 dagen ook meer variëren. De ATP-concentratie van de biofilm op de materialen liet voor RVS en PVC-C ook een duidelijk piek zien op dag 7, waarna de ATP-concentratie afnam en stabiliseerden vanaf dag 27. De ATP-concentratie van de biofilm op glas, koper, PEX-A en PEX-C was vanaf dag 7 al stabiel, terwijl de ATP-concentratie op PE-40 en PE-100 toenam tot dag 21 en vanaf dat moment relatief stabiel was. De ATP-concentratie op PVC-P piekte op dag 21, waarna de concentratie daalde, terwijl bij EPDM

de ATP-concentratie tot dag 84 toenam. Op deze twee materialen was de ATP-concentratie vanaf dag 84 relatief stabiel.



Figuur 3.7. Biomassaproductie in de biofilm (pg ATP cm⁻²) dat in contact staat met verschillende materialen.

De minste biomassa werd gevormd op glas en koper. Doordat glas geen groeibevorderende stoffen afgeeft, werd de biomassavorming in het water en biofilm van dit materiaal veroorzaakt door de afbreekbare stoffen die in het water aanwezig waren. De hoeveelheid biomassa op RVS, PVC-C en PEX-A was over het algemeen ook redelijk vergelijkbaar met glas, op een piekconcentratie op dag 7 na. Blijkbaar bevatten deze materialen een spoortje van (gemakkelijk) afbreekbare stoffen, die binnen 7 tot 21 dagen werden afgebroken. PE-100 en PE-40 hadden duidelijk hogere ATP-concentraties in het water en biofilm dan glas gedurende de gehele incubatieperiode, terwijl de ATP-

concentraties met PEX-C tussen de waarden voor glas en deze twee PE-materialen was. De hoogste ATP-concentraties werden echter waargenomen voor EPDM en PVC-P, materialen die dus de meeste groeibevorderende stoffen afgeven.

Tabel 3.3 De biomassaproductiepotentie (BPP) van de verschillende materialen zonder correctie voor de blanco (glas - inoculum).

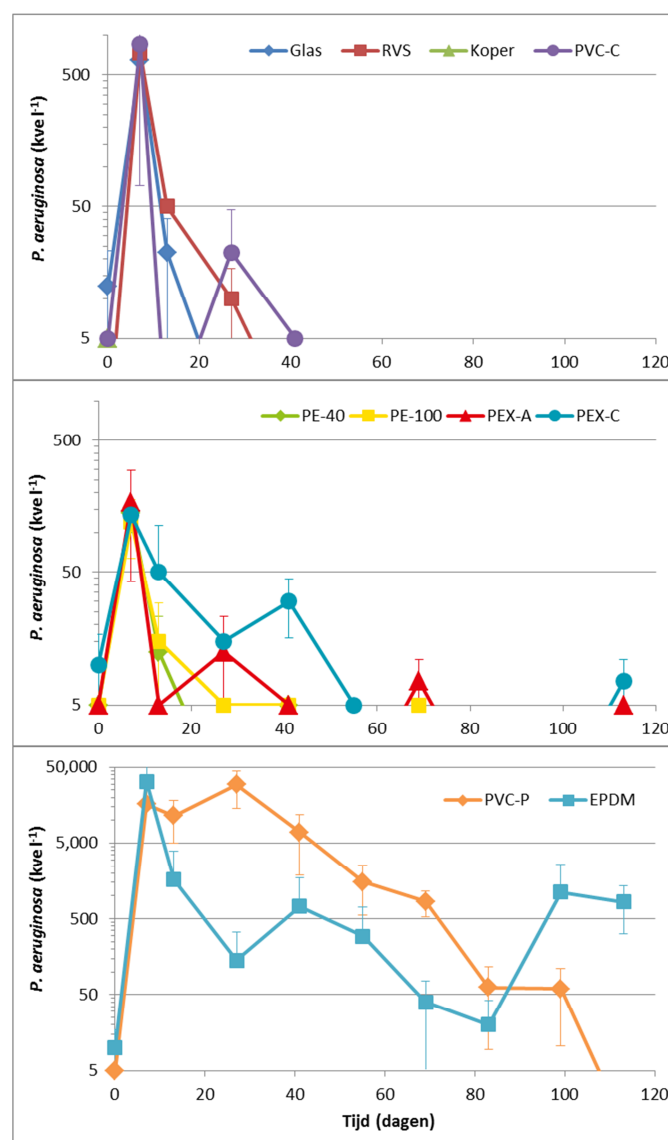
Materiaal	BPP (pg ATP cm ²)		Verhoging t.o.v glas - inoculum
	Gemiddelde	Stdev	
Glas - inoculum	120,6	11,0	-
Glas + inoculum	137,0	30,9	1,1 keer
Koper	126,8	21,9	1,1 keer
PVC-C	129,6	22,9	1,1 keer
RVS	135,9	45,2	1,1 keer
PEX-A	137,2	17,0	1,1 keer
PEX-C	376,1	134,3	3,1 keer
PE-100	1.077	541,7	8,9 keer
PE-40	1.402	488,9	12 keer
PVC-P	11.564	1.425	96 keer
EPDM	19.132	11.094	159 keer

De ATP-resultaten van water en biofilm gemeten op dag 56, 84 en 112 werden gebruikt om de BPP-waarden uit te rekenen (Tabel 3.3). De BPP-waarde van glas zonder inoculum was $120,6 \pm 11,0$ pg ATP cm², dat in vergelijking tot eerdere BPP-testen relatief hoog is voor glas. Deze BPP-waarde van glas voldoet niet aan de NEN-EN 16421:2014 voorwaarde dat de BPP-waarde van glas lager dan 100 pg ATP cm² moet zijn. Het is onduidelijk wat de oorzaak is geweest van de relatief hoge BPP-waarde voor glas gedurende de test. Doordat het glas niet aan de NEN-EN voorwaarde voldoet, werden de BPP-waarden voor de verschillende materialen niet gecorrigeerd voor de waarde van glas. Normaliter zouden de BPP-waarden voor de materialen ongeveer 50 pg ATP cm² lager zijn door de correctie met de glaswaarde. De BPP-waarden van koper, PVC-C, RVS en PEX-A waren vergelijkbaar met de BPP-waarde van glas en dit geeft aan dat deze materialen weinig groeibevorderende stoffen afgeven. PEX-C had een verhoogde BPP-waarde, maar deze waarde was nog steeds relatief laag, dus ook PEX-C gaf een beperkte hoeveelheid groeibevorderende stoffen af. De BPP-waarden van PE-100 en PE-40 waren wel duidelijk hoger (8,9 tot 11,6 keer) dan glas en deze twee materialen gaven dus relatief veel groeibevorderende stoffen af (zoals ook is gebleken uit resultaten beschreven in paragraaf 3.1). De hoogste BPP-waarden werden waargenomen voor PVC-P en EPDM en deze waarden waren 96 en 159 keer hoger dan glas. De BPP-waarde van EPDM had een hoge standaarddeviatie die voornamelijk werd veroorzaakt doordat één van de twee duplo's op dag 56 een relatief lage biomassapotentie (BP) had en op dag 84 een relatief hoge BP-waarde. Van de materialen die zijn getest gaven PVC-P en EPDM dus de meeste groeibevorderende stoffen af. De BPP-waarde van PVC-P voldeed wel aan de NEN-EN 16421:2014 voorwaarde dat dit materiaal een BPP-waarde hoger dan 10.000 pg ATP cm² moet hebben.

3.2.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

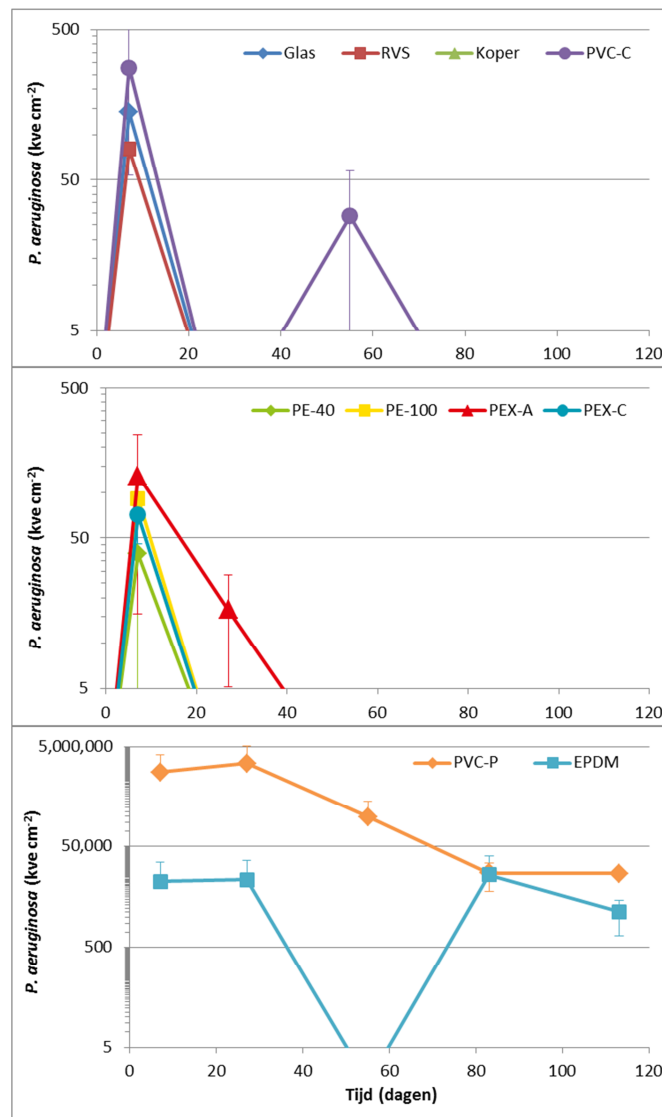
Kweekbare *P. aeruginosa* werd teruggevonden in het water en biofilm van alle materialen waar *P. aeruginosa* op dag 0 aan is toegevoegd (Figuur 3.8 en 3.9). In het water met het inerte glas namen de aantallen *P. aeruginosa* toe van dag 0 tot 7, waarna de aantallen weer afnamen en vanaf dag 21 werd *P. aeruginosa* niet meer in dit water

waargenomen. In de biofilm op het glas werd *P. aeruginosa* alleen op dag 7 waargenomen. Doordat glas geen groeibevorderende stoffen afgeeft, werd de kortstondige groei van *P. aeruginosa* met glas veroorzaakt door de afbreekbare stoffen die in het drinkwater aanwezig zijn. De resultaten met RVS, PVC-C, PEX-A, PEX-C, PE-100 en PE-40 waren redelijk vergelijkbaar met glas. Bij deze materialen werden de maximale aantallen in het water en de biofilm ook op dag 7 waargenomen, met aantallen die vergelijkbaar of lager waren dan de aantallen met glas. Bij enkele van deze materialen was de afname van *P. aeruginosa* na dag 7 langzamer dan voor glas. In het water van PE-100, PEX-C en PEX-A werd *P. aeruginosa* na dag 60 een enkele keer waargenomen, maar met aantallen die net boven de detectielimiet van de methode was. In de biofilm op RVS, PEX-C, PE-100 en PE-40 werd *P. aeruginosa* ook alleen op dag 7 aangetroffen. In



Figuur 3.8 Kolonievormende eenheden (kve) per liter van *P. aeruginosa* in het water dat in contact staat met verschillende materialen in de BPP-test.

de biofilm op PVC-C werd *P. aeruginosa* naast dag 7 ook op dag 55 aangetroffen, terwijl in de biofilm op PEX-A *P. aeruginosa* naast dag 7 ook op dag 27 werd aangetroffen. In de flessen met koper als materiaal werden kweekbare *P. aeruginosa* niet waargenomen in het water of de biofilm. De hoogste aantallen *P. aeruginosa* werden aangetroffen in het water en biofilm met EPDM en PVC-P. De aantallen in het water van deze materialen waren 45 tot 51 keer hoger dan de aantallen die werden waargenomen in het water met glas, terwijl de aantallen in de biofilm op EPDM 97 keer hoger en in de biofilm op PVC-P zelfs $1,6 \times 10^4$ keer hoger waren dan de aantallen in de biofilm op glas. *P. aeruginosa* werd op deze twee materialen ook gedurende de hele incubatieperiode waargenomen, met uitzondering van dag 55. Op die dag werd *P. aeruginosa* niet aangetroffen op het EPDM materiaal, maar deze waarneming lijkt een uitbijter te zijn in vergelijking tot de waarnemingen die op de andere dagen waren uitgevoerd.



Figuur 3.9 Kolonievormende eenheden (kve) per cm² van *P. aeruginosa* in de biofilm op verschillende materialen die in contact staan met water in de BPP-test. De resultaten voor PVC-P e EPDM zijn op logaritmische schaal uitgezet (C) i.t.t. tot de resultaten van de andere materialen (A en B).

Om de *P. aeruginosa* groeipotentie (PaGP) van de verschillende materialen te kunnen bepalen werden de aantallen *P. aeruginosa* van water per dag omgerekend naar

aantallen per cm² en deze aantallen werden vervolgens opgeteld bij de aantallen van de biofilm die op dezelfde dag werden bepaald. Daarna werd de *P. aeruginosa* groeipotentie bepaald door het geometrisch gemiddelde (\pm geometrische standaarddeviatie) van deze opgetelde aantallen op dag 7, 28, 56, 84 en 112 te berekenen. De PaGP van glas was laag (Tabel 3.4) en omdat glas geen groeibevorderende stoffen afgeeft, is deze groeipotentie het gevolg van de afbreekbare stoffen in het water. De PaGP van koper, PE-40, PEX-C, RVS en PE-100 was vergelijkbaar of lager dan de groeipotentie van glas. De PaGP van PEX-A en PVC-C waren verhoogd ten opzichte van glas, maar ook deze groeipotenties waren nog steeds erg laag. Relatief hoge PaGPs werden waargenomen met EPDM en PVC-P. Het EPDM materiaal liet duidelijke verschillen zien tussen de twee ingezette flessen met EPDM. Eén fles had een relatief hoge PaGP, terwijl de PaGP van de andere fles beduidend lager was. In deze laatste fles werd wel waargenomen dat de aantallen *P. aeruginosa* aan het einde van de incubatieperiode sterk toenam en misschien dat de groeipotentie van deze tweede fles met EPDM hoger was geweest als de incubatieperiode was verlengd. De resultaten laten dus zien dat de afgifte van groeibevorderende stoffen door de meeste materialen onvoldoende was om groei van *P. aeruginosa* te veroorzaken. Alleen EPDM en PVC-P gaven dusdanig veel groeibevorderende stoffen af, dat *P. aeruginosa* tot relatief hoge aantallen kon uitgroeien wanneer deze materialen in contact komen met (drink)water. De resultaten van de qPCR voor het *regA* gen van *P. aeruginosa* zijn niet betrouwbaar, doordat blanco monsters en PCR blanco's positief waren voor het *regA* gen, wat duidt op een laboratoriumcontaminatie. De *P. aeruginosa* qPCR resultaten van deze materialen worden daarom niet verder besproken.

Tabel 3.4 De groeipotentie van *P. aeruginosa* (PaGP; is geometrisch gemiddelde \times geometrische standaarddeviatie van opgetelde aantallen biofilm en water van dag 7, 28, 26, 84 en 112) op verschillende materialen.

Materiaal	PaGP (kve cm ⁻²)		Verhoging t.o.v glas
	Geom gemiddelde	Geom stdev	
Glas	0,4	25,9	-
Koper	< 0,1		-
PEX-C	0,2	25,0	-
PE-100	0,3	25,8	-
PE-40	0,3	14,5	-
RVS	0,3	21,8	-
PEX-A	0,9	40,8	2,1
PVC-C	1,6	44,0	3,7
EPDM I	10,7	104,6	25,0
EPDM II	$2,2 \times 10^3$	48,6	$5,1 \times 10^3$
PVC-P	$1,7 \times 10^5$	11,4	$4,0 \times 10^5$

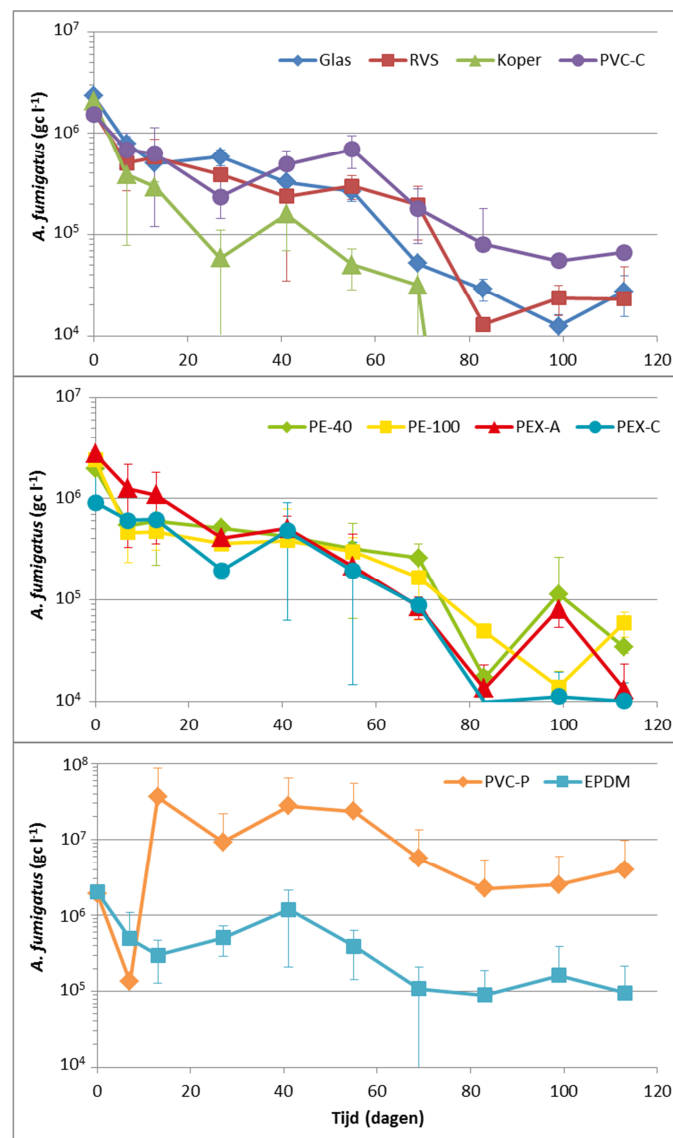
3.2.1.3 *Mycobacterium avium*

Voor geen van de geteste materialen werd *M. avium* teruggevonden in het water, wat er op duidt dat groei van *M. avium* in de waterfase niet optrad. *M. avium* werd ook niet gedetecteerd in de biofilm op de meeste materialen. Uitzonderingen waren (i) de biofilm die zich ontwikkelde op het RVS-materiaal waar één van de twee ingezette monsters op dag 84 positief was voor *M. avium* (61 gk cm⁻²), (ii) de biofilm op PE-40 waar op dag 56 *M. avium* werd aangetroffen (fles 1: 61 gk cm⁻²; fles 2: 120 gk cm⁻²) en (iii) de biofilm op PVC-P waar werd waargenomen dat *M. avium* aan het einde van de incubatieperiode (dag 84 en 112) in de biofilm aanwezig was (71 en 510 gk cm⁻²). De

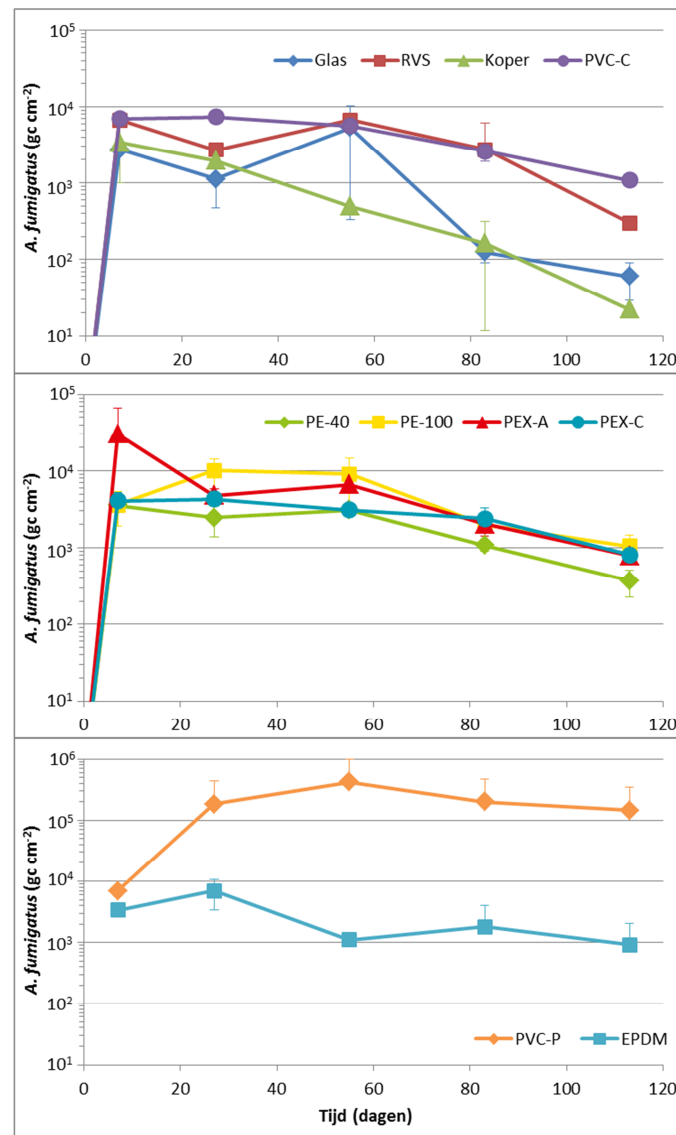
resultaten laten dus zien dat de geteste materialen niet of weinig groeibevorderend zijn voor *M. avium* gedurende de incubatieperiode. Doordat op PVC-P *M. avium* vanaf dag 84 tot 112 wel in de biofilm aanwezig was, blijft onduidelijk of *M. avium* in dat geval de biofilm langdurig zou kunnen koloniseren.

3.2.1.4 *Stenotrophomonas maltophilia*

S. maltophilia werd in geen van de water- en/of biofilmmonsters waargenomen. De groei van de geteste stam van *S. maltophilia* wordt dus duidelijk niet verhoogd door afgifte van groeibevorderende stoffen uit leidingmaterialen.



Figuur 3.10 Het aantal genkopieën (gc) per liter van het 18S rRNA gen van *A. fumigatus* in het water dat in contact staat met verschillende materialen in de BPP-test.



Figuur 3.11 Het aantal genkopieën (gc) per cm² van het 18S rRNA gen van *A. fumigatus* in de biofilm op verschillende materialen die in contact staan met water in de BPP-test.

3.2.1.5 *Aspergillus fumigatus*

Het aantal genkopieën van het 18S rRNA gen van *A. fumigatus* in het water van glas was het hoogst op dag 0 (inoculum) en daarna namen de aantallen af tot dag 84. Van dag 84 tot 112 bleef het aantal genkopieën relatief constant (Figuur 3.9). De aantallen *A. fumigatus* in het water dat in contact stond met de verschillende kunststof materialen (PVC-C, PE-40, PE-100, PEX-A en PEX-C) lieten gedurende dag 0 t/m 84 eenzelfde verloop zien als glas. Na dag 84 stabiliseerde *A. fumigatus* zich ook in het water van deze kunststof materialen, maar de aantallen waren daarbij hoger dan op glas, behalve voor PEX-C, waar de aantallen lager waren dan voor glas. Het aantal 18S rRNA genkopieën in het water met koper waren op dag 0 vergelijkbaar met glas, maar deze aantallen daalden sneller dan die in het water van glas of de kunststof materialen. Waarschijnlijk werken de vrijgekomen koperionen als een fungicide, waardoor *A. fumigatus* afstierf. De aantallen *A. fumigatus* in het water met EPDM hadden dezelfde aantallen op t=0 als glas, maar de afname gedurende de eerste 84 dagen was beperkter. Waar de aantallen in het water met glas een afname van ongeveer 2 log lieten zien, namen de aantallen in

het water met EPDM maar met 1 log af. Tevens werd waargenomen dat de aantallen in het water met EPDM vanaf dag 69 stabiel bleven. In tegenstelling tot de andere materialen namen het aantal 18S rRNA genkopieën van *A. fumigatus* in water met PVC-P toe tijdens de eerste 14 dagen van de incubatieperiode. Daarna bleven de aantallen ongeveer 40 dagen stabiel, waarna ze licht daalden en vanaf dag 84 stabiliseerden op een relatief hoog niveau (5×10^6 gk l⁻¹).

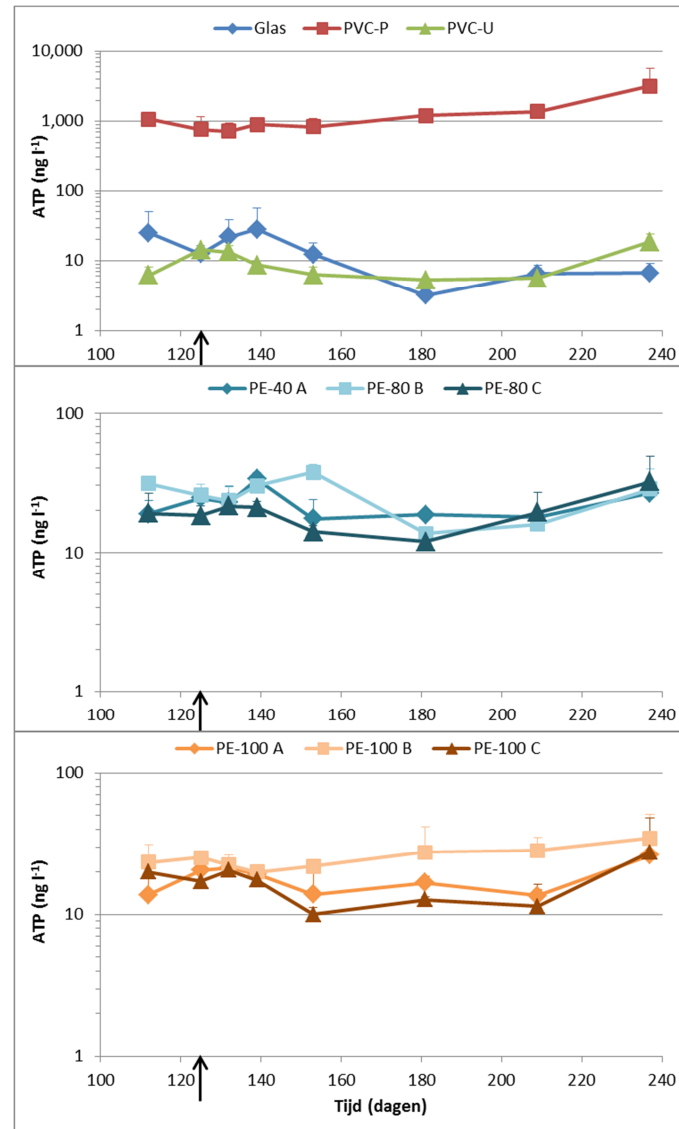
A. fumigatus nam gedurende de eerste zeven dagen van de incubatieperiode sterk toe in de biofilm op de meeste materialen, waarna de aantallen tot dag 56 ongeveer gelijk bleven (Figuur 3.11). Na dag 56 daalden de aantallen licht tot dag 112. De laagste aantallen werden aangetroffen in de biofilm op glas, koper, PE-40 en PEX-C. De mogelijke fungicidewerking van koper die werd waargenomen in het water, werd dus niet waargenomen in de biofilm op koper. In tegenstelling tot de aantallen in het water, waren de aantallen 18S rRNA genkopieën van *A. fumigatus* in de biofilm van RVS, PVC-C, PE-100 en PEX-A hoger dan de aantallen in de biofilm op glas. Blijkbaar zorgden de groeibevorderende stoffen van deze materialen voor hogere aantallen *A. fumigatus* in de biofilm. De aantallen *A. fumigatus* in de biofilm op EPDM namen gedurende de eerste zeven dagen toe tot hetzelfde niveau als werd waargenomen voor glas. Na dag 56 daalden de aantallen in de biofilm op EPDM echter niet zo sterk als voor glas. In tegenstelling tot de andere materialen namen de aantallen *A. fumigatus* in de biofilm op PVC-P toe tot dag 55, waarbij de maximum aantallen 79 keer hoger waren dan de maximum *A. fumigatus* aantallen die in de biofilm op glas werden gevonden.

Tabel 3.5 De groeipotentie van *A. fumigatus* (AfGP; is geometrisch gemiddelde \times /geometrische standaarddeviatie van opgetelde aantallen biofilm en water van dag 7, 28, 26, 84 en 112) op verschillende materialen.

Materiaal	AfGP (gk cm ⁻²)		Verhoging t.o.v glas
	Geom gemiddelde	Geom stdev	
Glas	$1,8 \times 10^3$	5,8	-
Koper	$5,2 \times 10^2$	9,1	-
PE-40	$2,6 \times 10^3$	3,1	1,5 keer
PEX-C	$3,4 \times 10^3$	2,4	1,9 keer
RVS	$3,5 \times 10^3$	3,5	2,0 keer
EPDM	$3,7 \times 10^3$	2,1	2,1 keer
PE-100	$4,7 \times 10^3$	2,6	2,7 keer
PVC-C	$5,1 \times 10^3$	2,4	2,9 keer
PEX-A	$5,4 \times 10^3$	4,2	3,0 keer
PVC-P I	$9,5 \times 10^3$	2,2	5,4 keer
PVC-P II	$2,2 \times 10^5$	6,5	126 keer

De *A. fumigatus* groeipotentie (AfGP) op glas was relatief hoog, wat wordt veroorzaakt door de afbreekbare stoffen in water. De AfGP op koper was lager dan op glas, wat laat zien dat koperionen waarschijnlijk als fungicide werkt op *A. fumigatus*. De materialen RVS, PVC-C, PE-40, PE-100, PEX-A, PEX-C en EPDM hadden een 1,5 tot 3 keer zo hoge AfGP dan glas. De groeibevorderende stoffen die deze materialen afgeven, veroorzaakten dus extra groei van *A. fumigatus*. Daarbij wordt opgemerkt dat de mate waarin dit gebeurt vergelijkbaar was voor deze materialen. De hoogste AfGP werd waargenomen met PVC-P, waarbij er duidelijke verschillen waren tussen de duplowaarden. De groeipotentie van één van de twee flessen met PVC-P was 126 keer zo hoog in vergelijking met glas, terwijl de groeipotentie van de andere fles 5,4 keer zo

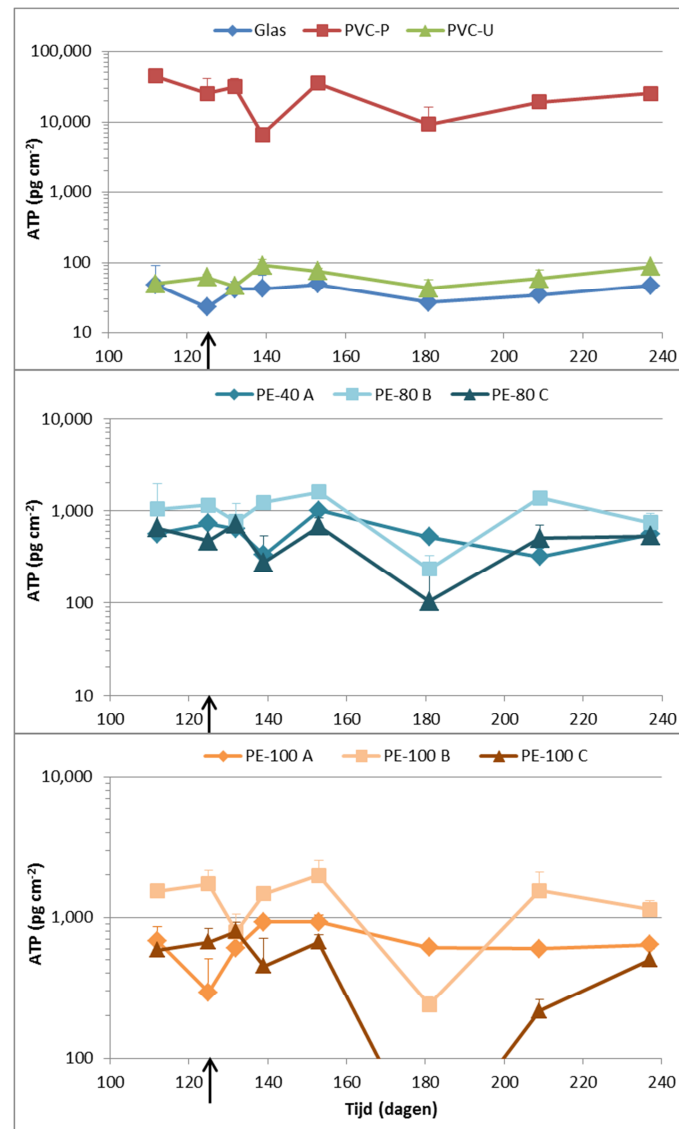
hoog was. De resultaten laten dus zien dat de meeste materialen de groeipotentie van *A. fumigatus* licht verhogen ten opzichte van het inerte materiaal glas.



Figuur 3.12. ATP concentratie als maat voor actieve biomassa van het water in contact met glas, PVC-P, PVC-U en PE-materialen van verschillende producenten gedurende dag 112 t/m 237 in een (verlengde) BPP-test. ↑ is moment dat mix van opportunistische pathogenen aan de monsters zijn toegevoegd.

3.2.2 Fase 2: Effect van PE materiaal

In fase 2 werd een mix van verschillende opportunistische pathogenen (*P. aeruginosa*, *M. kansasii*, *S. maltophilia* en *A. fumigatus*) toegevoegd aan glas, PVC-P, PVC-U en de PE-materialen van verschillende producenten (zie paragraaf 3.1) nadat op deze materialen gedurende 126 dagen een biofilm was gevormd in de BPP-test. Na inoculatie met deze mix van opportunistische pathogenen werden gedurende 112 dagen op verschillende momenten het water en de biofilm bemonsterd en geanalyseerd op ATP, *P. aeruginosa*, *M. kansasii*, *S. maltophilia* en *A. fumigatus*.



Figuur 3.13. ATP concentratie als maat voor actieve biomassa in de biofilm op glas, PVC-P, PVC-U en PE-materialen van verschillende producenten gedurende dag 112 t/m 237 in een (verlengde) BPP-test. ↑ is moment dat mix van opportunistische pathogenen aan de monsters zijn toegevoegd.

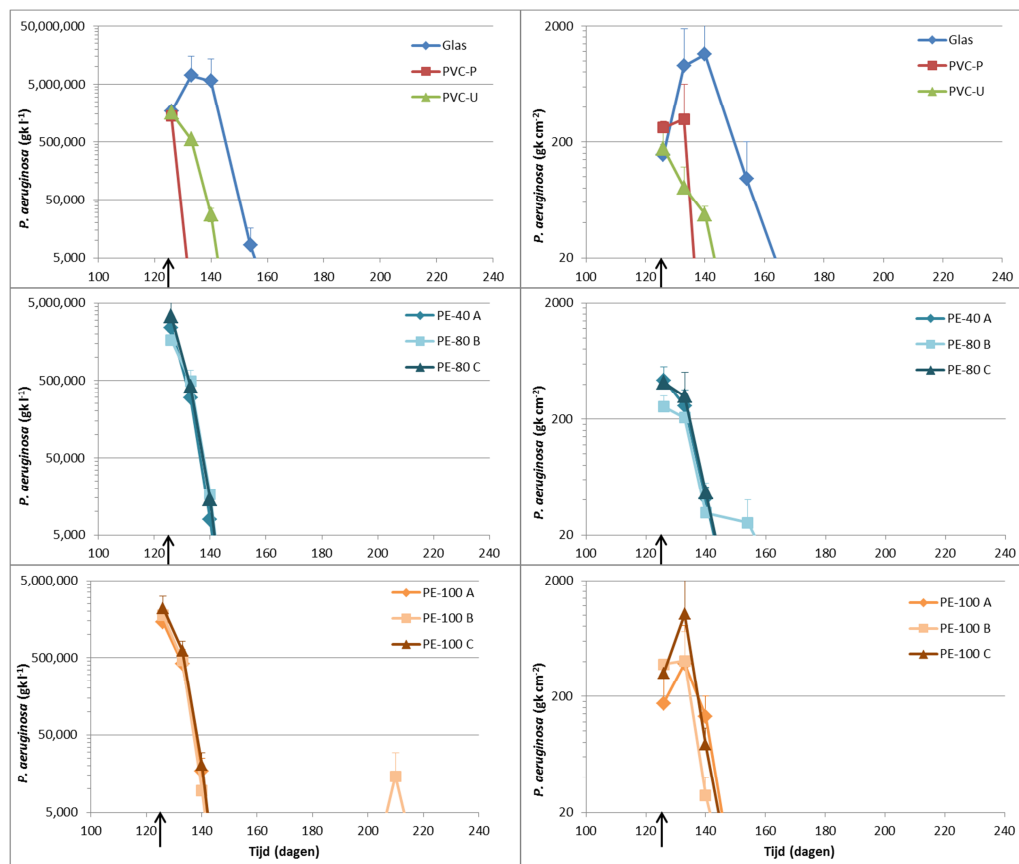
3.2.2.1 Actieve biomassa

De hoeveelheid ATP in water en in de biofilm op de materialen werd gedurende de gehele incubatieperiode van de test (237 dagen) bepaald. De hoeveelheid biomassa die gedurende de eerste 112 dagen werd gevormd in de BPP-test van deze materialen is beschreven in paragraaf 3.1. In deze paragraaf worden de biomassaconcentraties weergegeven die werden bepaald van dag 112 tot dag 237 (Figuur 3.12 en 3.13). De resultaten laten zien dat de hoeveelheid ATP die werd gevormd op het materiaal of in het water dat in contact staat met het materiaal relatief constant bleef van dag 112 t/m 237.

De biomassaproductiepotentie van de verschillende materialen voor dag 132 t/m 237 (BPP₁₃₂₋₂₃₇) werd berekend (Tabel 3.6), zodat deze waarden kunnen worden vergeleken met de groeipotentie van de verschillende opportunistische pathogenen. De trend in de BPP₁₃₂₋₂₃₇-waarden was vergelijkbaar met de trend verkregen met de BPP-waarden volgens NEN-EN 16241:2014 met de hoogste waarden voor PVC-P en de PE materialen van producent B en de laagste waarden voor glas en PVC-U.

Tabel 3.6 De biomassaproductiepotentie van verschillende materialen tijdens de incubatieperiode van dag 132 t/m 237 (BPP₁₃₂₋₂₃₇) uitgedrukt in pg ATP cm⁻².

Materiaal	Fabrikant	BPP ₁₃₂₋₂₃₇ (pg ATP cm ⁻²)		Verhoging t.o.v glas
		Gemiddelde	Stdev	
Glas	-	110	56	
PVC-P	-	29.232	13.055	265 keer
PVC-U	-	118	39	1,1 keer
PE-40	A	688	240	6,2 keer
PE-80	B	1.113	529	10,1 keer
PE-80	C	588	255	5,3 keer
PE-100	A	823	158	7,5 keer
PE-100	B	1.337	609	12,1 keer
PE-100	C	534	301	4,8 keer



Figuur 3.14 Het aantal genkopieën (gc) per liter van het *regA* gen van *P. aeruginosa* in het water dat in contact staat met verschillende materialen in de BPP-test (links) en het aantal genkopieën (gc) per cm² van het *regA* gen van *P. aeruginosa* in de biofilm op verschillende materialen die in contact staan met water in de BPP-test (rechts).

3.2.2.2 *P. aeruginosa*

Op dag 126 werd het *regA* gen van *P. aeruginosa* toegevoegd aan de verschillende materialen en op dag 126, 132 en 329 werd *P. aeruginosa* aangetroffen in het water en in de biofilm op de materialen (Figuur 3.14). De hoogste aantallen werden daarbij direct na toevoeging op dag 126 of op dag 132 waargenomen, waarna het aantal genkopieën redelijk snel (meestal na dag 139) onder de detectiegrens lag. Het aantal kolonievormende eenheden van *P. aeruginosa* was lager dan het aantal *regA* genkopieën, maar de kolonievormende eenheden lieten wel eenzelfde trend zien als de *regA* genkopieresultaten. Blijkbaar is *P. aeruginosa* dus niet in staat om de biofilm langdurig te koloniseren wanneer zich al een biofilm heeft ontwikkeld op de materialen. Voor glas, PVC-U, PE-40 en PE-100 was eerder al waargenomen dat *P. aeruginosa* ook niet goed in staat was de biofilm te koloniseren wanneer *P. aeruginosa* direct (dag 0) werd toegevoegd aan de BPP-test (Figuur 3.9). Op PVC-P was *P. aeruginosa* echter wel in staat om de biofilm langdurig te koloniseren wanneer *P. aeruginosa* wordt toegevoegd op dag 0 en zich nog geen biofilm had ontwikkeld op PVC-P (Figuur 3.9). De groeipotentie van *P. aeruginosa* gedurende dag 132 tot 237 ($\text{PaGP}_{132-237}$) uitgedrukt in kolonievormende eenheden of *regA* genkopieën per cm^2 was laag voor alle type materialen (Tabel 3.7).

Tabel 3.7 De groeipotentie van *P. aeruginosa* gedurende dag 132 tot 237 ($\text{PaGP}_{132-237}$) op verschillende materialen uitgedrukt in *regA* genkopieën per cm^2 (gk cm^{-2}) (geometrisch gemiddelde \times / geometrische standaarddeviatie van opgetelde aantallen biofilm en water van dag 132, 139, 153, 181, 209 en 237) en in kolonievormende eenheden per cm^2 (kve cm^{-2}) (geometrisch gemiddelde \times / geometrische standaarddeviatie van opgetelde aantallen biofilm en water van dag 132, 139, 181 en 237).

Materiaal	Fabrikant	$\text{PaGP}_{132-237}$ (gk cm^{-2})		$\text{PaGP}_{132-237}$ (kve cm^{-2})	
		Geo gemid	Geo stdev	Geo gemid	Geo stdev
Glas I	-	31,8	758,9	5,2	96,7
Glas II	-	5,6	114,0	1,3	18,9
PVC-P	-	0,9	35,0	0,1	1,9
PVC-U	-	2,0	112,7	1,4	21,3
PE-40	A	1,6	125,3	1,4	34,0
PE-80	B	4,4	82,7	0,4	9,3
PE-80	C	1,8	99,8	1,4	21,3
PE-100	A	2,0	110,4	1,6	24,4
PE-100	B	5,1	90,0	1,5	24,5
PE-100	C	2,1	125,3	2,0	34,0

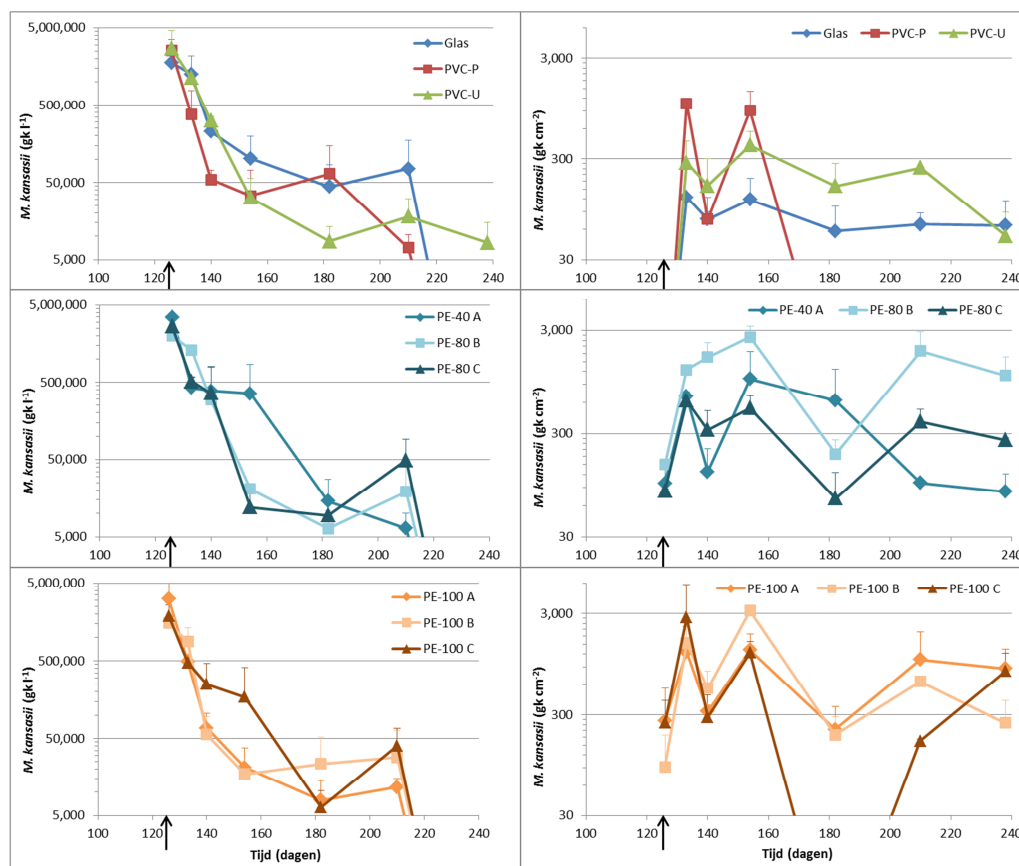
3.2.2.3 *M. kansasii*

Na inoculatie met *M. kansasii* op dag 126 werd *M. kansasii* in het water en op alle materialen waargenomen. Het aantal genkopieën van *M. kansasii* in het water namen in de tijd af en vanaf dag 209 lagen deze aantallen onder de detectiegrens van 5000 gk l^{-1} in het water van de meeste materialen (Figuur 3.15). *M. kansasii* werd wel gedurende de hele onderzoeksperiode (tot dag 237) waargenomen in de biofilm van alle materialen, behalve PVC-P (Figuur 3.15). Het aantal genkopieën nam daarbij meestal toe tot dag 132 of 139 en bleven daarna stabiel tot en met dag 237. De hoogste aantallen werden daarbij waargenomen op de verschillende PE-materialen. De groeipotentie van *M. kansasii* gedurende dag 132-237 ($\text{MkGP}_{132-237}$) was daarom ook hoger op de PE-materialen dan op glas, PVC-U of PVC-P. De hoogste $\text{MkGP}_{132-237}$ werd waargenomen op PE-80 en PE-100 van fabrikant B, het materiaal dat ook de hoogste BPP-waarde had,

maar de MkGP₁₃₂₋₂₃₇ van PE-100 van fabrikant A was ook vergelijkbaar met de MkGP₁₃₂₋₂₃₇ van de PE-materialen van fabrikant B (Tabel 3.8).

Tabel 3.8 De groeipotentie van *M. kansasii* gedurende dag 132 tot 237 (MkGP₁₃₂₋₂₃₇) op verschillende materialen uitgedrukt in 16S-23S ITS genkopieën per cm² (gk cm⁻²) (geometrisch gemiddelde \times / geometrische standaarddeviatie van opgetelde aantallen biofilm en water van dag 132, 139, 153, 181, 209 en 237).

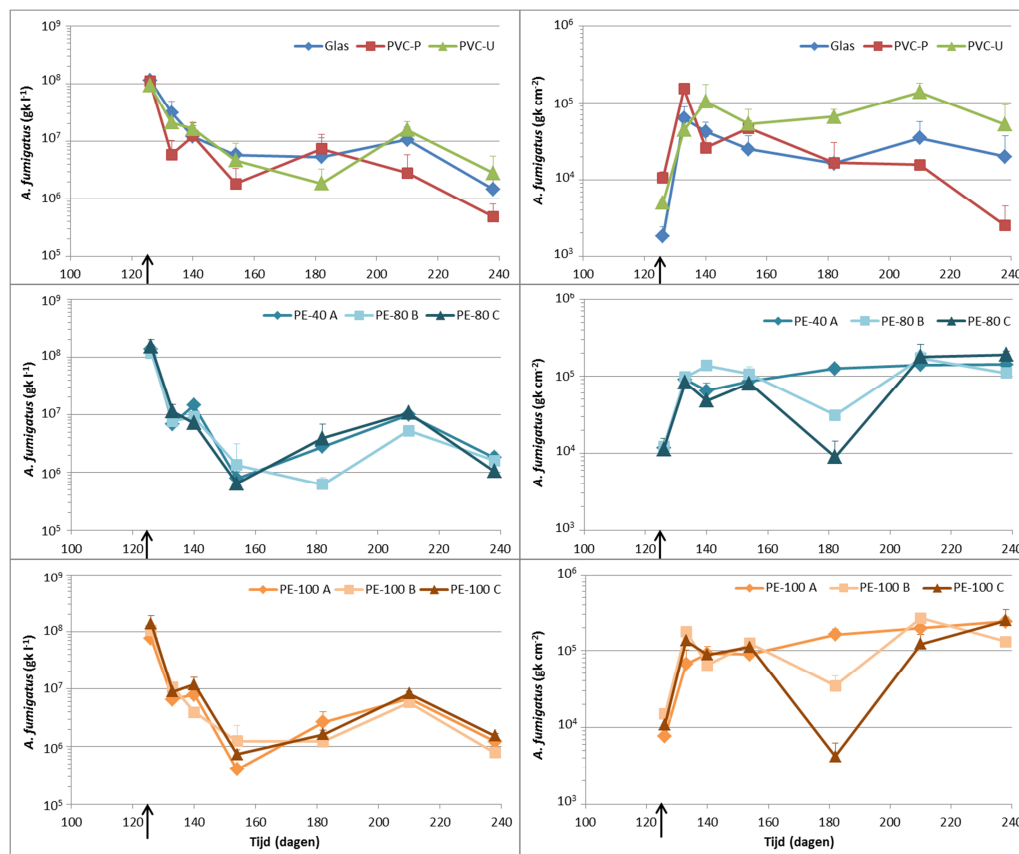
Materiaal	Fabrikant	MkGP ₁₃₂₋₂₃₇ (gk cm ⁻²)		Verhoging t.o.v glas
		Geo gemiddelde	Geo stdev	
Glas	-	613	4,7	
PVC-P	-	114	42,1	
PVC-U	-	600	4,7	
PE-40	A	735	5,8	1,2 keer
PE-80	B	1774	3,3	2,9 keer
PE-80	C	705	3,6	1,2 keer
PE-100	A	1004	2,5	1,6 keer
PE-100	B	1014	3,6	1,7 keer
PE-100	C	784	5,8	1,3 keer



Figuur 3.15 Het aantal genkopieën (gk) per liter van het 16S-23S ITS gen van *M. kansasii* in het water dat in contact staat met verschillende materialen in de BPP-test (links) en het aantal genkopieën (gk) per cm² van het 16S-23S ITS gen van *M. kansasii* in de biofilm op verschillende materialen die in contact staan met water in de BPP-test (rechts).

3.2.2.4 *A. fumigatus*

Na inoculatie met *A. fumigatus* op dag 126 werd het 18S rRNA gen van *A. fumigatus* gedurende de hele onderzoeksperiode (tot dag 237) gedetecteerd in zowel het water als de biofilm van alle typen materialen (Figuur 3.16). In het water daalden de aantallen voor alle materialen na inoculatie van 1×10^8 gk l⁻¹ op dag 126 naar waarden tussen de 1×10^6 en 1×10^7 gk l⁻¹ vanaf dag 154. In de biofilm nam het aantal 18S rRNA genkopieën van *A. fumigatus* voor de meeste materialen toe van 1×10^4 gk cm⁻² op dag 126 naar ongeveer 1×10^5 gk cm⁻² op dag 132, waarna de aantallen ongeveer stabiel bleven (Figuur 3.16). Voor glas en PVC-P lagen de aantallen in de biofilm echter lager. De groeipotentie van *A. fumigatus* gedurende dag 132-237 (AfGP₁₃₂₋₂₃₇) was het laagst voor PVC-P en glas (Tabel 3.9). De AfGP₁₃₂₋₂₃₇-waarden voor PVC-U en de verschillende PE-materialen was 1,5 tot ruim 2 keer hoger dan voor glas. De hoogste AfGP₁₃₂₋₂₃₇-waarden werden waargenomen voor het PE-materiaal van fabrikant A.



Figuur 3.16 Het aantal genkopieën (gk) per liter van het 18S rRNA gen van *A. fumigatus* in het water dat in contact staat met verschillende materialen in de BPP-test (links) en het aantal genkopieën (gk) per cm² van het 18S rRNA gen van *A. fumigatus* in de biofilm op verschillende materialen die in contact staan met water in de BPP-test (rechts).

Tabel 3.9 De groeipotentie van *A. fumigatus* (AfGP) op verschillende materialen uitgedrukt in 18S rRNA genkopieën per cm² (gk cm⁻²) (geometrisch gemiddelde ×/ geometrische standaarddeviatie van opgetelde aantallen biofilm en water van dag 132, 139, 153, 181, 209 en 237).

Materiaal	Fabrikant	AfGP (gk cm ⁻²)		Verhoging t.o.v glas
		Geo gemiddelde	Geo stdev	
Glas	-	$7,4 \times 10^4$	2,1	
PVC-P	-	$7,7 \times 10^3$	254,9	
PVC-U	-	$1,2 \times 10^5$	1,7	1,6 keer
PE-40	A	$1,4 \times 10^5$	2,9	1,9 keer
PE-80	B	$1,1 \times 10^5$	1,9	1,5 keer
PE-80	C	$1,1 \times 10^5$	2,1	1,5 keer
PE-100	A	$1,5 \times 10^5$	1,5	2,1 keer
PE-100	B	$1,3 \times 10^5$	2,0	1,7 keer
PE-100	C	$1,1 \times 10^5$	2,9	1,5 keer

4 Discussie

4.1 Invloed van materialen op groei van opportunistische pathogenen

De afgifte van groeibevorderende stoffen door leidingmaterialen die worden toegepast in het distributiesysteem, zou de groei van opportunistische ziekteverwekkers mogelijk kunnen versterken. KWR heeft in het verleden laten zien dat de toepassing van bepaalde PE- of PEX-materialen in distributiesysteem en drinkwaterinstallatie de groei van *L. pneumophila* kan versterken in vergelijking met bijvoorbeeld glas, koper, roestvrijstaal, PVC-C of PVC-U (van der Kooij & Veenendaal, 2007b; Learbuch, 2016). De drinkwatertemperatuur in het distributiesysteem in Nederland is echter dusdanig laag dat groei van *L. pneumophila* in het distributiesysteem niet te verwachten is. Daarom heeft de toepassing van PE-materialen in het distributiesysteem geen invloed op de groei van *L. pneumophila*. Recent onderzoek heeft laten zien dat andere opportunistische ziekteverwekkers die zich in drinkwater kunnen vermeerderen, ook in het Nederlandse drinkwater kunnen voorkomen (van der Wielen & van der Kooij, 2011; van der Wielen, 2014). In tegenstelling tot *L. pneumophila* werden deze organismen ook gekweekt uit drinkwater dat met behulp van een standpijp werd bemonsterd uit het distributiesysteem (Wullings, ongepubliceerde resultaten). Het is mogelijk dat materiaalgebruik in het distributiesysteem de groei van dergelijke opportunistische ziekteverwekkers bevordert. Daarom is onderzocht in hoeverre verschillende materialen die in contact komen met drinkwater groei van deze organismen bevorderen.

S. maltophilia was niet in staat om zich te vermeerderen in de biofilm op de onderzochte leidingmaterialen of in het water dat in contact stond met deze materialen. Ook in een eerdere studie was deze *S. maltophilia* stam niet in staat zich te vermeerderen in drinkwater of in een biofilm op PVC-P (van der Wielen, 2014b). *S. maltophilia* werd echter wel waargenomen in een aantal distributiesystemen in Nederland (van der Wielen & van der Kooij, 2011; van der Wielen, 2014) en lijkt daarbij een niche te hebben in de biofilm op de buiswand (van der Wielen & Lut, 2016). De *S. maltophilia* stam die werd gebruikt in de inoculatiestudie met de materialen, is afkomstig van een patiënt. Het is daarom mogelijk dat deze patiëntgerelateerde *S. maltophilia* stam niet in staat is te groeien onder de oligotrofe condities die aanwezig zijn in het drinkwaterecosysteem. De groei van *S. maltophilia* in het drinkwaterecosysteem kan daarom beter worden onderzocht door de groeiproeven te herhalen met een drinkwaterstam die ook bij patiënten worden aangetroffen.

De meeste materialen hadden ook geen of slechts zeer beperkte invloed op de groei van *M. avium*. Op RVS en PE-40 werden op slechts één meetmoment zeer lage aantallen *M. avium* in de biofilm waargenomen, terwijl op PVC-P na 82 dagen de aantallen *M. avium* in de biofilm toenamen. Deze resultaten op PVC-P zijn vergelijkbaar met resultaten die eerder met PVC-P zijn waargenomen (van der Wielen, 2014b). De resultaten laten dus zien dat de materialen die worden toegepast in het drinkwaterdistributiesysteem niet groeibevorderend zijn voor *M. avium*. *M. avium* werd overigens ook niet gedetecteerd in een groot aantal drinkwatermonsters die werden genomen in het distributiesysteem van verschillende pompstations in Nederland (van der Wielen & van der Kooij, 2011, van der Wielen, 2014, van der Wielen & Lut, 2016). De resultaten van de in dit rapport beschreven studie laten echter zien dat het gebruik van

PVC-P in drinkwaterinstallaties (bijvoorbeeld doucheslangen en/of tuinslangen) mogelijk wel kan leiden tot groei van *M. avium*.

In het tweede experiment werd onderzocht in hoeverre materialen de groei van *M. kansasii* bevorderen wanneer *M. kansasii* werd toegevoegd nadat zich gedurende 126 dagen een biofilm op de materialen heeft ontwikkeld. In dit tweede experiment werd voor *M. kansasii* gekozen, omdat in tegenstelling tot *M. avium* *M. kansasii* in het verleden is waargenomen in Nederlandse drinkwater dat met een restconcentratie chloor werd gedistribueerd (Engel et al. 1980). Een meer recente survey naar *M. kansasii* in het Nederlandse drinkwater heeft echter laten zien dat *M. kansasii* tegenwoordig niet of in zeer lage aantallen lijkt voor te komen in het Nederlandse drinkwater (van der Wielen, 2014). De resultaten lieten zien dat *M. kansasii* in staat was om de biofilm van vrijwel alle materialen te koloniseren. Hierbij waren de aantallen op glas en PVC-C lager dan op de PE-materialen van de verschillende fabrikanten. De PE-materialen bevorderen dus de groei van *M. kansasii* in de biofilm, maar dit leidde niet tot hogere aantallen in het water. Blijkbaar is de uitwisseling van *M. kansasii* tussen waterfase en biofilm percentueel gezien lager op PE dan op glas of PVC-C. Opvallend genoeg was *M. kansasii* niet in staat zich te handhaven in de biofilm op PVC-P, waar de hoogste biomassaconcentratie in de biofilm en water werd bepaald. Dit wordt mogelijk veroorzaakt doordat de groeikinetiek van *M. kansasii* minder gunstig is voor de relatief hoge concentratie nutriënten die vrijkomen uit het PVC-P materiaal, waardoor bacteriën die een hogere specifieke groeisnelheid hebben de concurrentie om het substraat winnen. Publicaties over de groeikinetiek van *M. kansasii* konden echter niet worden gevonden in de wetenschappelijke literatuur, zodat niet kan worden achterhaald of deze hypothese klopt. Zoals hierboven aangegeven werd *M. kansasii* niet aangetroffen in een groot aantal watermonsters uit verschillende distributiesystemen (van der Wielen, 2014). Onduidelijk is echter of *M. kansasii* aanwezig is in de biofilm op de buiswand in het distributiesysteem. Doordat werd waargenomen dat verhoogde aantallen in de biofilm niet leidt tot verhoogde aantallen in de waterfase, is het niet ondenkbaar dat *M. kansasii* wel in de biofilm voorkomt. Het is daarom aanbevelingswaardig om ook biofilmmonsters uit het distributiesysteem en drinkwaterinstallaties te onderzoeken op de aanwezigheid van *M. kansasii*.

De verschillende materialen lijken in meer of mindere mate wel groeibevorderend te zijn voor *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* wanneer deze op dag 0 werden toegevoegd aan de materialentest. Op de meeste materialen werd *P. aeruginosa* voornamelijk in de eerste periode (tot dag 40) waargenomen, terwijl *A. fumigatus* gedurende de hele onderzoeksperiode van 112 dagen werd waargenomen. De oorzaak van dit verschil is niet achterhaald, maar een mogelijke verklaring is dat *P. aeruginosa* zich relatief snel kan vermenigvuldigen wanneer een voedselbron (zoals groeibevorderende stoffen uit materialen) aanwezig is (van der Kooij et al., 1982). Na verloop van tijd wordt *P. aeruginosa* dan waarschijnlijk weggeconcurrerd door micro-organismen die een hogere affiniteit voor de afbreekbare stoffen hebben, maar minder snel groeien. *A. fumigatus* is blijkbaar een organisme dat beter in staat is zich langdurig in een biofilm te vestigen.

In Tabel 4.1 zijn de resultaten van de BPP, PaGP en AfGP samengevat door voor ieder materiaal aan te geven hoeveel deze parameters zijn verhoogd en opzichte van glas. De hoogste BPP-waarden werden waargenomen voor EPDM en PVC-P en deze twee materialen zorgden ook voor een substantieel hogere PaGP dan op glas. Wanneer een materiaal dus dergelijke hoge concentraties aan groeibevorderende stoffen afgeeft, wordt ook de groei van *P. aeruginosa* duidelijk bevorderd. In een eerdere studie werd

ook waargenomen dat PVC-P de groei van *P. aeruginosa* bevorderde gedurende de eerste 40 dagen na inoculatie, waarna de aantallen afnamen (van der Wielen, 2014b). Voor de overige materialen was dat minder duidelijk, omdat de PaGP voor de meeste materialen niet was verhoogd ten opzichte van glas. Zo zorgde de groeibevorderende stoffen in PE-100 en PE-40 voor een 8,9 tot 12 keer hogere biomassa-productie, maar leidde dit niet tot verhoogde groei van *P. aeruginosa*. Blijkbaar is *P. aeruginosa* onvoldoende in staat om de groeibevorderende stoffen uit PE-materiaal op te nemen, of kunnen ze de competitie met van nature aanwezige micro-organismen om deze stoffen niet winnen.

Tabel 4.1 De mate waarin de biomassa-productiepotentie (BPP), groeipotentie van *P. aeruginosa* (PaGP) en groeipotentie van *A. fumigatus* (AfGP) door de verschillende materialen is verhoogd ten opzichte van het inerte materiaal glas.

Materiaal	BPP	PaGP	AfGP
Koper	0	0	0
RVS	0	0	2,0
PVC-C	0	3,7	2,9
PE-40	12	0	1,5
PE-100	8,9	0	2,7
PEX-A	0	2,1	3,0
PEX-C	3,1	0	1,9
EPDM	159	25; 5100	2,1
PVC-P	96	4,0×10 ⁵	5,4; 126

In de hierboven beschreven experimenten werd *P. aeruginosa* toegevoegd op t=0 toen er nog geen stabiele biofilm op de materialen was ontwikkeld. Het is mogelijk dat *P. aeruginosa* echter pas in staat is om de biofilm te koloniseren als zich een meer stabiele biofilm heeft ontwikkeld op het materiaal. Daarom werd een vervolgstudie uitgevoerd waar *P. aeruginosa* werd toegevoegd nadat zich gedurende 126 dagen een stabiele biofilm heeft kunnen ontwikkelen op het materiaal in de BPP-test. De resultaten die werden verkregen na inoculatie met *P. aeruginosa* op dag 126 waren voor de meeste materialen vergelijkbaar met de resultaten die werden verkregen wanneer *P. aeruginosa* op dag 0 werd toegevoegd. De enige uitzondering hierop is het materiaal PVC-P. Wanneer *P. aeruginosa* op dag 0 werd toegevoegd aan dit materiaal, dan was *P. aeruginosa* in staat om het materiaal langdurig te koloniseren (≥ 112 dagen), terwijl toevoeging van *P. aeruginosa* op dag 126 resulteerde in een kortstondige kolonisatie (7 dagen) van PVC-P. Een mogelijke verklaring voor dit verschil is dat op dag 0 nog geen biofilm op het materiaal aanwezig was, waardoor *P. aeruginosa* niet hoefde te concurreren met bacteriën die zich al langdurig in de biofilm hebben gevestigd, wat wel het geval is wanneer *P. aeruginosa* op dag 126 wordt toegevoegd. Andere onderzoekers hebben gesuggereerd dat de micro-organismen in een stabiele biofilm mogelijk de kolonisatie van ongewenste micro-organismen tegen houden (Wang et al., 2013). De in dit rapport beschreven waarnemingen ondersteunen deze hypothese voor *P. aeruginosa*, maar aanvullende experimenten zijn nodig om hier voldoende betrouwbaar uitspraken over te doen. Hoewel *P. aeruginosa* relatief kort in de water- en biofilmfase werd waargenomen wanneer deze op dag 126 werd toegevoegd aan de materialen, was de groei het hoogst op glas dat een inert materiaal is en een lage BPP-waarde heeft. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de hoeveelheid nutriënten dusdanig laag is dat regelmatig biofilmdelen afsterven waar nutriënten bij vrijkomen die weer als voedselbron kunnen dienen voor *P. aeruginosa*. Aanvullende studies zijn

echter nodig om deze hypothese te onderzoeken. Een dergelijk onderzoek voor de drinkwaterpraktijk lijkt echter minder zinvol, omdat *P. aeruginosa* slechts kortstondig in de biofilm op de materialen werd waargenomen.

Andere onderzoekers hebben aangetoond dat *P. aeruginosa* langdurig aanwezig kan zijn in de biofilm op PVC-C, EPDM en PEX-C onder dynamische condities (Bressler et al., 2009; Moritz et al., 2010; Wang et al., 2012), terwijl kortdurende kolonisatie (14 dagen) werd waargenomen op PEX-B (Moritz et al., 2010). De langdurige kolonisatie van *P. aeruginosa* op PEX-C and PVC-C verschilt van de resultaten in de in dit rapport beschreven studie. Mogelijke verklaringen hiervoor zijn dat de gepubliceerde experimenten werden uitgevoerd onder dynamische condities (Bressler et al., 2009; Moritz et al., 2010; Wang et al., 2012), terwijl in de onderhavige BTO-studie de experimenten werden uitgevoerd onder statische condities. Het is daarom aanbevelingswaardig om ook te onderzoeken in hoeverre materialen de groei van deze opportunistische pathogenen bevorderen wanneer ze worden uitgevoerd onder dynamische condities in bijvoorbeeld een biofilmmonitor. De gepubliceerde experimenten met PVC-C werden daarnaast ook nog uitgevoerd met gechloreerd of gechloramineerd drinkwater (Wang et al., 2012) en mogelijk dat de aanwezigheid van een desinfectieresidu in het water leidt tot andere resultaten in dergelijke experimenten.

Bij de experimenten waar *A. fumigatus* op t=0 werd toegevoegd aan de materialen werd na een piek op dag 7 over het algemeen een afname gezien van de *A. fumigatus* aantallen in zowel de waterfase als in de biofilm. *A. fumigatus* is een schimmel die in staat is om veel sporen te vormen, die ook zullen worden gedetecteerd met qPCR. Met het inoculeren van *A. fumigatus* in de waterfase zijn waarschijnlijk ook relatief veel sporen in het water terecht gekomen. Wanneer deze sporen van *A. fumigatus* zich hechten aan de biofilm zou het kunnen zijn dat de aantallen in de tijd langzaam afnemen. De resultaten lieten echter zien dat *A. fumigatus* ook in de waterfase aanwezig bleef. Het water in de test werd wekelijks ververs, waarbij het aannemelijk is dat het 'verse' water geen of zeer lage aantallen *A. fumigatus* bevatte (van der Wielen, 2014). Het water werd vervolgens regelmatig bemonsterd vlak voor verversing. Dit betekent dus dat de genkopieën van *A. fumigatus* die gedurende de incubatieperiode werden waargenomen in het water, afkomstig waren van de biofilm. Het totaal aan genkopieën van *A. fumigatus* die zo werden gedetecteerd waren dan ook hoger dan het aantal genkopieën die tijdens de inoculatie aan het water zijn toegevoegd. *A. fumigatus* is dus daadwerkelijk in staat geweest om zicht te vermeerderen op de verschillende materialen in contact met drinkwater.

Voor *A. fumigatus* werd waargenomen dat het ene materiaal dat veel groeibevorderende stoffen afgeeft (PVC-P) wel leidt tot substantiële groei van *A. fumigatus*, maar het andere materiaal (EPDM) niet wanneer *A. fumigatus* op t=0 werd toegevoegd. Blijkbaar zijn de afbreekbare stoffen die vrijkomen uit het synthetische rubber geen substraat voor groei van *A. fumigatus* of zijn andere concurrerende micro-organismen beter in staat om deze stoffen op te nemen. Wanneer *A. fumigatus* werd toegevoegd na 126 dagen, werd *A. fumigatus* niet in hogere aantallen teruggevonden op PVC-P in vergelijking tot het inerte materiaal glas. Het is onduidelijk waarom *A. fumigatus* in dat geval wel in staat was om de biofilm te koloniseren, maar niet uit te groeien tot dezelfde aantallen als wanneer *A. fumigatus* op t=0 werd toegevoegd aan PVC-P. Bij de overige materialen (behalve koper) werd een lichte verhoging van de AfGP waargenomen ten opzichte van glas (Tabel 4.1). Deze verhoging was echter beperkt (1,5 tot 3,0 keer) en verschilde niet substantieel tussen de materialen. Voor *A. fumigatus*

geldt dus ook dat ondanks dat sommige materialen meer groeibevorderende stoffen afgeven (bv PE-40 en PE-100) dan andere (bv PVC-C of RVS), dit niet leidt tot verhoogde *A. fumigatus* aantallen in de biofilm op het materiaal.

Uit de resultaten van de incubatie-experimenten met opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen in de BPP-test voor materialen volgt dat het gebruik van EPDM en/of PVC-P het hoogste risico geeft voor groei van *P. aeruginosa*, *M. avium*, *M. kansasii* en *A. fumigatus*, zeker wanneer deze organismen aanwezig zijn als zich nog geen biofilm op het materiaal heeft gevormd. PVC-P wordt niet toegepast in het drinkwaterdistributiesysteem, maar is een algemeen gebruikt leidingmateriaal voor tuinslangen en/of doucheslangen in een drinkwaterinstallatie van gebouwen. Vaak vindt daarbij directe verneveling van het water uit doucheslangen en tuinslangen plaats door een douchekop of sproeikop. De infectieroute van de meeste van deze opportunistische pathogenen loopt via inademing van wateraerosolen, waardoor het gebruik van PVC-P als materiaal voor doucheslangen en tuinslangen een potentieel risico is voor verspreiding. EPDM wordt wel als synthetisch rubbermateriaal toegepast in het drinkwaterdistributiesysteem, waardoor het mogelijk is dat dergelijke rubberonderdelen in het distributiesysteem hotspots zijn voor deze opportunistische pathogenen. Het aandeel van rubberen materialen in het distributiesysteem is echter wel relatief zeer klein. Aanvullend onderzoek naar het voorkomen van deze opportunistische pathogenen op rubberonderdelen uit het distributiesysteem kan beter duidelijk maken of het gebruik van bepaalde rubbermaterialen een potentieel risico is voor de vermeerdering van opportunistische pathogenen. Daarnaast wordt aanbevolen om ook materialen van drinkwaterinstallaties (met name doucheslangen, tuinslangen en PEX-leidingen) te onderzoeken op het voorkomen van opportunistische pathogenen, zodat duidelijk wordt in hoeverre die materialen in drinkwaterinstallaties een risico vormen voor de volksgezondheid. Bij een dergelijk onderzoek is het ook raadzaam om *L. pneumophila* mee te nemen.

In 2012 werd op drie locaties in een distributiesysteem PVC-C uitgenomen, de biofilm bemonsterd en onderzocht op de aanwezigheid van *P. aeruginosa*, *M. avium*, *S. maltophilia* en *A. fumigatus* (van der Wielen & Lut, 2016). De resultaten lieten zien dat *M. avium* en *S. maltophilia* niet kon worden aangetoond in de biofilm op PVC-C, wat overeenkomt met de resultaten van de in dit rapport beschreven studie. *A. fumigatus* werd wel aangetroffen in de biofilm op de drie uitgenomen PVC-C materialen, waarbij de aantallen varieerden tussen de $1,0 \times 10^5$ tot $6,7 \times 10^5$ gk cm². De resultaten van de statische test met PVC-U, dat een vergelijkbaar materiaal is met PVC-C, waar *A. fumigatus* op dag 126 aan werd toegevoegd, lieten zien dat de aantallen *A. fumigatus* in de biofilm varieerden tussen de $0,4 \times 10^5$ en $1,4 \times 10^5$ gk cm². Deze aantallen met de statische test zijn dus vergelijkbaar met de aantallen die onder dynamische condities in het distributiesysteem zijn waargenomen. De resultaten van de statische test met PVC-C, waar *A. fumigatus* op t=0 aan werd toegevoegd, lieten echter beduidend lagere aantallen zien ($1,1 \times 10^3$ tot $7,4 \times 10^3$ gk cm²). *P. aeruginosa* werd ook waargenomen op de biofilm van de drie uitgenomen PVC-C materialen waarbij de aantallen varieerden tussen de $1,7 \times 10^4$ en $2,0 \times 10^4$ gk cm². Deze resultaten komen niet overeen met die van de statische test, aangezien *P. aeruginosa* slechts gedurende een korte periode in de biofilm kon worden aangetroffen met een maximum aantal van $1,8 \times 10^2$ gk cm². Dergelijke verschillen kunnen echter zijn veroorzaakt doordat de drinkwaterkwaliteit in de studie uit 2012 anders was dan de drinkwaterkwaliteit die is gebruikt bij de BPP-testen. Tevens beïnvloeden andere processen in een distributiesysteem (hydraulica, temperatuur, sediment, ijzeradsorptie) mogelijk ook de groei van opportunistische pathogenen op de buiswand. Daarnaast zijn slechts een beperkt aantal

leidingsegmenten van één materiaaltype onderzocht. Het is daarom aanbevelingswaardig om meerdere leidingsegmenten van verschillende materiaaltypen uit verschillende distributiesystemen te onderzoeken op de aanwezigheid van opportunistische pathogenen en deze te vergelijken met de resultaten van de BPP-test.

4.2 Biomassaproductiepotentie PE-materialen

In deze studie is onderzocht of de dichtheid van het PE-materiaal (PE-40, PE-80 en PE-100) en/of de producent van het PE-materiaal de BPP beïnvloeden. De resultaten lieten zien dat de BPP van de verschillende geteste PE-materialen hoger was dan de BPP van glas of PVC-C. Een hogere BPP-waarde voor PE-materialen dan voor glas of PVC-C werd eerder ook waargenomen (van der Kooij et al. 2007a6; van der Kooij & Veenendaal, 2007a; Bereschenko, 2016). Studies met andere methoden om de groeibevorderende eigenschappen van materialen te bepalen hebben ook laten zien dat PE-materiaal de groei van micro-organismen bevordert ten opzichte van een inert materiaal (Wen et al. 2015). In de hier beschreven studie werd ook waargenomen dat de dichtheid van het PE-materiaal weinig invloed had op de BPP. Zo was de BPP van PE-40 en PE-100 geleverd door producent A vergelijkbaar. Hetzelfde gold voor de BPP van PE-80 en PE-100 geleverd door producent B en de BPP van PE-80 en PE-100 geleverd door producent C. De BPP-waarden van hetzelfde type PE verschilden echter wel duidelijk tussen producent B en producent A of C. Zo was de BPP van PE-100 geleverd door producent B 2,7 tot 2,9 keer hoger dan de BPP van PE-100 geleverd door producent A of C. Hetzelfde gold voor PE-80 geleverd door producent B in vergelijking met PE-80 van producent C of PE-40 van producent A. Uit deze resultaten wordt daarom geconcludeerd dat de producent van leidingmaterialen van PE een grotere invloed heeft op de BPP dan de dichtheid van het PE-materiaal.

Het blijft echter onduidelijk welke factoren de oorzaak zijn van de verschillen in BPP-waarden voor materialen van producent B en A of C. Dit verschil zou te maken kunnen hebben met (i) gebruik van verschillende grondstoffen, (ii) verschillende leveranciers van de grondstoffen of (iii) verschil in het maken van de buisleiding uit de grondstoffen. Wanneer de oorzaak ligt in het gebruik van verschillende grondstoffen of verschillende leveranciers van grondstoffen, dan kunnen de BPP-waarden van PE-materialen mogelijk verschillen tussen de verschillende batches van grondstoffen die worden gebruikt. In dat geval kan het zijn dat de grondstoffenbatch die is gebruikt door producent B in die periode minder goed was dan de grondstoffenbatches die zijn gebruikt door producent A of C. Dit kan ook betekenen dat wanneer leidingmateriaal wordt getest met een andere grondstoffenbatch, de PE-materialen van producent B mogelijk een lagere BPP-waarde heeft dan de PE-materialen van producent A of C. Wanneer de oorzaak van het verschil ligt in de manier waarop de buis wordt gemaakt, dan zou het PE-materiaal van producent B consequent hoger moeten zijn dan het PE-materiaal van producent A of C. In een recente Deense studie zijn de groeibevorderende eigenschappen onderzocht van negen verschillende stoffen die uit PE en PEX migreren. De resultaten lieten zien dat 4-ethylphenol binnen 22 dagen werd afgebroken, terwijl de andere acht verbindingen niet of slechts gedeeltelijk binnen vier weken werden afgebroken door micro-organismen (Ryssel et al. 2015). De resultaten van die studie geven een eerste indruk van een mogelijke stof uit PE-materialen die de groei van micro-organismen bevordert. Het is echter niet uitgesloten dat ook andere stoffen die in PE aanwezig zijn voor groei van micro-organismen zorgt, aangezien de Deense studie zich alleen heeft gericht op stoffen die ook naar de waterfase migreren. Om een beter inzicht te krijgen in de oorzaak van de waargenomen verschillen tussen de PE-materialen, is het aanbevelingswaardig om aanvullend onderzoek uit te voeren naar (i) de groeibevorderende eigenschappen van de verschillende grondstoffen die

worden toegepast in PE en (ii) groeibevorderende eigenschappen van het PE-materiaal te onderzoeken voor en na het trekken van de buis. Die informatie kunnen de fabrikanten van PE-materiaal vervolgens gebruiken om de groeibevorderende eigenschappen van PE-materiaal te verlagen.

De resultaten van eerder studies met de BPP-test voor materialen hebben laten zien dat de variatie in BPP-waarden voor PE-materialen relatief groot is. Deze variatie is waargenomen tussen verschillende studies alsook binnen één studie (van der Kooij et al. 2006, van der Kooij & Veenendaal, 2007a, Bereschenko, 2013). Op basis van de resultaten beschreven in deze rapportage is het aannemelijk dat de eerder waargenomen variatie tussen PE-materialen wordt veroorzaakt doordat de materialen van verschillende leveranciers of batches komen.

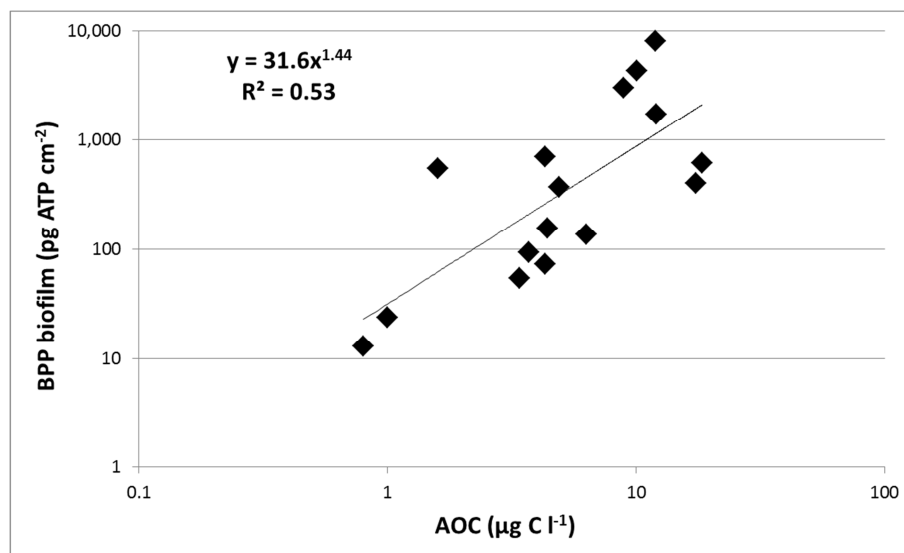
De resultaten van deze studie hebben dus laten zien dat de BPP-waarde van hetzelfde PE-type aanzienlijk kan verschillen. Het is voor de drinkwaterbedrijven daarom belangrijk om te weten bij welke BPP-waarde het gebruik van PE-materiaal problematisch zou kunnen worden in relatie tot nagroei in het distributiesysteem. Problemen die zich met nagroei in het distributiesysteem kunnen voordoen zijn groei van opportunistische ziekteverwekkers, esthetische klachten (geur/smaak, bruinwaterklachten en dierlijke organismen), technische klachten (dierlijke organismen die watermeters verstoppen, corrosie) en overschrijding van de wettelijke norm voor *Aeromonas*. De invloed van materialen op groei van opportunistische ziekteverwekkers is in deze studie ook onderzocht (zie paragraaf 3.2 en 4.1). Het effect van de verschillende PE-materialen op groei van deze opportunistische ziekteverwekkers was over het algemeen beperkt. Alleen voor *M. kansasii* werd waargenomen dat het PE-materiaal met de hoogste BPP-waarden (PE van producent B) ook de hoogste *M. kansasii* aantallen had.

De invloed van PE-materialen op de groeipotentie van *Aeromonas* is ook in deze studie onderzocht. De resultaten met *Aeromonas* lieten zien dat de geteste PE-materialen over het algemeen de groei van *Aeromonas* stam M800 niet versterkte. Het PE-100 materiaal van producent B zorgde echter wel voor een substantieel verhoogde groeipotentie van *Aeromonas*. Het PE-100 materiaal van producent B gaf van de geteste PE-materialen ook de meeste groeibevorderende stoffen af en toont aan dat PE-materiaal met een hoge BPP-waarde mogelijk een bijdrage kan leveren aan de groei van *Aeromonas*. Dit lijkt dus een reden te zijn om grenzen te stellen aan de BPP van materialen die in het distributiesysteem mogen worden toegepast. Hierbij dient overigens wel opgemerkt te worden dat de waargenomen *Aeromonas*-bacteriën op het PE-materiaal van producent B niet konden worden gekweekt met de standaard kweekmethode voor drinkwater. Het blijft onduidelijk of deze niet-kweekbare *Aeromonas*-bacteriën weer zouden kunnen uitgroeien tot kweekbare *Aeromonas*-bacteriën in het distributiesysteem en daarmee van invloed zijn op eventuele overschrijdingen van de wettelijke norm van *Aeromonas*.

In een eerder onderzoek is vastgesteld dat de biofilmconcentratie een rol kan hebben in de accumulatie van ijzer (van der Kooij & Bereschenko, 2015). De verwachting is daarom dat hogere biofilmconcentraties in het distributiesysteem een invloed kunnen hebben op bruinwaterklachten, wanneer na bijvoorbeeld een hydraulische verstoring deze biofilm in de waterfase terecht komt. De biofilmconcentratie speelt ook een rol in de aanwezigheid van dierlijke organismen, aangezien het voedselweb van deze dierlijke organismen afhankelijk is van begrazing op biofilms (van Lieverloo et al., 2014). Daarnaast speelt de biofilmconcentratie een rol in de groei van *L. pneumophila*

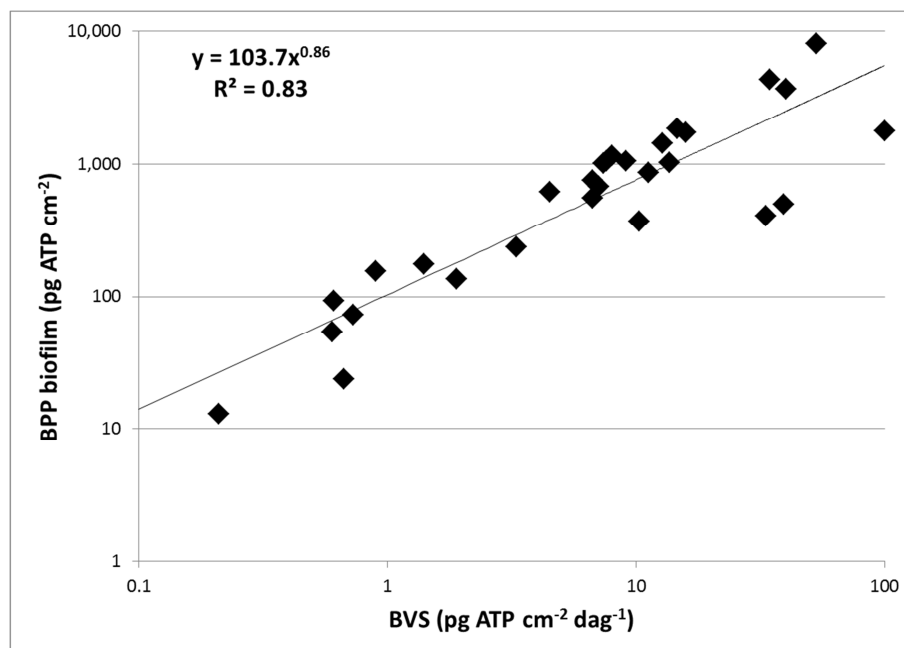
in drinkwaterinstallaties bij temperaturen die gunstig zijn voor groei van *L. pneumophila* (van der Kooij & Veenendaal, 2011).

Op basis van de relatie tussen biofilmconcentratie en mogelijke nagroeiproblemen lijkt het zinvol om een grenswaarde te stellen voor de BPP van materialen die worden toegepast in het drinkwaterdistributiesysteem. Nagroei in het distributiesysteem kan veroorzaakt worden door biologisch afbreekbare stoffen die in het gedistribueerde drinkwater aanwezig zijn of door afbreekbare stoffen die in het leidingmateriaal aanwezig zijn. Ten aanzien van de hoeveelheid afbreekbare stoffen die in het drinkwater aanwezig mag zijn, is in het verleden een richtlijn opgesteld in relatie tot de concentratie van gemakkelijk assimileerbaar organisch koolstof (AOC) in drinkwater en de biofilmvormingssnelheid (BVS) van het drinkwater. Deze richtlijn stelt dat als de AOC-concentratie lager is dan $10 \mu\text{g C l}^{-1}$ en de BVS lager dan $10 \text{pg ATP cm}^{-2} \text{dag}^{-1}$, het water dusdanig biologisch stabiel is dat de kans op nagroeiproblemen gering is (van der Kooij, 2003). Onderzoek in het verleden heeft laten zien dat er een relatie bestaat tussen de AOC-concentratie in het water of de BVS van het water en de hoeveelheid biofilm die dat veroorzaakt op een oppervlakte van een inert materiaal (glas). De relatie tussen de AOC concentratie in het drinkwater en de biofilmconcentratie in de biofilmmonitor is onderzocht in een studie naar de *Legionella*groeipotentie van verschillende drinkwatertypen (van der Kooij & Veenendaal, 2011). In die studie zijn verschillende reinwatertypen (reinwater geproduceerd van oxisch grondwater, anoxisch grondwater, oppervlaktewater na duininfiltratie en oppervlaktewater na spaarbekken) onderzocht, waarbij ook de AOC-concentratie en de biofilmvormingspotentie met behulp van de biofilmmonitor is bepaald. Tussen de loggetransformeerde waarden van deze twee parameters werd een significant correlatie met een R^2 van 0,53 gevonden (Figuur 4.1). Uit de vergelijking van deze correlatie volgt dat een AOC-concentratie van $10 \mu\text{g C l}^{-1}$ overeenkomt met een biomassaproductiepotentie van $870 \text{pg ATP cm}^{-2}$ van de biofilm in de biofilmmonitor.



Figuur 4.1. De relatie tussen de AOC-concentratie in verschillende reinwatertypen (drinkwater bereid uit oxisch grondwater, anoxisch grondwater, oppervlaktewater na duininfiltratie en oppervlaktewater uit bekken) en de mate van biofilmvorming (BPP biofilm) van hetzelfde reinwater gemeten op glasingen in de biofilmmonitor. Data uit van der Kooij & Veenendaal (2011).

De relatie tussen de biofilmvormingspotentie en biofilmvormingssnelheid kan voor iedere meting met de traditionele biofilmmonitor worden bepaald, omdat in die meting zowel de biomassa-productiepotentie van de biofilm wordt bepaald als de toename van de biofilmvormingssnelheid in de tijd. De biofilmvormingspotentie en biofilmvormingssnelheid van de traditionele biofilmmonitoren die sinds 2009 werden gemeten zijn vergeleken (van der Kooij, ongepubliceerde gegevens). Deze waarden zijn wederom bepaald van drinkwater bepaald uit verschillende bronnen. Uit de vergelijking blijkt dat er een significante relatie met een R^2 van 0,83 is tussen de loggetransformeerde waarden van de biomassa-productiepotentie van de biofilm en de biofilmvormingssnelheid (Figuur 4.2). Uit de afgeleide relatie volgt dat een BVS van $10 \text{ pg ATP cm}^{-2} \text{ dag}^{-1}$ overeenkomt met een BPP van $751 \text{ pg ATP cm}^{-2}$. Op basis van deze resultaten is het dus mogelijk om voor biologisch afbreekbare stoffen uit materialen een richtlijn voor de biofilmconcentratie (oftewel BPP) op te stellen die zich laat vergelijken met de richtlijn die wordt gehanteerd voor de AOC-concentratie en BVS van drinkwater. Hiervoor zijn de twee afgeleide BPP-waarden (870 en $751 \text{ pg ATP cm}^{-2}$) gemiddeld en afgerond tot $800 \text{ pg ATP cm}^{-2}$. Deze richtlijn voor materialen houdt dus in dat alleen (PE)-materialen zouden moeten worden toegepast met een BPP-waarde van $800 \text{ pg ATP cm}^{-2}$ of lager.



Figuur 4.2 De relatie tussen de BVS van verschillende reinwatertypen (drinkwater bereid uit oxisch grondwater, anoxisch grondwater, oppervlaktewater na duininfiltratie en oppervlaktewater uit bekken) en de mate van biofilmvorming (BPP biofilm) van hetzelfde reinwater gemeten op glasringen in de biofilmmonitor. Data van der Kooij (niet gepubliceerd).

In 2015 is de regeling 'Materialen en chemicaliën drink- en warm tapwatervoorziening' aangepast (Anoniem, 2015). In deze aangepaste regeling is ook het vaststellen van nagroei door leidingmaterialen opgenomen. Hiervoor mogen drie verschillende methoden worden toegepast: de BPP-methode, de Duitse VM-methode en de Britse MDOD-methode (alle drie beschreven in NEN-EN 16421:2014). Voor de BPP-methode is

een beoordelingscriterium van $1000 \text{ pg ATP cm}^{-2}$ voor deze regeling opgenomen, terwijl voor de andere twee methoden wordt gesteld 'Indien de beoordelingscriteria, die gehanteerd worden bij de VM en MDOD testmethode, een aan het beoordelingscriterium voor BPP gelijkwaardig beschermingsniveau bieden, dan kunnen de testresultaten verkregen met de VM of MDOD methode gebruikt worden. Voor VM betreft dit het beoordelingscriterium van $0,05 \pm 0,02 \text{ ml slijmvolume } 800 \text{ cm}^{-2}$.' Hoewel wordt gesteld dat het beoordelingscriteria van de VM-methode gelijkwaardig is aan de beoordelingscriteria van de BPP-methode, is dat niet gebleken uit een vergelijkend onderzoek met de drie methoden (van der Kooij & Veenendaal, 2007). Uit deze vergelijkingsstudie bleek dat de BPP-methode veel gevoeliger is dan de VM- of MDOD-methode. Zo is het beoordelingscriterium van de Duitse VM-methode tevens de detectiegrens van de methode. In Duitsland geldt al geruime tijd dat materialen moeten voldoen aan het beoordelingscriterium van $0,05 \pm 0,02 \text{ ml slijmvolume } 800 \text{ cm}^{-2}$. De PE-materialen die in Duitsland worden getest voldoen altijd aan het beoordelingscriterium van de VM-methode (pers. comm. Christiane Schell, Institut für Umwelthygiene und Toxikologie, Gelsenkirchen, Duitsland), bijvoorbeeld ook de PE-materialen die zijn getest in deze studie. Het gevolg van de regeling is dus dat ook PE-materialen met een BPP-waarde hoger dan $800 \text{ pg ATP cm}^{-2}$ (en zelfs hoger dan $1000 \text{ pg ATP cm}^{-2}$) mogen worden toegepast in Nederland, wat op basis van de in het onderhavige rapport afgeleide richtlijn van $800 \text{ pg ATP cm}^{-2}$ een onwenselijke situatie is. Daarom wordt aanbevolen om als drinkwatersector de eis te hanteren dat alleen PE-materialen met een BPP-waarde van $800 \text{ pg ATP cm}^{-2}$ of lager worden toegepast in het drinkwaterdistributiesysteem. Het is momenteel echter lastig om aan een dergelijke eis te voldoen omdat (i) er geen wettelijke basis is voor deze eis en het voor producenten van leidingmaterialen toegestaan is om ook PE-materialen te gebruiken met een BPP-waarde hoger dan $800 \text{ pg ATP cm}^{-2}$ en (ii) het mogelijk is dat iedere batch PE-materiaal een andere BPP-waarde heeft, waardoor elke batch getest zou moeten worden. Hierdoor lijkt het voornamelijk op korte termijn niet mogelijk om alleen PE-materiaal toe te passen in het drinkwaterdistributiesysteem met een BPP-waarde $\leq 800 \text{ pg ATP cm}^{-2}$. Daarom blijft het advies om voorlopig terughoudend te blijven in het gebruik van PE-materiaal in het drinkwaterdistributiesysteem, in ieder geval tot deze waarde wettelijk is vastgelegd en duidelijk is of de BPP-waarden tussen batches vergelijkbaar zijn. Aanvullend is daarbij het advies om meer terughoudend te zijn wanneer de oppervlakte/volume verhouding hoog is (kleine diameter van de buis) dan wanneer de oppervlakte/volume verhouding klein is (grote diameter van de buis). Om vast te stellen in hoeverre iedere batch van PE-leidingmateriaal een andere BPP-waarde heeft, wordt voorgesteld om per drinkwaterbedrijf gedurende één jaar een ingangscntrole op het gebruikte materiaal uit te voeren.

5 Conclusies en aanbevelingen

5.1 Conclusies

De BPP-waarden van de verschillende PE-materialen waren 7,8 tot 21,8 keer hoger dan van glas, terwijl de BPP-waarde van PVC-U 1,1 keer hoger was dan van glas. PE-materialen geven dus meer groeibevorderende stoffen dan PVC-U en gebruik van PE in het distributiesysteem leidt dus tot vorming van extra biomassa in vergelijking met PVC-U.

De dichtheid van PE heeft weinig invloed op de BPP-waarde. PE met een lagere dichtheid (PE-40 of PE-80) geeft dus evenveel groeibevorderende stoffen af dan PE met een hogere dichtheid (PE-100).

PE-materialen van fabrikant B hadden duidelijk hogere BPP-waarden dan PE-materialen van fabrikant A en C. Doordat deze resultaten slechts een momentopname zijn, kan op basis van deze resultaten niet worden geconcludeerd dat PE-materialen van fabrikant B structureel hoger liggen dan PE-materialen van fabrikant A en C. Wel kan worden geconcludeerd dat kwaliteitsverschillen tussen (batches van) PE-materialen met dezelfde dichtheid dusdanig groot kunnen zijn, dat ze een significant effect hebben op de mate waarin groeibevorderende stoffen worden afgegeven.

Een streefwaarde is berekend voor de BPP van materialen waarbij de streefwaarde dezelfde mate van microbiële groei veroorzaakt als die wordt bereikt met de streefwaarde voor AOC ($10 \mu\text{g C l}^{-1}$) en BVS ($10 \text{pg ATP cm}^{-2} \text{dag}^{-1}$) van het geproduceerde drinkwater. Deze BPP-streefwaarde voor materialen is $800 \text{pg ATP cm}^{-2}$. De PVC-U en PVC-C materialen die tot nu toe zijn onderzocht in de diverse studies voldoen aan deze streefwaarde, terwijl PE-materialen niet altijd aan deze streefwaarde, voldoen. Het is dus raadzaam om terughoudend te zijn met gebruik van PE-materiaal dat niet met de BPP-test is onderzocht.

Glas, PVC-P, PVC-U en alle onderzochte PE-materialen resulteren niet in groei of kolonisatie van het materiaal met kweekbare *Aeromonas*, wanneer deze *Aeromonas* wordt toegevoegd aan de materialen in de BPP-test. Wel resulteren materialen met hogere BPP-waarden (PVC-P en PE-100 van fabrikant B) tot verhoogde aantallen genkopieën van het 16S rRNA gen van *Aeromonas*.

Glas, PVC-U en de meeste PE-materialen bevorderen de groei van *Aeromonas* onder statische condities niet, maar wanneer het PE-materiaal relatief veel groeibevorderende stoffen afgeeft, kan *Aeromonas* zich in de biofilm vermeerderen. Hierbij wordt wel benadrukt dat deze *Aeromonas*-bacteriën niet kweekbaar zijn volgens de standaard kweekmethode voor *Aeromonas* in drinkwater.

Materialen die worden toegepast in het drinkwaterdistributiesysteem zijn niet groeibevorderend voor *M. avium*. Het gebruik van PVC-P in drinkwaterinstallaties (bijvoorbeeld doucheslangen en/of tuinslangen) kan mogelijk wel leiden tot groei van *M. avium*. In tegenstelling tot glas en PVC-U, bevorderen PE-materialen de groei van *M. kansasii* in de biofilm, maar dit leidde niet tot hogere aantallen in het water.

P. aeruginosa is onvoldoende in staat om de groeibevorderende stoffen uit PVC-C, PVC-U en PE-materialen op te nemen, of *P. aeruginosa* kan de competitie met de van nature aanwezige micro-organismen om deze stoffen niet winnen. EPDM en PVC-P kunnen wel de groei van *P. aeruginosa* bevorderen en toepassing van deze materialen in het distributiesysteem en drinkwaterinstallatie verhoogt dus mogelijk het risico op het voorkomen van dit organisme.

Voor *A. fumigatus* geldt dat ondanks dat sommige materialen meer groeibevorderende stoffen afgeven (bv PE-40 en PE-100) dan andere (bv PVC-C of RVS), dit niet leidt tot verhoogde *A. fumigatus* aantallen in de biofilm op PE ten opzichte van PVC-C of PVC-U. Daarnaast resulteerde het ene materiaal dat veel groeibevorderende stoffen afgeeft (PVC-P) wel tot substantiële groei van *A. fumigatus*, maar het andere materiaal (EPDM) dat veel groeibevorderende stoffen afgeeft niet. Blijkbaar zijn de afbreekbare stoffen die vrijkomen uit het synthetische rubber geen substraat voor groei van *A. fumigatus* of zijn andere concurrerende micro-organismen beter in staat om deze stoffen op te nemen.

Uit de resultaten van de incubatie-experimenten met opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen in de BPP-test voor materialen volgt dat het gebruik van EPDM en/of PVC-P het hoogste risico geeft voor groei van *P. aeruginosa*, *M. avium*, *M. kansasii* en *A. fumigatus*, zeker wanneer deze organismen aanwezig zijn als zich nog geen biofilm op het materiaal heeft gevormd. Het effect van de verschillende PE-materialen op groei van deze opportunistische ziekteverwekkers was over het algemeen beperkt. Alleen voor *M. kansasii* werd waargenomen dat het PE-materiaal met de hoogste BPP-waarden (PE van producent B) ook de hoogste *M. kansasii* aantallen had.

5.2 Aanbevelingen

Er wordt aanbevolen om als drinkwatersector de eis te hanteren dat alleen PE-materialen met een BPP-waarde van 800 pg ATP cm⁻² of lager worden toegepast in het drinkwaterdistributiesysteem. Het is momenteel echter lastig om aan een dergelijke eis te voldoen omdat (i) er geen wettelijke basis is voor deze eis en het voor producenten van leidingmaterialen toegestaan is om ook PE-materialen te gebruiken met een BPP-waarde hoger dan 800 pg ATP cm⁻² en (ii) het mogelijk is dat iedere batch PE-materiaal een andere BPP-waarde heeft, waardoor elke batch getest zou moeten worden. Hierdoor lijkt het vooralsnog op korte termijn niet mogelijk om alleen PE-materiaal toe te passen in het drinkwaterdistributiesysteem met een BPP-waarde ≤ 800 pg ATP cm⁻². Daarom blijft het advies om voorlopig terughoudend te blijven in het gebruik van PE-materiaal in het drinkwaterdistributiesysteem. In ieder geval tot duidelijk is dat wanneer een PE-type van een fabrikant een BPP-waarde van 800 pg ATP cm⁻² of lager heeft, deze waarde ook geldt voor andere batches van hetzelfde PE-type van dezelfde fabrikant. Aanvullend is daarbij het advies om meer terughoudend te zijn wanneer de oppervlakte/volume verhouding hoog is (kleine diameter van de buis) dan wanneer de oppervlakte/volume verhouding klein is (grote diameter van de buis). Om vast te stellen in hoeverre iedere batch van PE-leidingmateriaal een andere BPP-waarde heeft, wordt voorgesteld om per drinkwaterbedrijf gedurende één jaar een ingangscntrole op het gebruikte PE-materiaal uit te voeren.

Om een beter inzicht te krijgen in de oorzaak van de waargenomen verschillen tussen de PE-materialen, is het aanbevelingswaardig voor de kunststofsector om aanvullend onderzoek uit te voeren naar (i) de groeibevorderende eigenschappen van de verschillende grondstoffen die worden toegepast in PE en (ii) groeibevorderende eigenschappen van het PE-materiaal te onderzoeken voor en na het trekken van de buis.

Die informatie kan de kunststofsector vervolgens gebruiken om de groeibevorderende eigenschappen van PE-materiaal te verlagen.

De in deze studie uitgevoerde experimenten naar groei van opportunistische pathogenen op leidingmaterialen zijn uitgevoerd onder statische condities. Onduidelijk is of dezelfde waarnemingen worden gedaan wanneer de experimenten worden uitgevoerd onder dynamische condities. Het is daarom aanbevelingswaardig om ook te onderzoeken in hoeverre leidingmaterialen de groei van deze opportunistische pathogenen bevorderen wanneer ze worden uitgevoerd onder dynamische condities in bijvoorbeeld een biofilmmonitor.

De resultaten hebben laten zien dat sommige leidingmaterialen de groei van (enkele van) de opportunistische pathogenen kunnen bevorderen. Het is daarom aanbevelingswaardig om te achterhalen of deze opportunistische pathogenen ook aanwezig zijn in de biofilm op praktijkmonsters van deze materialen in het distributiesysteem en drinkwaterinstallatie. Bij een dergelijk onderzoek is het ook raadzaam om *L. pneumophila* mee te nemen.

S. maltophilia is in geen enkel monster teruggevonden, mogelijk omdat de gebruikte stam van *S. maltophilia* niet is aangepast aan het drinkwaterecosysteem. De invloed van leidingmaterialen op de groei van *S. maltophilia* in het drinkwaterecosysteem kan daarom beter worden onderzocht door de groeiproeven te herhalen met een drinkwaterstam van *S. maltophilia* die ook bij patiënten worden aangetroffen.

De in dit rapport beschreven waarnemingen ondersteunen de hypothese dat een ontwikkelde biofilmflora op een leidingmateriaal de kolonisatie van *P. aeruginosa* tegenhoudt, maar aanvullende experimenten zijn nodig om hier voldoende betrouwbaar uitspraken over te doen.

6 Referenties

Anoniem, 2015. Wijziging regeling materialen en chemicaliën drink- en warm tapwatervoorziening (technische aanpassingen 2015), Ministerie van Infrastructuur en Milieu (<https://www.rijksoverheid.nl/documenten/regelingen/2015/07/23/wijziging-regeling-materialen-en-chemicalien-drink-en-warm-tapwatervoorziening-technische-aanpassingen-2015>).

Bereschenko, L. 2013. Effect van leeftijd op de groeibevorderende eigenschappen van PVC-U en PE in contact met drinkwater. BTO 2013.037. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.

Bressler, D., Balzer, M., Dannehl, A., Flemming, H.C. and Wingender, J. 2009. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material. Wat. Sci. Tech. 9:81-87.

Engel, H.W., Berwald, L.G. and Havelaar, A.H. 1980. The occurrence of *Mycobacterium kansasii* in tapwater. Tubercle 61:21-26.

Learbuch, K. 2016. *Legionellagroepotentie van (geremineraliseerd) RO-water*. BTO 2016.202(s), KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.

Moritz, M.M., Flemming, H.C. and Wingender, J. 2010. Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. Int. J. Hyg. Environ. Health 213:190-197.

Ryssel, S.T. et al. 2015. Degradation of specific aromatic compounds migrating from PEX pipes into drinking water. Water Res. 81:269-278.

van der Kooij, D. 2003. Managing regrowth in drinking-water distribution systems. In: Heterotrophic plate counts and drinking-water safety, Bartram, J., Cotruvo, C., Exner, M., Fricker, C. and Glasmacher, A. (eds). IWA Publishing, London, UK. pp. 199-232.

van der Kooij, D., Oranje, J.P. and Hijnen, W.A. (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. 44:1086-1095.

van der Kooij, D. & H. Veenendaal. 2011. Bepaling en beoordeling van de *Legionellagroepotentie van drinkwater*. BTO 2011.037. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.

van der Kooij, D. & H. Veenendaal. 2007a. Assessment of the microbial growth potential of materials in contact with treated water. A comparison of test methods. KWR 2007.068. Kiwa Water Research, Nieuwegein.

van der Kooij, D. & H. Veenendaal. 2007b. Foundation of pass-fail criteria for the biomass production potential of materials in contact with treated water. KWR 2007.100. Kiwa Water Research, Nieuwegein.

van der Kooij, D. et al. 2006. Standardizing the biomass production potential method for determining the microbial-growth enhancement of construction products in contact with drinking water. Kiwa Water Research, Nieuwegein.

van der Kooij, D. & Bereschenko, L. 2015. De invloed van ijzer op de biomassa-accumulatiesnelheid in de continue biofouling monitor (CBM). BTO 2015.216(s), KWR Water Cycle Research Institute, Nieuwegein.

van der Wielen, P.W.J.J. & D. van der Kooij. 2011. Opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater. BTO 2011.035. 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. BTO 2014.015. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.

van der Wielen, P.W.J.J. 2014b. Rol van drinkwater, biofilm en temperatuur op groei van opportunistische pathogenen. BTO 2014.217(s). KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.

van der Wielen, P. W. J. J et al. 2014. Opportunistic pathogens in drinking water in the Netherlands. In *Microbial Growth in Drinking-Water Supplies. Problems, Causes, Control and Research Needs* ed. van der Kooij, D. and van der Wielen, P. W. J. J. pp. 177-205. London: IWA Publishing.

van der Wielen, P.W.J.J. & M. Lut. 2016. Distribution of microbial activity and specific microorganisms across sediment size fractions and pipe wall biofilm in a drinking water distribution system. *Water Science & Technology Water Supply*, accepted.

van Lieverloo, J.H.M., W. Hoogenboezem, G. Veenendaal en D. van der Kooij. 2014. Invertebrates in drinking water distribution systems. In: *Microbial Growth in Drinking Water Supplies*, D. van der Kooij & P.W.J.J. van der Wielen (eds), IWA Publishing, London, pp. 239-260.

Wen, G. et al. 2015. BioMig: A Method to Evaluate the Potential Release of Compounds from and the Formation of Biofilms on Polymeric Materials in Contact with Drinking Water. *Environ. Science Technol.* 49:11659-11669.

Wang, H., Masters, S., Hong, Y., Stallings, J., Falkinham, J.O., 3rd, Edwards, M.A. and Pruden, A. 2012. Effect of disinfectant, water age, and pipe material on occurrence and persistence of *Legionella*, mycobacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, and two amoebas. *Environ. Sci. Technol.* 46:11566-11574.

Wang, H., Edwards, M.A., Falkinham, J.O. and Pruden, A. (2013) Probiotic approach to pathogen control in premise plumbing systems. A review. *Environ. Sci. Technol.* 47:10117-10128.