

KOA 99.079

# **Biofilmvormingspotentie van leidingmaterialen voor binneninstallaties**

*Meetresultaten en beoordeling*

# Biofilmvormingspotentie van leidingmaterialen voor binneninstallaties

*Meetresultaten en beoordeling*

## **OPDRACHTGEVER**

VROM

## **OPDRACHTNUMMER**

30.2461.016

## **AUTEURS**

H.R. Veenendaal en D. van der Kooij

## **AFDELING**

Chemie en Biologie

Nieuwegein, juni 1999

## **Onderzoek en Advies**

Groningenhaven 7  
Postbus 1072  
3430 BB Nieuwegein  
Telefoon (030) 606 95 11  
Telefax (030) 606 11 65

**KOA 99.079**

© 1999 Kiwa N.V.

Niets uit dit drukwerk mag worden veelelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Kiwa N.V., noch mag het zonder dergelijke toestemming worden gebruikt voor enig ander werk dan waarvoor het is vervaardigd.

# INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING.....	4
1 VERANTWOORDING.....	6
2 INLEIDING.....	8
3 DE BEPALING VAN DE BIOFILMVORMINGS-POTENTIE VAN GESELECTEERDE MATERIALEN .....	10
3.1 Opzet en uitvoering van het onderzoek.....	10
3.1.1 Selectie van de materialen .....	10
3.1.2 Werkwijze.....	11
3.1.3 Selectie micro-organismen.....	12
3.2 Resultaten .....	13
3.2.1 De biofilmvormingspotentie (BVP) van de materialen .....	13
3.2.2 Aantallen bacteriën op de materialen.....	15
3.2.3 Invloed van de materialen op de biomassaconcentratie (BMC) in het testwater.....	17
3.2.4 Aantallen bacteriën in het water .....	19
3.3 De verdeling van biomassa over water en materialen.....	20
3.4 Relatie biomassavorming en groeibevordering van <i>Legionella</i> -bacteriën .....	22
3.5 Samenvatting resultaten .....	24
4 BIOFILMVORMING OP DE MATERIALEN IN DE REFERENTIE-OPSTELLING.....	26
4.1 Opzet en uitvoering van het onderzoek.....	26
4.2 De referentie-opstelling.....	26
4.3 Testwater .....	28
4.4 De biofilmmonitor.....	28
4.5 Wijze van bemonsteren en onderzochte parameters .....	29
4.6 Resultaten .....	30
4.6.1 Metingen aan de referentieopstelling.....	30
4.6.2 Metingen aan de biofilmmonitor .....	35
4.7 Samenvatting resultaten .....	36
5 DISCUSSIE.....	38
5.1 Invloed van testcondities op biofilmvorming.....	38
5.2 Keuze testmethode .....	40
5.3 Parameters en beoordelingscriteria .....	41
5.3.1 Parameters en beoordelingsbasis .....	41
5.3.2 Indeling in kwaliteitsklassen.....	43
5.3.3 Beoordeling op basis van gezondheidsrisico verbonden aan groeibevordering van ziekteverwekkende bacteriën .....	44
5.3.4 Beoordeling van leidingmaterialen voor binneninstallaties.....	46
6 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN .....	48
6.1 Conclusies .....	48
6.2 Aanbevelingen.....	48
LITERATUUR .....	50

BIJLAGE 1	Afzonderlijke meetwaarden van de biofilmconcentratie op de materialen
BIJLAGE 2	Afzonderlijke meetwaarden <i>Legionella</i> -concentratie op materialen
BIJLAGE 3	Afzonderlijke meetwaarden <i>Pseudomonas</i> -concentratie op materialen
BIJLAGE 4	Afzonderlijke meetwaarden Biomassaconcentraties in het water
BIJLAGE 5	Afzonderlijke meetwaarden <i>Legionella</i> in het testwater
BIJLAGE 6	Afzonderlijke meetwaarden <i>Pseudomonas</i> -concentratie in het testwater
BIJLAGE 7	Biofilm op de binnenwand van de leidingen (ATP-gegevens)
BIJLAGE 8	Meetwaarden waterkwaliteit (ATP-metingen)
BIJLAGE 9	IJzerafzettingssnelheid van het water
BIJLAGE 10	Mangaanafzettingssnelheid van het water
BIJLAGE 11	Voorschrift voor het bepalen van de biofilmvormingspotentie (LMB-006)
BIJLAGE 12	Waterkwaliteit Pompstation Tull en 't Waal (1992)



## SAMENVATTING

Ter beperking van de milieubelasting met koper wordt in het Duurzaam-Bouwen- (Dubo) pakket aanbevolen om in binneninstallaties leidingen van kunststof toe te passen in plaats van koper. Kunststoffen kunnen afbreekbare verbindingen afgeven die de groei van micro-organismen bevorderen. Een dertiental verschillende leidingmaterialen, die worden gebruikt in drinkwaterinstallaties, is daarom getest op de bevordering van de groei van micro-organismen in water. Deze materialen omvatten metalen en kunststoffen, waarbij de keuze van de kunststoffen bepaald werd door het marktaandeel van het betreffende product. Het onderzoek had tot doel:

- na te gaan in welke mate de diverse materialen in twee verschillende testen groei-bevorderend waren;
- een aanzet geven voor de beoordeling op basis van de mate van groeibevordering.

Alle materialen zijn getest in een statische test, de BVP-(biofilmvormingspotentie)-test. Vervolgens is een zestal materialen getest in een doorstroomtest, de referentieopstelling, waarmee de hydraulische condities die heersen in een drinkwaterinstallatie voor huishoudelijk gebruik werden gesimuleerd. In de BVP-test, die bij 25°C wordt uitgevoerd, wordt de concentratie van actieve biomassa (adenosinetrifosfaat, ATP) op het materiaal ('biofilm') en in het testwater (filtraat van langzame zandfilters) bepaald als functie van de tijd over een periode van 16 weken. De BVP-waarde van een materiaal is gedefinieerd als het gemiddelde van de biofilmconcentraties bepaald na 8, 12 en 16 weken. Op basis van de BVP-waarde en de biomassa-concentratie in het water kan de biomassa-productiepotentie (BPP) per oppervlakte-eenheid van het materiaal worden berekend. De referentie-opstelling werd gevoed met drinkwater en eveneens na 8, 12 en 16 weken werd de biofilmconcentratie gemeten in leidingsegmenten. In beide testen is tevens de groei van *Legionella*-bacteriën op het materiaal en in het water bepaald. De biofilmvormingssnelheid van het voedingswater van de referentieopstelling is bepaald met behulp van een biofilmmonitor, waarin glas als dragermateriaal voor de biofilm dienst doet.

De geteste materialen vertoonden onderling grote verschillen in de BVP-test. De laagste BVP-waarde (41 pg ATP/cm<sup>2</sup>) werd waargenomen met roestvast staal; waarden boven 1000 pg ATP/cm<sup>2</sup> werden gevonden bij een materiaal op PE-basis en op siliconen dat als positieve controle werd gebruikt. De vermeerdering van *Legionella*-bacteriën op het materiaal of in het water was in het algemeen sterker naarmate het materiaal sterker groeibevorderend was (hogere BVP-waarde). De mate van bevordering van de groei van *Legionella*-bacteriën, berekend op basis van de groei op het materiaal en in het water, lag tussen waarden <1000 kolonievormende eenheden (kve) per cm<sup>2</sup> (roestvast staal, glas) en waarden hoger dan 10<sup>4</sup> kve/cm<sup>2</sup> voor enkele materialen op PE-basis. In de referentie-opstelling werd veel minder biofilmvorming waargenomen dan in de BVP-test. De biofilmconcentraties lagen voor de diverse materialen tussen 80 pg ATP/cm<sup>2</sup> (PVC-C) en 240 pg ATP/cm<sup>2</sup> (koper) en waren bovendien duidelijk geringer dan in de biofilmmonitor. De verklaring hiervoor is dat de biofilmmonitor voortdurend werd doorstroomd met water, waardoor de biofilmvorming geheel werd bepaald door de aanvoer van afbreekbare stoffen met het water. Als gevolg van de beperkte doorstroomtijd (5% van de tijd) is de aanvoer van afbreekbare stoffen met het water in de referentie-opstelling veel geringer dan in de biofilmmonitor. Bovendien wordt de biofilm, die in de referentie-opstelling is gevormd in perioden van stilstand, waarschijnlijk weggespoeld bij doorstroming. Onder deze omstandigheden is zowel de invloed van het water als van de materialen op de biofilmvorming gering. Mede als gevolg van de relatief lage temperatuur (18°C) werden *Legionella*-bacteriën niet waargenomen in de referentie-opstelling.

Factoren zoals temperatuur en verblijftijd kunnen per installatie en ook in de tijd grote verschillen vertonen. Relatief lange verblijftijden (geen waterverbruik), opwarming en een grote oppervlakte/volume-verhouding versterken de groei van micro-organismen wanneer materialen groeibevorderende verbindingen afgeven. Door het ontbreken van controle op de waterkwaliteit in dergelijke situaties zijn preventieve maatregelen (ontwerp van de installatie, keuze materialen) van groot belang voor het beperken van vermeerdering van micro-organismen. Aanbevolen wordt daarom om de beoordeling van materialen voor drinkwaterinstallaties te baseren op het gedrag in de BVP-test.

Op basis van de mate van groeibevordering in de BVP-test kunnen materialen onderling worden vergeleken. Een objectieve beoordeling van de materialen op basis van de BVP- of BPP-waarde, eventueel aangevuld met gegevens over de mate van groeibevordering van *Legionella*-bacteriën, is echter nog niet mogelijk door:

- het ontbreken van informatie over biofilmconcentraties in drinkwater-installaties;
- het ontbreken van informatie over de verdeling van micro-organismen over biofilm en water in drinkwaterinstallaties en in de BVP-test onder invloed van doorstromen of verversen;
- het ontbreken een criterium voor het aantal *Legionella*-bacteriën in water.

Gegevens over de biofilmconcentraties in distributiesysteem zijn wel voorhanden en bieden aanknopingspunten voor de beoordeling van de BVP-waarden van materialen in contact met drinkwater. Voorgesteld wordt als uitgangspunt te hanteren dat de BVP- of BPP-waarde van een materiaal niet in belangrijke mate mag bijdragen aan de biofilmconcentratie op de leidingwand.

De eisen die aan de groeibevorderende eigenschappen van materialen in contact met drinkwater worden gesteld zijn afhankelijk van de condities waaronder deze materialen worden toegepast (zoals lengte leiding, oppervlakte/volume-verhouding, temperatuur). Daarom wordt aanbevolen om een systeem van kwaliteitsklassen (op basis van BVP- of BPP waarden) op te stellen voor materialen in contact met drinkwater.

# 1 VERANTWOORDING

Het in dit rapport beschreven onderzoek is uitgevoerd door Kiwa Onderzoek en Advies in opdracht van het Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieu (VROM), zaaknummer 9712.0030. De uitvoering van het onderzoek werd begeleid door een projectgroep bestaande uit:

ing. D. Vonk (voorzitter)	VROM
drs. F.O. Dorgelo	VROM
ing. L.J. van Driel	Kiwa N.V.
prof.dr.ir. D. van der Kooij	Kiwa N.V.
dr.ir. E.J.T.M. Leenen	RIVM
ing. K.H. Poortema	VEWIN
drs. P.G.G. Slaats	Kiwa N.V.
drs. R. Teunissen	RIZA
H.R. Veenendaal (secretaris)	Kiwa N.V.





Koper afkomstig uit koperen waterleidingen vormt een aanzienlijke deel van de koperbelasting van het aquatische milieu [Commissie Intergraal Waterbeheer, 1997]. Ter beperking van deze belasting is in het Duurzaam Bouwen (Dubo)-pakket de aanbeveling opgenomen om binnen de woning waterleidingen van kunststof in plaats van koper te gebruiken [Jansen, losbladig].

Leidingmaterialen van kunststof kunnen verbindingen afgeven die de groei van micro-organismen bevorderen. Onder bepaalde omstandigheden kan dit de vermeerdering veroorzaken van opportunistisch-pathogene bacteriën zoals *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium spp.* en *Pseudomonas aeruginosa* [Colbourne and Pratt, 1984, Rogers et al., 1994, Nideveld et al, 1986, Groothuis et al., 1983]. Ook kan de groei worden versterkt van micro-organismen die in esthetisch opzicht ongewenst zijn [Burman, 1979]. De afgifte van afbreekbare verbindingen door kunststoffen betreft in de regel verbindingen die aan de kunststof worden toegevoegd ter verbetering van de eigenschappen van het materiaal (stabilisatoren, anti-oxidantia, kleurstoffen etc.). In Duitsland en in Engeland worden kunststofmaterialen in contact met drinkwater beoordeeld op groeibevorderende werking [British Standard, 1988, DVGW, 1990]. In Nederland is voor dit doel eveneens een werkwijze ontwikkeld, namelijk de bepaling van de biofilmvormingspotentie (BVP) [Van der Kooij and Veenendaal, 1993]. De meeste leidingmaterialen in Nederland die in distributiesystemen worden toegepast zijn met deze methode getest. Gegevens over de groeibevorderende eigenschappen van leidingmaterialen voor toepassing in binneninstallaties ('achter de watermeter') zijn echter nog niet voorhanden. Evenmin is informatie beschikbaar over de invloed van materialen op het optreden van vermeerdering van micro-organismen in drinkwaterinstallaties in de praktijk. De invloed van afgifte van groeibevorderende verbindingen op het optreden van groei van micro-organismen kan in dergelijke systemen relatief groot zijn vanwege:

- de relatief hoge oppervlakte/volume-verhoudingen;
- hogere temperaturen en
- langere perioden van stilstand (bijvoorbeeld in weekends).

Tegenover deze nadelen staat echter dat het verblijf van het water in een drinkwaterinstallatie bij doorstromen meestal kort is (enkele minuten) in vergelijking met het verblijf in het distributiesysteem (uren/dagen).

VROM heeft Kiwa opdracht gegeven tot onderzoek naar de biofilmvormende eigenschappen van kunststof leidingmaterialen voor drinkwaterinstallaties. Dit onderzoek omvat het bepalen van de mate van de biofilmvorming op deze materialen in een statische (batch) test en in een dynamische (doorstroom) test. Doelen van dit onderzoek zijn:

- vergelijken van geselecteerde materialen met behulp van deze methoden;
- een advies opstellen voor een beoordelingscriterium m.b.t. groeibevordering.

In eerste instantie is een inventarisatie gemaakt van de op de markt zijnde kunststof materialen en zijn materialen geselecteerd voor onderzoek. Daarna is de biofilmvormingspotentie (BVP) van deze materialen bepaald in een statische test. Vervolgens zijn enkele van deze materialen onderzocht in een proefopstelling onder condities die overeenkomen met die in een huishoudelijke drinkwaterinstallatie.

In dit rapport worden de resultaten van deze testen beschreven. Tevens wordt een aanzet gemaakt voor het beoordelen van kunststof leidingmaterialen voor binnenhuisin-

stallaties op basis van biofilmvormende eigenschappen en groeibevordering van geselecteerde micro-organismen.

### 3 DE BEPALING VAN DE BIOFILMVORMINGS- POTENTIE VAN GESELECTEERDE MATERIALEN

#### 3.1 Opzet en uitvoering van het onderzoek

##### 3.1.1 Selectie van de materialen

Alleen gecertificeerde materialen zijn in het onderzoek opgenomen. Een overzicht van de gecertificeerde kunststof leidingsystemen in Nederland is weergegeven in de lijst met goedgekeurde systemen [Kiwa, 1998].

De keuze voor de te testen systemen is gebaseerd op de volgende criteria:

- materiaalsamenstelling. Van elk type kunststof zijn minimaal twee systemen getest. Bovendien is een op de markt te verwachten kunststof meegenomen;
- productieproces. Voor de kunststof leidingmaterialen bestaan alleen voor PE-X verschillende productieprocessen. Voor PE-X worden twee systemen getest; één geproduceerd volgens het meest toegepaste productieproces (PE-Xc) en één systeem volgens een minder toegepast proces (PE-Xa);
- marktaandeel. De marktaandelen van de verschillende kunststof leidingsystemen zijn grofweg bekend bij Kiwa N.V. Voor de koperen leidingen is eveneens gebruikt gemaakt van gegevens over marktaandelen bij Kiwa N.V. Voor de levering van RVS is één fabrikant beschikbaar.

De materialen zijn door de fabrikanten of importeurs aangeleverd bij Kiwa, al of niet voorzien van bijbehorende koppelstukken en benodigde lijm. De fittingen en lijm zijn niet getest op biofilmvormingspotentie.

Tabel 1. Leidingsystemen die zijn geselecteerd voor de BVP-test

Materiaal	Omschrijving
PE-Xa	Polyethyleen, gecrosslinked
PE-Xc (2x)	Polyethyleen, gecrosslinked
A1/PE-MD	Polyethyleen, gecrosslinked, inwendig versterkt met aluminium-folie
PP-R (2x)	Polypropreen (random copylmeer)
PB (2x)	Polybuteen
PVC-C (2x)	Nagechloreerd polyvinylchloride
Cu halfhard gestraald	Koper
Cu halfhard gedesoxi- deerd	Koper
RVS AISI 316	Roestvast staal

De buitendiameter van de materialen bedraagt ca 15 mm. Van de materialen zijn stukjes (ringetjes) gezaagd met een totale oppervlakte van circa 8 cm<sup>2</sup>. Vervolgens zijn deze ringetjes gedurende 1 uur gespoeld in koud stromend drinkwater. De controle-materialen glas en RVS (en de RVS-ringetjes voor de verzwaring van de materialen), zijn gereinigd door ze gedurende 4 uur te verhitten bij 550 °C.

De werkwijze die is gevolgd voor het bepalen van de biofilmvormingspotentie van materialen in contact met (drink)water is in detail beschreven in bijlage 11. Hieronder is de werkwijze in beknopte vorm weergegeven. Representatieve monsters (met een totaal oppervlak van ca 100 cm<sup>2</sup>) van het te onderzoeken materiaal werden geplaatst in 600 ml biologisch stabiel drinkwater (filtraat van langzame zandfilters, representatief voor drinkwater in Nederland) waaraan bepaalde voedingszouten (kaliumnitraat en kalium-diwaterstoffosfaat) en micro-organismen uit rivierwater (afkomstig uit het Lekkanaal) zijn toegevoegd [Van der Kooij and Veenendaal, 1993 ]. Dit water met de materialen werd in het donker geïncubeerd bij 25 ± 1 °C gedurende een periode van 16 weken. Vervolgens werd het gehalte adenosinetrifosfaat (ATP) op de materialen en in het water na verschillende incubatieperioden gemeten. Het ATP-gehalte is een maat voor de concentratie actieve biomassa. De biofilmvormingspotentie (BVP) van een materiaal is gedefinieerd als de gemiddelde biofilmconcentratie (uitgedrukt in pg ATP/cm<sup>2</sup>) na 56, 84 en 112 dagen blootstelling. De biomassaconcentratie (BMC) in het water is gedefinieerd als de gemiddelde concentratie biomassa (uitgedrukt in pg ATP/ml) na 56, 84 en 112 dagen blootstelling.

Als controles werd water zonder toevoeging van een materiaal, water met glas en water met siliconenslang meegenomen. Om drijven tegen te gaan zijn enkele materialen (PE-Xa, PE-Xc, PP-R en PB) verzwaard met ringetjes van roestvast staal (RVS) die met behulp van een RVS-draadje aan de materialen bevestigd werden. Daarom is bij de proef ook een controle meegenomen van water met deze RVS-ringetjes.

Het testen van alle geselecteerde materialen tegelijk was om technische redenen niet mogelijk. Daarom zijn drie proefseries ingezet. Bij elke serie zijn de benodigde controles (testwater, glas, RVS en siliconen) meegenomen. Eén van materialen (PE-Xa) is in twee testen meegenomen. Alle monsters zijn gedurende 112 dagen (16 weken) geïncubeerd bij 25°C, de maximaal toegestane temperatuur van drinkwater (Waterleidingbesluit). Bij deze temperatuur kunnen de meeste water-bacteriën zich goed vermeerderen. Gedurende deze periode is periodiek (na 7, 14, 28, 56, 84 en 112 dagen) de concentratie van biomassa op het materiaal (biofilm) en in het water bepaald met behulp van metingen van adenosinetrifosfaat (ATP). Biomassa op het materiaal werd vrijgemaakt met behulp van ultrasone trillingen (40 KHz).

#### *Toevoeging geselecteerde micro-organismen*

De BVP-test werd uitgebreid door enten met cultures van *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium* spp. en bacteriën van de coligroep (tabel 2), zodanig dat het aantal kolonievormende eenheden per type organisme maximaal ca. 100 per ml bedroeg. Het doel van deze toevoegingen was na te gaan of de materialen in staat waren de groei van deze micro-organismen te bevorderen onder de testcondities. De selectiecriteria van deze micro-organismen zijn beschreven in § 3.1.3

Tabel 2. Toegevoegde bacterie-cultures

Micro-organisme	Stam	Herkomst
<i>Legionella pneumophila</i>	M-980082	warm water
	M-980140	warm water
	Controlestam <i>Legionella</i>	warm water
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WP1	RIVM, water
	WP5	RIVM, water
	M-980447	Lekkanaal
<i>Mycobacterium avium</i>	myc 97-01651	RIVM, water
<i>Mycobacterium kansasii</i>	myc 394	RIVM, water
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	myc 97-1392	RIVM, water
<i>Escherichia coli</i>	WR1	RIVM, water
<i>Enterobacter cloacae</i>	WR3	RIVM, water
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	873	Drinkwater

De concentraties van deze toegevoegde cultures werden bepaald op de materialen en in het water op dagnummers 56, 84 en 112 (nadat het aantal toegevoegde kolonievormende eenheden bepaald was op de dag van het toevoegen). Het aantal *Legionella* bacteriën werd bepaald volgens NEN 6265 (1991), het aantal pseudomonassen volgens NEN 6573 (1987), en de bacteriën van de coligroep volgens NEN 6553 (1981). De concentratie van mycobacteriën aanwezig op de materialen en in het testwater werd bepaald met behulp van de isolatiemethode [Engel en Berwald, 1980]. Bevestigingen van verdachte kolonies (mogelijk *Mycobacterium*) werden uitgevoerd met een specifieke kleuring voor zuurvaste staafjes (auramine-kleuring).

De minerale olie op de koperen buizen is bepaald met behulp van GC-FID (gaschromatografie-vlam ionisatie detector)

### 3.1.3 Selectie micro-organismen

Voor de beoordeling van de groei van (pathogene) micro-organismen op materialen voor binnenhuisinstallaties zijn de hieronder aangegeven micro-organismen geselecteerd.

- ***Micro-organismen uit rivierwater***  
Om een zo breed mogelijk scala aan micro-organismen die in het milieu aanwezig zijn bij de beoordeling van materialen (in de statische laboratorium-test) te betrekken, werd rivierwater (afkomstig uit het Lekkanaal) toegevoegd. Doordat deze ent door een membraanfilter van 1,2 µm werd gefiltreerd, zijn alle eventuele storende protozoa verwijderd.
- ***Bacteriën van de coligroep***  
Bacteriën van de coligroep mogen niet in drinkwater voorkomen. De geselecteerde stammen zijn alle afkomstig uit water.
- ***Pseudomonas aeruginosa***  
De soort is opportunistisch pathogeen. De geselecteerde stammen zijn alle afkomstig uit water.
- ***Legionella pneumophila***  
Ook dit soort is opportunistisch pathogeen. Gekozen is voor gebruik van direct uit water afkomstige bacteriën (zonder te zijn overgeënt op vaste voedingsbodems) met begeleidende flora.

### *Mycobacteriën*

Ook sommige mycobacteriën zijn opportunistisch pathogeen. Sommige mycobacteriën, waaronder de geselecteerde stammen, komen in drinkwater voor [Schulze-Röbbecke und Hagenau en Good, 1985].

## 3.2 Resultaten

### 3.2.1 De biofilmvormingspotentie (BVP) van de materialen

De BVP-waarden van de materialen zijn opgenomen in *tabel 3* en grafisch weergegeven in *figuur 1*. De afzonderlijke meetwaarden van de biofilmconcentratie zijn grafisch weergegeven in bijlage 1. Na 233 (test 1), 208 (test 2) en 190 (test 3) dagen is op de materialen nogmaals de biofilm-concentratie bepaald. De resultaten hiervan zijn eveneens weergegeven in *tabel 3*.

*Tabel 3. De biofilmvormingspotentie (BVP) (het gemiddelde van de biofilmconcentraties op de dagnummers 56, 84 en 112) alsmede de resultaten van de metingen op dagnummers 233, 208 en 190*

Materiaal	BVP ± sd (pg ATP/cm <sup>2</sup> )	Biofilmconcentratie ± sd (pg ATP/cm <sup>2</sup> )
Test 1		na 233 dagen
PE-Xa	1400 ± 200	350 ± 60
PE-Xc (1)	400 ± 60	390 ± 100
PP-R (1)	370 ± 110	200 ± 50
PP-R (2)	600 ± 100	230 ± 30
PB (1)	220 ± 70	180 ± 40
PVC-C (1)	140 ± 60	45 ± 4
PVC-C (2)	270 ± 80	82 ± 18
Testwater (controle)	n.v.t.	n.v.t.
Siliconenslang (controle)	1600 ± 500	210 ± 50
Glas (controle)	12 ± 2	9,6 ± 3,7
RVS (controle)	70 ± 10	45 ± 8
Materiaal	BVP ± sd (pg ATP/cm <sup>2</sup> )	na 208 dagen
test 2		
PE-Xc (2)	930 ± 340	640 ± 60
PE-Xa (herhaling)	1300 ± 100	300 ± 80
PB (2)	650 ± 160	190 ± 10
Koper (1)	590 ± 460	120 ± 10
Koper (2)	350 ± 140	76 ± 19
RVS	41 ± 14	23 ± 3
Testwater (controle)	n.v.t.	n.v.t.
Siliconenslang (controle)	990 ± 290	280 ± 20
Glas (controle)	13 ± 2	23 ± 1
RVS (controle)	93 ± 15	51 ± 2

Materiaal test 3	BVP ± sd (pg ATP/cm <sup>2</sup> )	na 190 dagen
Al/PE-MD	730 ± 140	920 ± 90
Testwater (controle)	n.v.t.	n.v.t.
Siliconenslang (controle)	1500 ± 600	1200 ± 500
Glas (controle)	17 ± 6	10 ± 2

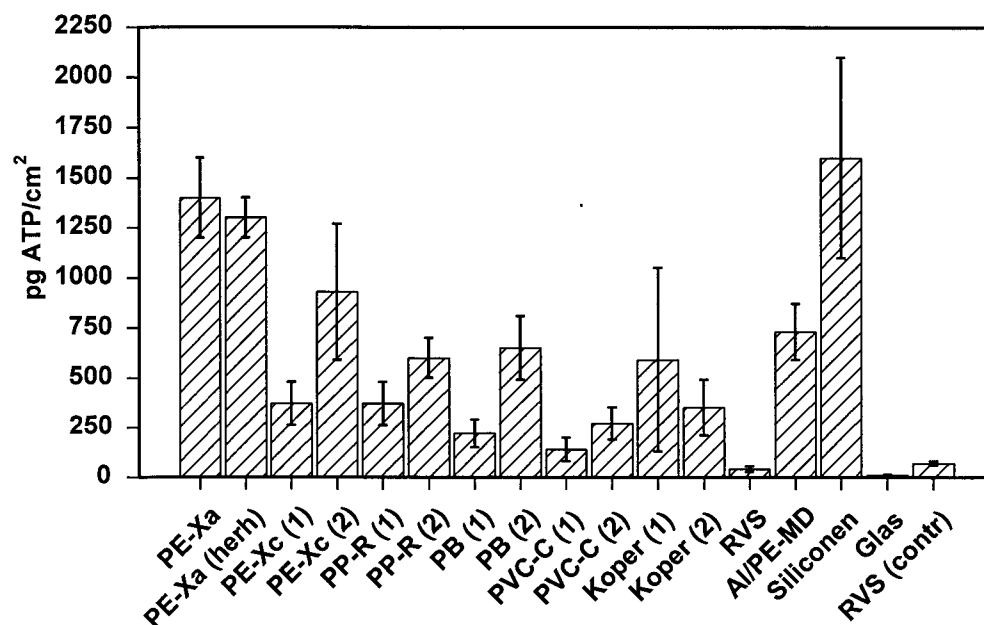
Uit tabel 3 komt naar voren dat alleen bij RVS en glas de BVP-waarde lager was dan 100 pg ATP/cm<sup>2</sup>. Van een aantal materialen namelijk PE-Xc (1), PP-R (1), PB (1), en de beide PVC-C materialen waren de BVP-waarden kleiner is dan 500 pg ATP/cm<sup>2</sup>. Alleen PE-Xa heeft een biofilmvormingspotentie die groter is dan 1000 pg ATP/cm<sup>2</sup>.

Bij een aantal materialen was de biofilmconcentratie aanvankelijk relatief hoog. Daarna trad een stabilisatie op na 56 dagen blootstelling aan het testwater (bijlage 1). Bij de beide koperen leidingen en ook bij PP-R nam de biofilmdichtheid na 56 dagen echter nog toe. De relatief hoge BVP-waarde van de beide koper-soorten houdt mogelijk verband met de aanwezigheid van resten minerale olie op de buiswand of het optreden van corrosie. Uit metingen bleek dat op de binnenwand van koper(1) 0,7 µg minerale olie/cm<sup>2</sup> en op de buitenwand 1,9 µg minerale olie/cm<sup>2</sup> aanwezig was. Bij koper(2) was het gehalte minerale olie op de binnenwand <0,2 µg /cm<sup>2</sup> en op de buitenwand 0,5 µg /cm<sup>2</sup>. De BVP-waarde van RVS dat diende als verzwaringsmateriaal was hoger dan die van glas. Bij deze materialen werd enige corrosie waargenomen, mogelijk als gevolg van verhitting bij 550 °C. De BVP-waarde van RVS heeft geen invloed op de BVP-waarden van de materialen die met RVS werden verzwaard.

Uit de resultaten van de metingen op de dagen 233, 208 en 190 blijkt dat de biofilmconcentraties op koper(2) en RVS zijn afgenomen tot waarden beneden 100 pg ATP/cm<sup>2</sup>. Dit was eveneens het geval bij de beide PVC-C materialen.

De reproduceerbaarheid van de drie afzonderlijke testen blijkt goed te zijn. De BVP-waarden van de controles, maar ook die van het in twee testen meegenomen PE-Xa-materiaal komen goed met elkaar overeen. Hierdoor mogen de BVP-waarden van de materialen die in de drie aparte testen beoordeeld zijn, met elkaar vergeleken worden.





Figuur 1. De biofilmvormingspotentie (in pg ATP/cm<sup>2</sup> ± s.d.) van de materialen

### 3.2.2 Aantallen bacteriën op de materialen

De koloniegetallen van de diverse typen bacteriën op de materialen (het gemiddelde van de aantallen gemeten op dag 56, 84 en 112) zijn weergegeven in tabel 4.

Tabel 4. De koloniegetallen van de diverse typen micro-organismen op de materialen, het gemiddelde van de gemeten waarden op de dagnummers 56, 84 en 112

Materiaal Test 1	<i>Legionella</i> (kve/cm <sup>2</sup> ) ± sd	Trend	<i>Pseudomonas</i> (kve/cm <sup>2</sup> ) ± sd	trend	Bacteriën van de coligroep (kve/cm <sup>2</sup> ) ± sd	trend
PE-Xa	120 ± 90	↑	55 ± 41	↑	160 ± 270	↓
PE-Xc (1)	560 ± 450	↓	48 ± 38	↓	41 ± 71	↓
PP-R (1)	300 ± 190	-	160 ± 90	-	280 ± 480	↓
PP-R (2)	6200 ± 8700	↑	300 ± 320	↓	600 ± 1000	↓
PB (1)	4800 ± 1600	-	230 ± 150	-	550 ± 950	↓
PVC-C (1)	250 ± 30	-	150 ± 140	↓	300 ± 520	↓
PVC-C (2)	3400 ± 2200	-	160 ± 90	-	250 ± 440	↓
Testwater (controle)	n.v.t.		n.v.t.		n.v.t.	

Siliconenslang (controle)	40 ± 27	-	130 ± 110	-	120 ± 210	↓
Glas (controle)	9,2 ± 11,5	-	7,4 ± 12,8	↓	3,7 ± 6,4	↓
RVS (controle)	190 ± 80	-	120 ± 110	-	n.a. <sup>1)</sup>	
Materiaal Test 2	<i>Legionella</i> (kve/cm <sup>2</sup> ) ± sd		<i>Pseudomonas</i> (kve/cm <sup>2</sup> ) ± sd		Bacteriën van de coligroep (kve/cm <sup>2</sup> ) ± sd	
PE-Xc (2)	1100 ± 800	↓	310 ± 110	-	n.a.	
PE-Xa (herhaling)	16000 ± 16000	↓	180 ± 200	↓	n.a.	
PB (2)	2000 ± 1100	↓	440 ± 190	-	n.a.	
Koper (1)	770 ± 1210	-	n.a.		n.a.	
Koper (2)	61 ± 25	-	n.a.		n.a.	
RVS	38 ± 24	-	200 ± 90	↓	n.a.	
Testwater (controle)	n.v.t.		n.v.t.		n.v.t.	
Siliconenslang (controle)	35 ± 18	↓	220 ± 90	-	n.a.	
Glas (controle)	92 ± 95	-	13 ± 22	↓	n.a.	
RVS (controle)	350 ± 150	↑	12 ± 11	↓	n.a.	
Materiaal Test 3	<i>Legionella</i> (kve/cm <sup>2</sup> ) ± sd		<i>Pseudomonas</i> (kve/cm <sup>2</sup> ) ± sd		Bacteriën van de coligroep (kve/cm <sup>2</sup> ) ± sd	
Al/PE-MD	12000 ± 14000	↓	n.a.		n.a.	
Testwater (controle)	n.v.t.		n.v.t.		n.v.t.	
Siliconenslang (controle)	130 ± 80	-	n.a.		n.a.	
Glas (controle)	58 ± 20	-	n.a.		n.a.	

<sup>1)</sup> = niet aantoonbaar

De koloniegetallen op de diverse materialen laten een minder duidelijk beeld zien dan de BVP-waarden. De hoge spreiding tussen de meetresultaten op de dagen 56, 84 en 112 werd vooral veroorzaakt door toename of afname van de koloniegetallen in de betreffende periode (zie bijlagen 2 en 3). De maximum waarden van de koloniegetallen van *Legionella*-bacteriën waren hoger dan 10<sup>4</sup> kve/cm<sup>2</sup> op de materialen PP-R (2), PE-Xa (herhaling) en op Al/Pe-MD. Op de materialen PE-Xc(1), PB(1), PB(2), PVC-C(2) en koper (1) waren de maximale kolonietallen van *Legionella* >10<sup>3</sup> kve/cm<sup>2</sup>. Op koper(1) en RVS bleef het maximum koloniegetal lager dan 100 kve/cm<sup>2</sup>. Bij enkele materialen (PE-Xc (1), PE-Xc(2) en koper(1)) was het koloniegetal na 112 dagen afgenomen tot een waarde beneden 1000 kve/cm<sup>2</sup>. Op PE-Xa (eerste proef) PP-R(2) nam het koloniegetal van *Legionella*-bacteriën toe met toenemende duur van de incubatie in het testwater. De koloniegetallen van *Pseudomonas* vertoonden een geheel ander beeld. Op de beide koperen materialen werd in het geheel geen *Pseudomonas* waargenomen.

Alleen in de eerste test zijn bacteriën van de coligroep waargenomen (op dag 56). Vastgesteld is dat in de tweede en derde testserie bacteriën van de coligroep waren geënt, maar deze organismen zijn op geen enkel materiaal waargenomen. De oorzaak

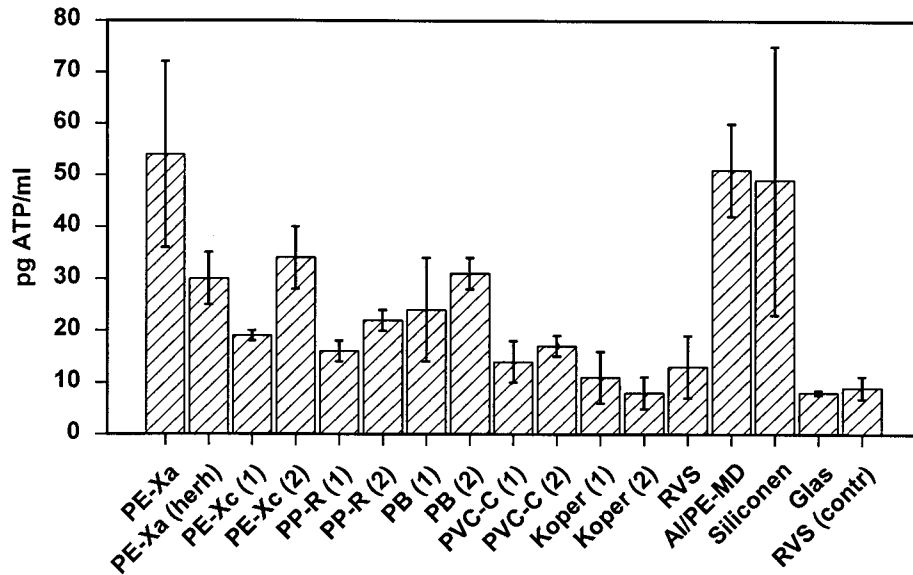
hiervan is niet bekend. Groei van mycobacteriën werd niet waargenomen. Een enkele keer werd op een materiaal een enkele mycobacterie aangetroffen.

### 3.2.3 Invloed van de materialen op de biomassaconcentratie (BMC) in het testwater

De BMC-waarden zijn opgenomen in *tabel 5* en grafisch weergegeven in *figuur 3*. De afzonderlijke meetwaarden die tot de BMC hebben geleid zijn grafisch weergegeven in bijlage 4. De resultaten van de koloniegetallen (het gemiddelde aantal dat gemeten is op de dagen 56, 84 en 112 is weergegeven in *tabel 6*).

*Tabel 5. De biomassaconcentratie (BMC) in het testwater (gemiddelde van de concentraties gemeten op de dagnummers 56, 84 en 112)*

Materiaal Test 1	Biomassaconcentratie ± sd (pg ATP/ml)	trend
PE-Xa	54 ± 18	-
PE-Xc (1)	19 ± 1	-
PP-R (1)	16 ± 2	-
PP-R (2)	22 ± 2	-
PB (1)	24 ± 10	↓
PVC-C (1)	14 ± 4	↓
PVC-C (2)	17 ± 2	-
Testwater (controle)	5,9 ± 2,0	-
Siliconenslang (controle)	49 ± 26	↓
Glas (controle)	8,0 ± 0,4	-
RVS (controle)	9,0 ± 2,2	-
Materiaal Test 2	Biomassaconcentratie ± sd (pg ATP/ml)	
PE-Xc (2)	34 ± 6	↓
PE-Xa (herhaling)	30 ± 5	↓
PB (2)	31 ± 3	-
Koper (1)	11 ± 5	↓
Koper (2)	8,0 ± 3,1	↓
RVS	13 ± 6	↓
Testwater (controle)	6,6 ± 2,6	↓
Siliconenslang (controle)	39 ± 8	↓
Glas (controle)	8,0 ± 1,8	↓
RVS (controle)	12 ± 1	-
Materiaal Test 3	Biomassaconcentratie ± sd pg ATP/ml	
Al/PE-MD	51 ± 9	-
Testwater (controle)	6,5 ± 1,3	-
Siliconenslang (controle)	170 ± 80	↓
Glas (controle)	6,8 ± 1,9	↓



*Figuur 3. De biomassaconcentratie (BMC, in pg ATP/ml) in water*

De BMC- waarden in het testwater laten een zelfde beeld zien als de BVP-waarden van de materialen. Ook hier blijkt de reproduceerbaarheid goed te zijn. In aanwezigheid van de kunststof materialen werden hogere BMC-waarden waargenomen dan in aanwezigheid van glas respectievelijk RVS

## 3.2.4

## Aantallen bacteriën in het water

Tabel 6. Koloniegetallen van *Legionella*, *Pseudomonas* en bacteriën van de coligroep in het testwater (gemiddelde van de metingen op de dagnummers 56, 84 en 112)

Materiaal	<i>Legionella</i> (kve/ml) ± sd	Trend	<i>Pseudomonas</i> (kve/ml) ± sd	trend	Bacteriën van de coligroep (kve/ml) ± sd	trend
Test 1						
PE-Xa	89 ± 67	↓	22 ± 21	↓	80 ± 93	↓
PE-Xc (1)	168 ± 104	↓	63 ± 75	↓	170 ± 190	↓
PP-R (1)	330 ± 320	↓	3,0 ± 3,3	↓	5,0 ± 5,8	↓
PP-R (2)	17 ± 10	↓	46 ± 55	↓	70 ± 80	↓
PB (1)	170 ± 80	-	99 ± 10	-	67 ± 77	↓
PVC-C (1)	14 ± 16	↓	8,0 ± 8,4	↓	3,0 ± 3,8	↓
PVC-C (2)	8,0 ± 1,9	↓	29 ± 30	↓	55 ± 64	↓
Testwater (controle)	110 ± 40	↑	2,0 ± 1,9	↓	2,0 ± 1,9	↓
Siliconenslang (controle)	110 ± 60	↓	24 ± 34	↓	42 ± 48	↓
Glas (controle)	20 ± 15	↓	n.a. <sup>1)</sup>		2,0 ± 1,9	↓
RVS (controle)	110 ± 100	↓	n.a.		5,0 ± 5,8	↓
Materiaal Test 2	<i>Legionella</i> (kve/ml)		<i>Pseudomonas</i> (kve/ml)		Bacteriën van de coligroep (kve/ml)	
PE-Xc (2)	680 ± 810	↓	78 ± 62	↓	n.a.	
PE-Xa (herhaling)	1200 ± 600	↓	72 ± 64	↓	n.a.	
PB (2)	200 ± 110	↓	32 ± 34	↓	n.a.	
Koper (1)	220 ± 40	-	n.a.		n.a.	
Koper (2)	160 ± 60	-	n.a.		n.a.	
RVS	54 ± 41	↓	22 ± 20	↓	n.a.	
Testwater (controle)	71 ± 55	↓	12 ± 14	↓	n.a.	
Siliconenslang (controle)	300 ± 340	↓	10 ± 9	↓	n.a.	
Glas (controle)	33 ± 44	↓	3,0 ± 3,8	↓	n.a.	
RVS (controle)	130 ± 140	↓	110 ± 110	↓	n.a.	
Materiaal Test 3	<i>Legionella</i> (kve/ml)		<i>Pseudomonas</i> (kve/ml)		Bacteriën van de coligroep (kve/ml)	
Al/PE-MD	1500 ± 900	↓	n.a.		n.a.	
Testwater (controle)	13 ± 5	↓	n.a.		n.a.	
Siliconenslang (controle)	1200 ± 1000	↓	n.a.		n.a.	
Glas (controle)	7 ± 7	↓	n.a.		n.a.	

<sup>1)</sup>= niet aantoonbaar

In aanwezigheid van de meeste materialen trad aanvankelijk een (sterke) groei van *Legionella* op maar de koloniegetallen daalden na verloop van tijd (bijlagen 5 en 6). Bij enkele materialen, namelijk PE-Xa (herhaling), PE-Xc(2), en Al/PE-MD werden waarden boven 1000 kve/ml waargenomen. In aanwezigheid van de beide PVC-C materialen was de groei van *Legionella*-bacteriën in het water gering. Na 112 dagen waren de koloniegetallen van *Legionella* in het water in aanwezigheid van de meeste afgenomen tot waarden van circa 100 kve/ml of lager. In aanwezigheid van PE-Xa (herhaling) en Al/PE-MD was het koloniegetal na 112 dagen nog circa  $10^3$  kve/ml. Enige groeibevordering veroorzaakt door RVS dat dienst deed als verzwaringsmateriaal kan van invloed zijn geweest op de koloniegetallen in het water met enkele materialen die met RVS-ringetjes zijn verzwaard.

In aanwezigheid van de beide koperen materialen werden geen *Pseudomonas*-bacteriën aangetoond in het water. De verklaring hiervoor moet waarschijnlijk worden gezocht in de gevoeligheid van *Pseudomonas*-bacteriën voor koper-ionen. *Legionella* is daar minder gevoelig voor [Habicht en Müller, 1988].

Alleen in de eerste serie waren de koloniegetallen van de bacteriën van de coligroep in het water met het testmateriaal meestal hoger dan in de negatieve controle (glas en testwater zonder materiaal). Groei van mycobacteriën werd niet waargenomen. Een enkele keer werd in het testwater een enkele mycobacterie aangetroffen.

### 3.3 De verdeling van biomassa over water en materialen

Tabel 7. De biofilmvormingspotentie (BVP), biomassaconcentratie (BMC) en de Biomassa-productiepotentie (BPP) van de materialen in de BVP-test.. BPP-bl water is de Biomassa-productiepotentie gecorrigeerd voor de biomassa productie in het water (blanco); % mat, bijdrage (percentage) van de biomassa op het materiaal aan de netto BPP; % wat, bijdrage (percentage) van de biomassa in het water aan de netto BPP.

Materiaal	BVP pg ATP/cm <sup>2</sup>	BMC ng ATP/l	BPP pg ATP/cm <sup>2</sup>	BPP-bl water pg ATP/cm <sup>2</sup>	% mat	% wat
water, bl (1)	0	5,9	35,4	0		
Glas(1)	12	8	60	24,6	48,8	51,2
RVS, contr.(1)	70	9	124	88,6	79,0	21,0
Silicon(1)	1600	49	1894	1858,6	86,1	13,9
PE-Xa	1400	54	1724	1688,6	82,9	17,1
PE-Xc(1)	400	19	514	478,6	83,6	16,4
PP-R(1)	370	16	466	430,6	85,9	14,1
PP-R(2)	600	22	732	696,6	86,1	13,9
PB(1)	220	24	364	328,6	67,0	33,0
PVC-C(1)	140	14	224	188,6	74,2	25,8
PVC-C(2)	270	17	372	336,6	80,2	19,8
water, bl (2)	0	6,6	39,6	0		
Glas (2)	13	8	61	21,4	60,7	39,3
RVScontr.(2)	93	12	165	125,4	74,2	25,8
Silicon(2)	990	39	1224	1184,4	83,6	16,4
PE-Xc(2)	930	34	1134	1094,4	85,0	15,0
PE-Xa (herh.)	1300	30	1480	1440,4	90,3	9,7
PB (2)	650	31	836	796,4	81,6	18,4
Koper(1)	590	11	656	616,4	95,7	4,3
Koper (2)	350	8	398	358,4	97,7	2,3
RVS	41	13	119	79,4	51,6	48,4
water(bl) (3)	0	6,5	39	0		
Glas (3)	17	7	59	20	85,0	15,0
Silicon(3)	1500	170	2520	2481	60,5	39,5
Al/PE-MD(1)	730	51	1036	997	73,2	26,8

De invloed van een materiaal op de groei van bacteriën kan in de BVP-test worden afgeleid van de biomassa-concentratie op het materiaal (BVP) en de biomassa-concentratie in het water (BMC). Uit deze parameters kan de biomassa-productie potentie (BPP) berekend worden. Hierbij geldt:  $BPP \text{ (pg ATP/cm}^2\text{)} = BVP \text{ (pg ATP/cm}^2\text{)} + [BMC \text{ (pg ATP/ml)} \times \text{volume water/oppervlakte materiaal}]$ . Het volume van het water bedroeg 600 ml; het uitwendige oppervlak van de materialen was 100 cm<sup>2</sup>. De BPP-waarde is dus een maat voor de totale hoeveelheid actieve biomassa (uitgedrukt als ATP) die per oppervlak is gevormd. De berekening van de BPP-waarden is weergegeven in tabel 7. Tevens is in deze tabel de procentuele verdeling van de biomassa over het water (% wat) en het materiaal (% mat) weergegeven. Naar voren komt dat onder de testcondities in de regel meer dan 70 à 80 % van de biomassa zich op het materiaal bevond (BVP). Bij materialen glas en RVS was dit minder dan 30 à 40%. Een overkomende berekening is uitgevoerd met de aantallen *Legionella*-bacteriën op het materiaal en in het water. Op deze wijze is ook de totale groei van *Legionella*-bacteriën (*Legionella*-groei potentie (LegGP)) toegerekend naar oppervlakte-eenheid van het betreffende materiaal (tabel 8). Slechts bij een zestal materialen was het overgrote deel van de *Legionella*-bacteriën op het materiaal aanwezig (in de biofilm). Bij sommige materialen, waaronder het siliconen-materiaal (positieve controle) was het aandeel van de *Legionella*-groei op de materialen minder dan 6% van de totale groei van *Legionella*.

Tabel 8. De *Legionella*-groei potentie (LegGP) van de materialen in de BVP-test.

	LEG op materiaal	Leg in water	LegGP	% mat	% wat
	kve/cm2	kve/ml	kve/cm2		
PE-Xa	120	89	654	18,3	81,7
PE-Xc(1)	560	168	1568	35,7	64,3
PP-R(1)	300	330	2280	13,2	86,8
PP-R(2)	6200	17	6302	98,4	1,6
PB(1)	4800	170	5820	82,5	17,5
PVC-C(1)	250	14	334	74,9	25,1
PVC-C(2)	3400	8	3448	98,6	1,4
Silicon(1)	40	110	700	5,7	94,3
Glas (1)	9	20	129	7,0	93,0
RVS-contr.(1)	190	110	850	22,4	77,6
PE-Xc(2)	1100	680	5180	21,2	78,8
PE-Xa(herh.)	16000	1200	23200	69,0	31,0
PB(2)	2000	200	3200	62,5	37,5
Koper(1)	770	220	2090	36,8	63,2
Koper(2)	61	160	1021	6,0	94,0
RVS	38	54	362	10,5	89,5
Silicon(2)	35	300	1835	1,9	98,1
Glas(2)	92	33	290	31,7	68,3
RVS-contr.(2)	350	130	1130	31,0	69,0
Al/PE-MD(1)	12000	1500	21000	57,1	42,9
Silicon (3)	130	1200	7330	1,8	98,2
Glas(3)	58	7	100	58	42

### 3.4

#### Relatie biomassavorming en groeibevordering van *Legionella*-bacteriën

Van belang voor de beoordeling van de materialen in de BVP-test is onder meer de vraag of er een verband bestaat tussen de mate waarin een materiaal de vorming van biomassa bevordert en de mate waarin de groei van *Legionella*-bacteriën wordt versterkt. In *figuur 4* zijn voor de diverse materialen, inclusief de controles, de aantallen *Legionella*-bacteriën weergegeven als functie van respectievelijk de BVP-waarden, de BMC-waarden en de BPP-waarden van deze materialen. De BPP-waarden zijn gecorrigeerd voor de groei die is waargenomen in het water zonder materialen. De *Legionella*-aantallen en de BVP-waarden zijn laag voor glas en RVS en hoog voor enkele andere materialen. Worden de gegevens voor siliconen-materiaal buiten beschouwing gelaten (groei vond voornamelijk in het water plaats) dan blijkt uit toepassing van Student's t-toets dat er een zeer significante ( $P < 0,01$ ) positieve relatie bestaat tussen de BVP-waarde van een materiaal en het aantal *Legionella*-bacteriën op het materiaal. Overeenkomende resultaten werden verkregen bij statistische beoordeling van de relaties tussen aantallen *Legionella*-bacteriën en de biomassa-concentratie in het water (BMC) respectievelijk tussen de *Legionella*-groeipotentie en de biomassa-productie potentie (BPP). Hieronder zijn de lineaire relaties die zijn afgeleid weergegeven:

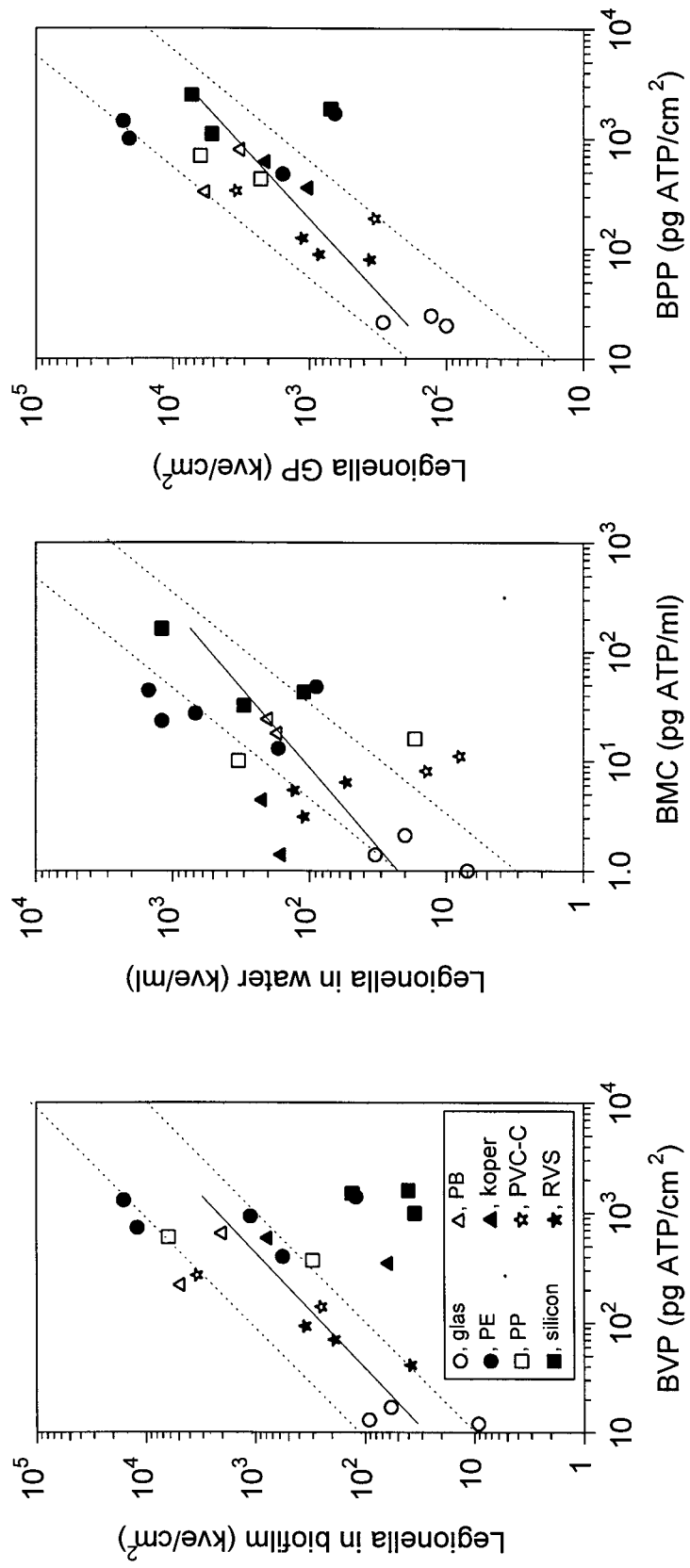
$$\text{Log} (\text{Legionella}/\text{cm}^2) = 0,953 \times \text{log BVP} + 0,486 \quad (r^2 = 0,486)$$

$$\text{Log} (\text{Legionella}/\text{ml}) = 0,674 \times \text{log BMC} + 1,372 \quad (r^2 = 0,357)$$

$$\text{Log} (\text{Legionella}/\text{cm}^2) = 0,743 \times \text{log BPP} + 1,309 \quad (r^2 = 0,541)$$

Samenvattend kan worden geconcludeerd dat in de BVP-test meer biomassavorming gepaard ging met meer groei van *Legionella*. Het verband was echter niet voldoende duidelijk voor het berekenen van kwantitatieve relaties tussen genoemde parameters.





Figuur 4. Relatie tussen biofilm- en biomassa- en aantal Legionella-bacteriën. De getrokken lijnen geven de berekende relaties weer; de stippellijnen geven het gebied aan waarbinnen een lineaire relatie kan bestaan tussen de vorming van biomassa en het aantal Legionella-bacteriën.

### 3.5 Samenvatting resultaten

De resultaten van de biofilmvormingspotentie-testen met de geselecteerde materialen kunnen als volgt worden samengevat:

- Met behulp van de BVP-test werden duidelijke verschillen in groeibevorderende werking van de materialen in contact met drinkwater aangetoond. De BVP-test leverde goed reproduceerbare resultaten.
- Alle geteste materialen vertoonden een sterkere biofilmvorming dan glas.
- Van de geteste materialen vertoonde het RVS-leidingmateriaal de laagste biofilmvormingspotentie. Dit materiaal veroorzaakte geen groeibevordering van *Legionella*, *Pseudomonas aeruginosa* en bacteriën van de coligroep.
- Op de beide geteste koperen materialen werd een relatief sterke biofilmvorming waargenomen. Waarschijnlijk is dit het gevolg van de aanwezigheid van minerale olie op deze materialen. Groeibevordering door corrosie kan niet worden uitgesloten. Na een langdurige blootstelling (208 dagen) van de koperen materialen daalde de biomassaconcentratie op het materiaal tot een lage waarde (<100 pg ATP/cm<sup>2</sup>).
- Van de kunststoffen vertoonden de beide PVC-C materialen en BP(1) de laagste BVP-waarden. Alleen bij de beide PVC-C materialen was de biofilmconcentratie na circa 200 dagen afgenomen tot een niveau beneden 100 pg ATP/cm<sup>2</sup>.
- De materialen op PE-basis vertoonden de sterkste biofilmvorming en de sterkste bevordering van de groei van *Legionella*-bacteriën.
- De meeste biomassa bevond zich op de materialen, *Legionella*-bacteriën bevonden zich vaak voor het grootste deel in het water.
- De groei van *Legionella*-bacteriën vertoonde significante positieve correlaties met de biomassa-concentratie in het water, op het materiaal en met de totale biomassa-productie (BPP).
- Na een aanvankelijk groei (afhankelijk van de aard van het materiaal) vertoonden de kolonietallen van *Pseudomonas* en *Legionella* in het water na een testperiode van 56 dagen een duidelijke afname; op de materialen was deze afname minder sterk.
- Op koper en in water in aanwezigheid van koper werd geen *Pseudomonas aeruginosa* waargenomen.
- Groei van mycobacteriën werd in de testomstandigheden niet waargenomen.
- Bacteriën van de coligroep werden alleen in de eerste meting van de eerste meetserie aangetroffen.



## 4 BIOFILMVORMING OP DE MATERIALEN IN DE REFERENTIE-OPSTELLING

### 4.1 Opzet en uitvoering van het onderzoek

Nagegaan is in welke mate biofilmvorming optreedt op de geselecteerde materialen onder hydraulische omstandigheden die meer overeenkomen met de situatie in binneninstallaties. Voor dit doel is gebruik gemaakt van een zogenaamde referentie-opstelling. Aan de hand van de resultaten in de biofilmvormingspotentie testen is een zestal materialen geselecteerd die in de referentie-opstelling getest worden. De materialen zijn geselecteerd op basis van samenstelling, terwijl per materiaalsoort de materialen zijn getest met de hoogste BVP-waarde en de hoogste aantallen *Legionella*-bacteriën. De geselecteerde materialen zijn weergegeven in *tabel 9*.

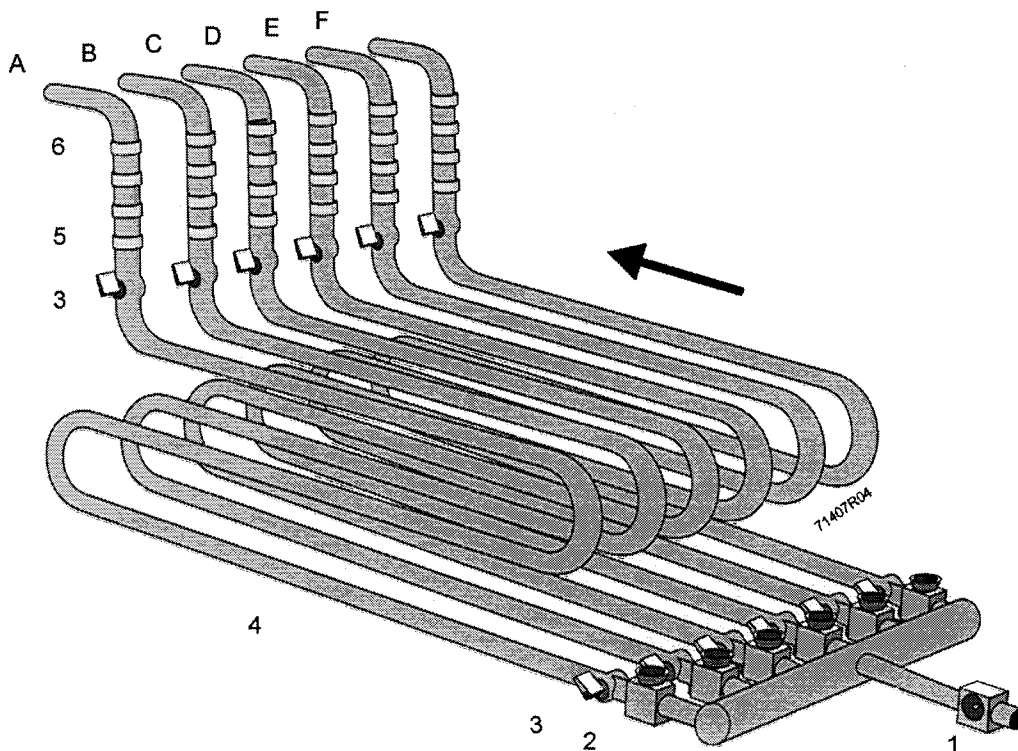
*Tabel 9. De geselecteerde leidingmaterialen voor de referentie-opstelling*

Materiaal	Omschrijving	diameter (mm)	
		buiten	binnen
RVS AISI 316	roestvast staal	18	16
Koper (1)	koper	15	13
PVC-C (2)	nagechloord polyvinylchloride	16	12
PE-Xa	polyethyleen, gecrosslinked	16	11,5
PP-R (1)	polypropyleen (random copyl-meer)	16	10,5
Al/PE-MD	polyethyleen, gecrosslinked, inwendig versterkt met aluminiumfolie	16	12

Een lengte van 5,7 meter van deze materialen is in de Referentie-opstelling geplaatst.

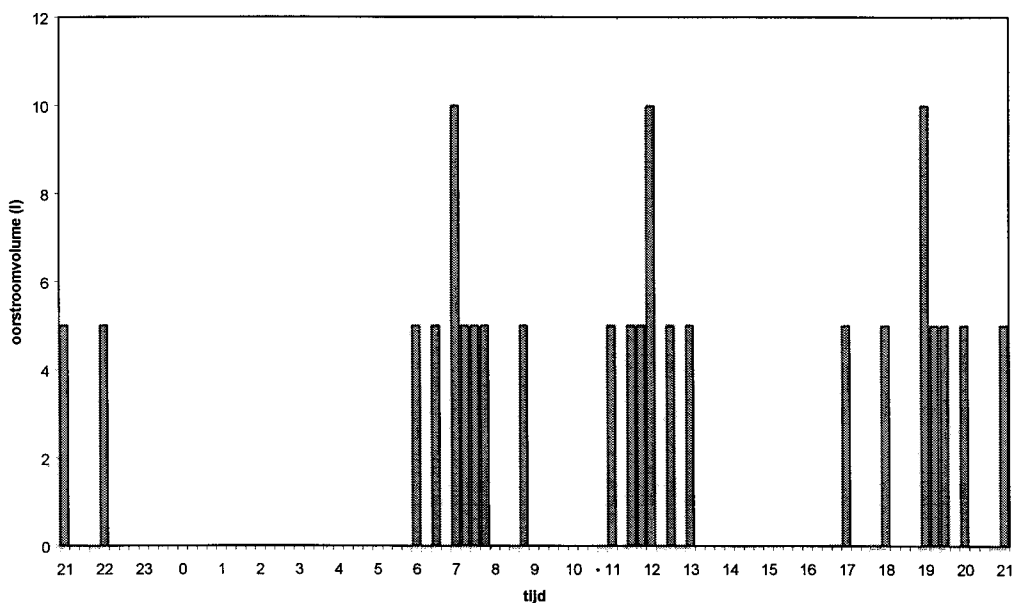
### 4.2 De referentie-opstelling

Het ontwerp van de referentie-opstelling is zodanig dat deze de laatste 5 meter van een huishoudelijke binneninstallatie simuleert. *Figuur 5* geeft een schematische weergave. Alle gebruikte koppelstukken in de installatie zijn van roestvast staal. De geteste materialen hebben alle een uitwendige diameter van 15, 16 of 18 mm. Het drinkwater is aangevoerd door een hard-PVC waterleiding omdat bekend is dat dit materiaal vrijwel niet bijdraagt aan de biofilmvorming. De referentie-opstelling is gebouwd en bedreven volgens de randvoorwaarden aangegeven in ontwerp-DIN 50 932, deel 1 "Korrosion der Metalle".



*Figuur 5. Schematisch overzicht van de referentie-opstelling  
A t/m F, testbuizen; 1, flowmeter; 2, doseerpunt; 3, afsluitkraan; 4, testbuis; 5, uitneembare stukjes testbuis; 6, afvoer c.q. monsterpunt.*

De buizen van de opstelling zijn doorstroomd volgens een typisch huishoudelijk patroon. *Figuur 6* geeft een overzicht van het tappatroon gedurende een dag. Er zijn stagnatietijden gehandhaafd variërend van 0,5 tot 8 uur, overeenkomstig met ontwerp-DIN 50 931. Per dag is door elke buis 130 l water gestroomd, het debiet bedroeg circa  $260 \pm 50$  l/uur. Per keer werd gedurende ca. 30 seconden getapt. De temperatuur van het water bedroeg  $18,6 \pm 0,7$  °C, de omgevingstemperatuur bedroeg  $21,2 \pm 0,8$  °C



*Figuur 6. Tappatroon in de referentie-opstelling (DIN 50 931)*

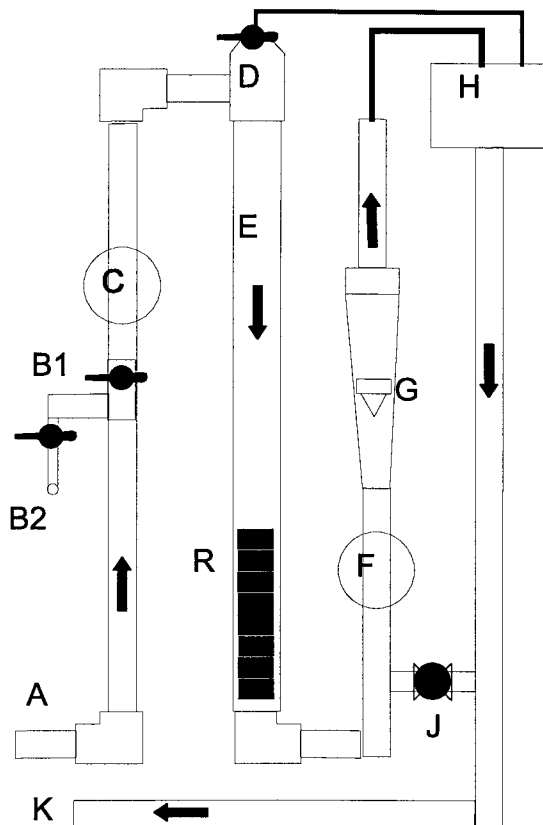
Om na te gaan of opportunistisch-pathogene bacteriën zich in de biofilm kunnen vermeerderen/handhaven onder de testcondities werd na 1 en na 6 weken doorstromen van de opstelling een mengsel van bacteriesuspensies gedoseerd. Hierbij is de concentratie zodanig gekozen dat na dosering per 100 ml buisinhoud 100 kolonievormende eenheden per soort bacteriën aanwezig waren. Dit aantal is gebaseerd op het aantal kolonievormende eenheden in de gedoseerde suspensie. De samenstelling van de gedoseerde suspensie is gelijk aan die zoals gebruikt bij de BVP-test en weergegeven in *tabel 2*.

### **4.3 Testwater**

De referentie-opstelling werd gevoed met drinkwater afkomstig van pompstation Tull en 't Waal van NV Waterleidingbedrijf Midden-Nederland. Dit drinkwater, dat wordt bereid uit anaeroob grondwater, kan als representatief worden beschouwd voor veel typen drinkwater in Nederland. De gegevens over de samenstelling van het drinkwater zijn weergegeven in bijlage 12 [VEWIN, 1994].

### **4.4 De biofilmmonitor**

Biofilmvorming op oppervlakken in contact met water wordt ook beïnvloed door de concentratie en de aard van afbreekbare stoffen in het water. De biofilmvormende eigenschappen van het water zijn bepaald met behulp van de biofilmmonitor (Van der Kooij et al, 1997). Een biofilmmonitor bestaat uit een verticaal opgestelde glazen kolom waarin zich op elkaar geplaatste glazen ringen bevinden. Deze glazen kolom wordt met het te onderzoeken drinkwater doorstroomd met een constante snelheid van 0,2 m/s. Deze snelheid komt overeen met de stroomsnelheid in het leidingnet. De vorming van biomassa op de ringen is onder deze condities gelijkmatig verdeeld over de kolomhoogte. De toename van de biofilm-concentratie in de monitor wordt bepaald door periodiek op twee uitgenomen glazen ringen de hoeveelheid adenosinetrifosfaat (ATP) te meten. De hoeveelheid ATP is een maat voor actieve biomassa en is snel en gevoelig te meten. De biofilmvormings-snelheid (BVS,  $\mu\text{g ATP/cm}^2 \cdot \text{dag}$ ) is gedefinieerd als de lineaire toename van het ATP-gehalte van de biofilm als functie van de tijd voor een periode tussen 0 en 100 dagen.

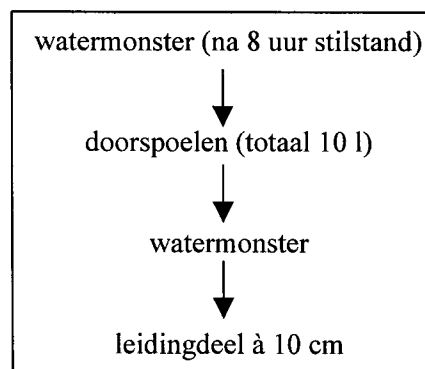


*Figuur 7. De biofilmmonitor, schematisch weergegeven*  
*A, aanvoerpunt water; B1, afsluiter; B2, monsterpunt water; C, drukregelaar;*  
*D, ontluchtingskraan; E, glazen kolom; F, watermeter; G, flowmeter; H, over-*  
*stort; J, afsluiter; K, afvoer; R, gestapelde glazen ringen.*

#### 4.5 Wijze van bemonsteren en onderzochte parameters

##### *De referentieopstelling*

Na 4, 8, 12, 16 en 20 weken doorstromen is de referentie-opstelling bemonsterd volgens onderstaand schema:



De watermonsters zijn vervolgens alle onderzocht op de volgende parameters:

- Adenosinetriphosfaat (ATP), volgens huisvoorschrift LMB-002
- koloniegetal op glucose gistextract agar bij 22 °C, volgens NEN 6560
- koloniegetal op glucose gistextract agar bij 37 °C, volgens NEN 6550
- *Pseudomonas*, volgens NEN 6573
- bacteriën van de coligroep, volgens NEN 6653
- *Legionella*, volgens NEN 6562
- Mycobacteriën, volgens de methode zoals beschreven door Engel en Berwald [1980]
- pH
- Opgelost organisch koolstof (DOC)
- koper (A.A.S.-vlam)
- ijzer (A.A.S.-vlam)

De oppervlakte van de stukjes uitgenomen leiding is onderzocht op de volgende parameters:

- Adenosinetriphosfaat (ATP), volgens huisvoorschrift LMB-002
- koloniegetal op glucose gistextract agar bij 22 °C, volgens NEN 6560
- koloniegetal op glucose gistextract agar bij 37 °C, volgens NEN 6550
- *Pseudomonas*, volgens NEN 6573
- bacteriën van de coligroep, volgens NEN 6653
- *Legionella*, volgens NEN 6562
- Mycobacteriën, volgens methode zoals beschreven is door Engel en Berwald [1980]
- koper (A.A.S.-vlam)
- ijzer (A.A.S.-vlam)

#### ***Monsters uit de referentieopstelling***

De biomassa is van de stukjes leiding losgemaakt met behulp van steriele wattenstokjes. Deze wattenstokje zijn vervolgens direct in steriel leidingwater geplaatst, waarna met herhaald ultrasone trillen (40KHz) de biomassa van het wattenstokje werd verwijderd. In de aldus verkregen suspensie zijn bovengenoemde parameters bepaald.

#### ***De biofilmmonitor***

Elke twee weken is de biofilmmonitor bemonsterd. Hiervoor werd eerst een watermonster genomen (aangevoerd water), gevolgd door monsternamen van twee glazen ringen uit de monitor. De glazen ringen zijn direct na het verwijderen uit de monitor in een buis met steriel leidingwater geplaatst.

## **4.6 Resultaten**

### **4.6.1 Metingen aan de referentieopstelling**

#### ***Biofilm op de binnenwand van de leidingen***

De gemiddelde waarden van de biofilmconcentratie gemeten op de binnenwand van de leidingen zijn opgenomen in *tabel 10*. De afzonderlijke meetwaarden zijn grafisch

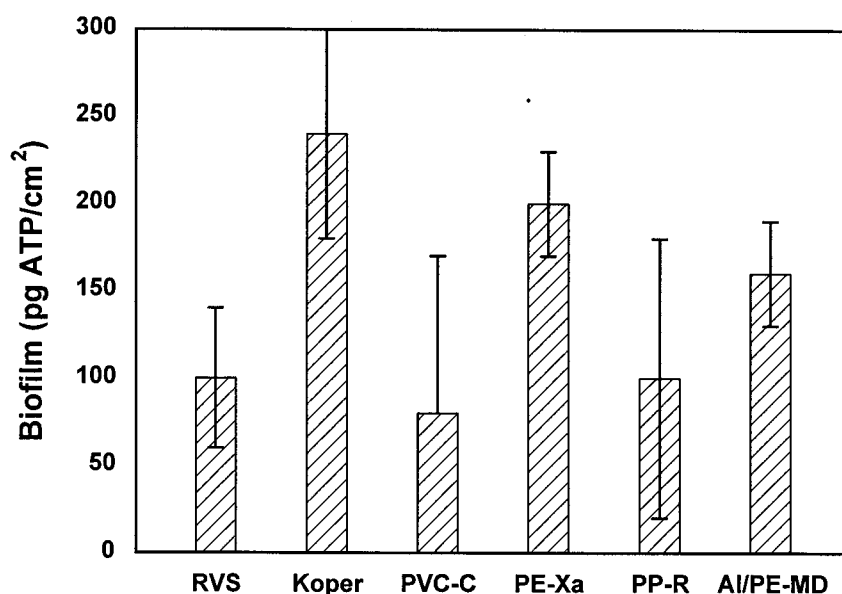


weergegeven in bijlage 7. De meetresultaten van de koloniegetallen zijn weergegeven in tabel 11. De biofilmconcentratie op de materialen is weergegeven in figuur 8.

Tabel 10. De biofilmconcentratie op de buiswand ( gemiddelde van de meetwaarden na 4, 8, 12, 16 en 20 weken doorstromen) en de gemiddelde biofilmvormingssnelheid.

materiaal	Gemiddelde Biofilm concen- tratie $\pm$ sd (pg ATP/cm <sup>2</sup> )	trend	Biofilmvormingssnelheid pg ATP/cm <sup>2</sup> .dag
RVS	100 $\pm$ 40	↑	1,47 $\pm$ 0,32
Koper (1)	240 $\pm$ 60	-	0,80 $\pm$ 1,05
PVC-C (2)	80 $\pm$ 90	↑	0,93 $\pm$ 0,35
PE-Xa	200 $\pm$ 30	-	1,61 $\pm$ 0,37
PP-R (1)	100 $\pm$ 80	↑	1,15 $\pm$ 0,31
Al/PE-MD	160 $\pm$ 30	-	0,86 $\pm$ 0,53

Op koper werd de hoogste biofilmconcentratie waargenomen; op PVC-C was de biofilmconcentratie het laagste. Ook de hoeveelheid biofilm die op de PE-Xa en Al/PE-MD-leidingen werd gevormd was duidelijk hoger dan de hoeveelheid biofilm die op PVC-C gevormd werd. RVS, PVC-C en PP-R lieten een stijgende trend zien gedurende de testperiode van 140 dagen. De gemiddelde BVS-waarden over de testperiode zijn alle geringer dan 2 pg ATP/cm<sup>2</sup>.d.. Deze relatief lage waarden zijn waarschijnlijk het gevolg van de afwisseling van perioden van stilstand met perioden van verversen (zie Discussie).



Figuur 8. Gemiddelde biofilmconcentraties (in pg ATP/cm<sup>2</sup> ± s.d.) op de materialen in de referentie-opstelling.

#### Koloniegetallen op de binnenwand van de leidingen

De gemiddelde waarden van de metingen op de binnenwand van de leidingen van het aantal kolonievormende eenheden op glucose gistextractagar bij 22 en 37 °C, zijn weergegeven in tabel 3. Op Al/PE-MD werden beduidend hogere koloniegetallen aangetroffen dan op de overige geteste materialen. Opvallend hierbij is dat het koloniegetal bepaald bij 37 °C gelijk is aan het koloniegetal bepaald bij 22 °C. Alle koloniegetallen vertoonden een dalende tendens gedurende de testperiode van 140 dagen. Op de leidingwand werden geen bacteriën van de coligroep, *Legionella*, *Pseudomonas aeruginosa* en mycobacteriën aangetroffen.

Tabel 11. Koloniegetallen van de biofilm op de buiswand, bepaald op glucose-gistextract agar bij 22 en 37 °C (gemiddelde van de meetwaarden na 4, 8, 12, 16 en 20 weken doorstromen).

Material	Koloniegetal 22 °C (kve/cm <sup>2</sup> ) ± sd	Trend	Koloniegetal 37 °C (kve/cm <sup>2</sup> ) ± sd	trend
RVS	170 ± 150	↓	24 ± 33	↓
Koper (1)	110 ± 150	↓	10 ± 17	↓
PVC-C (2)	430 ± 650	↓	120 ± 180	↓
PE-Xa	320 ± 580	↓	47 ± 49	↓
PP-R (1)	150 ± 180	↓	9 ± 8	↓
Al/PE-MD	2500 ± 3400	↓	2500 ± 3300	↓

### ***IJzer- en koperconcentratie op de binnenwand van de leidingen***

IJzer en mangaan kunnen zich ophopen in de biofilm. Loslaten van de biofilm kan leiden tot klachten over kleur en troebelheid. De waargenomen concentraties ijzer op de binnenwand van de leidingen zijn weergegeven in *tabel 12*. De ijzerconcentratie op de materialen was gering en tussen de geteste materialen kon geen verschil worden aangetoond voor deze parameter. Koper werd alleen in de biofilm in de koperen leiding aangetroffen.

*Tabel 12. IJzer- en koperconcentraties op de buiswand van de leidingen (gemiddelde van de meetwaarden na 4, 8, 12, 16 en 20 weken doorstromen).*

Materiaal	IJzer (mg/cm <sup>2</sup> )	trend	Koper (mg/cm <sup>2</sup> )	Trend
RVS	0,40 ± 0,26	-	<0,1	-
Koper (1)	0,95 ± 1,10	-	54 ± 24	-
PVC-C (2)	0,50 ± 0,52	-	<0,1	-
PE-Xa	0,54 ± 0,44	-	<0,1	-
PP-R (1)	0,36 ± 0,36	-	<0,1	-
Al/PE-MD	0,57 ± 0,28	-	<0,1	-

### ***Metingen van de waterkwaliteit in de leidingen***

Na 4, 8, 12, 16 en 20 weken doorstromen van de referentieopstelling zijn, gelijktijdig met het uitnemen van leidingsegmenten, metingen verricht van de waterkwaliteit in de buizen. De monsters zijn steeds genomen direct na een periode van stilstand (8 uur) en direct na een spoelperiode. De resultaten van de metingen (gemiddelde van de resultaten in week 4, 8, 12, 16 en 20, voor de koloniegetallen bij 22 en 37 °C de mediaanwaarde en de maximale waarde) zijn weergegeven in *tabel 13*. De ATP-metingen zijn grafisch weergegeven in bijlage 8. In het water zijn na stilstand (8 uur) en na doorspoelen van de leidingen geen bacteriën van de coligroep, *Legionella*, *Pseudomonas aeruginosa* en mycobacteriën aangetroffen, ondanks dosering van deze organismen na 4 en 12 weken.

*Tabel 13. Resultaten van de metingen van de waterkwaliteit in de referentieopstelling na stilstand (8 uur) van het water in de leidingen en na doorstromen. Weergegeven zijn de gemiddelde resultaten na 4, 8, 12, 16 en 20 weken doorstromen. Voor de koloniegetallen bij 22 en 37 °C zijn de mediaanwaarde en het maximum (max.) weergegeven.*

RVS	Parameter	Na stilstand	Na doorstromen
	ATP (ng/l)	4,0 ± 1,8	9,0 ± 5,9
	Koloniegetal 22 °C op glucose-gistextractagar (kve/ml)	10 (72)	48 (630)
	Koloniegetal 37 °C op glucose-gistextractagar (kve/ml)	1 (16)	4 (240)
	IJzer (mg/l)	<0,1	0,2 ± 0,2
	Koper (mg/l)	<0,1	<0,1
	NPOC (mg C/l)	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,2
	PH	7,9 ± 0,1	7,8 ± 0,0

Koper (1)	Parameter	Na stilstand	Na doorstromen
	ATP (ng /l)	12 ± 10	4,8 ± 1,7
	Koloniegetal 22 °C op glucose-gistextractagar (kve/ml)	7 (123)	12 (290)
	Koloniegetal 37 °C op glucose-gistextractagar (kve/ml)	< 1 (6)	3 (12)
	IJzer (mg/l)	<0,1	0,2 ± 0,2
	Koper (mg/l)	2,1 ± 0,8	0,2 ± 0,1
	NPOC (mg C/l)	1,6 ± 0,3	1,8 ± 0,2
	PH	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,0
PVC-C (2)	Parameter	Na stilstand	Na doorstromen
	ATP (ng /l)	4,0 ± 1,0	4,4 ± 0,6
	Koloniegetal 22 °C op glucose-gistextractagar (kve/ml)	30 (230)	32 (160)
	Koloniegetal 37 °C op glucose-gistextractagar (kve/ml)	1 (18)	2 (25)
	IJzer (mg/l)	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0
	Koper (mg/l)	<0,1	<0,1
	NPOC (mg C/l)	1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,2
	PH	7,9 ± 0,0	7,9 ± 0,1
PE-Xa	Parameter	Na stilstand	Na doorstromen
	ATP (ng /l)	4,3 ± 1,1	4,9 ± 1,0
	Koloniegetal 22 °C op glucose-gistextractagar (kve/ml)	24 (480)	37 (200)
	Koloniegetal 37 °C op glucose-gistextractagar (kve/ml)	1 (69)	3 (60)
	IJzer (mg/l)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1
	Koper (mg/l)	<0,1	<0,1
	NPOC (mg C/l)	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2
	PH	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
PP-R (1)	Parameter	Na stilstand	Na doorstromen
	ATP (ng /l)	4,3 ± 1,1	5,1 ± 1,2
	Koloniegetal 22 °C op glucose-gistextractagar (kve/ml)	39 (170)	44 (170)
	Koloniegetal 37 °C op glucose-gistextractagar (kve/ml)	2 (26)	2 (39)
	IJzer (mg/l)	0,3 ± 0,5	0,1 ± 0,1
	Koper (mg/l)	<0,1	<0,1
	NPOC (mg C/l)	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,2
	PH	7,9 ± 0,1	8,0 ± 0,1
Al/PE-MD	Parameter	Na stilstand	Na doorstromen
	ATP (ng /l)	6,7 ± 1,6	5,5 ± 1,0
	Koloniegetal 22 °C op glucose-gistextractagar (kve/ml)	50 (5000)	55 (260)
	Koloniegetal 37 °C op glucose-gistextractagar (kve/ml)	17 (5900)	11 (48)
	IJzer (mg/l)	0,4 ± 0,6	1,3 ± 2,0
	Koper (mg/l)	<0,1	<0,1
	NPOC (mg C/l)	1,8 ± 0,3	1,8 ± 0,1
	PH	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1

Uit de resultaten van de metingen, weergegeven in *tabel 13*, blijkt dat gedurende de periode van stilstand (8 uur) geen significante verhoging (of verlaging) optrad in de onderzochte parameters. In geen van de geteste buizen, uitgezonderd de koperen buis, kon in het water (voor en na stilstand) koper worden aangetoond. De maximale koloniegetallen werden vrijwel steeds gevonden na 4 weken doorstromen van de referentie-opstelling.

#### 4.6.2 Metingen aan de biofilmmonitor

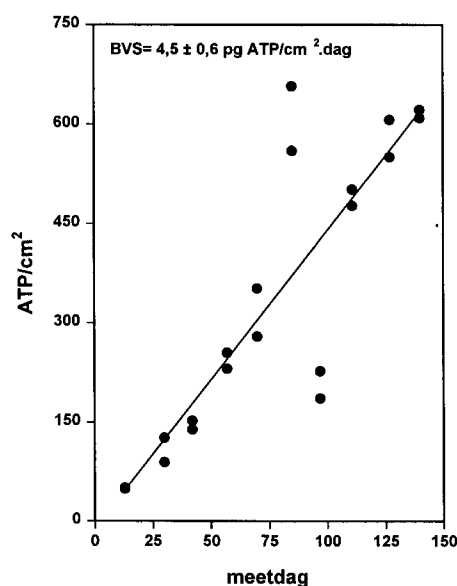
De biofilmvormende eigenschappen van het testwater, zoals gemeten met behulp van de biofilmmonitor zijn weergegeven in *tabel 14*. De snelheid van de biofilmvorming, ijzer- en mangaanafzetting op de glazen ringen in de biofilmmonitor is weergegeven in de *figuur 9*, bijlage 9 en bijlage 10.

*Tabel 14. BVS-waarde, ijzerafzettingssnelheid (FeAS) en mangaanafzettingssnelheid (MnAS) waargenomen in de biofilmmonitor.*

Parameter	Waarde
Biofilm (pg ATP/cm <sup>2</sup> .dag)	4,5 ± 0,6
FeAS (mg/cm <sup>2</sup> .dag)	0,07 ± 0,01
MnAS (µg/cm <sup>2</sup> .dag)	11 ± 3

Opmerkelijk is dat de biofilmconcentraties in de monitor na ongeveer 75 dagen hoger waren dan de biofilmconcentraties waargenomen in de referentieopstelling, zelfs met materialen waarvan met de BVP-test is aangetoond dat ze biofilmvormend zijn. De BVS-waarde waargenomen voor water is relatief laag in vergelijking met waarnemingen aan een aantal drinkwatertypen. Het ATP-gehalte van het water waarmee de monitor werd gevoed was eveneens laag (3,9 ± 0,7 ng/l). Dit niveau is gelijk aan de ATP-concentraties waargenomen in het water uit de referentie-opstelling (*tabel 13*).

*Figuur 9. Biofilmvorming in de monitor*



## 4.7 Samenvatting resultaten

De resultaten van het onderzoek met de referentie-opstelling kunnen als volgt worden samengevat:

- In de referentie-opstelling was de biofilmvorming het geringste op PVC-C (80 pg ATP/cm<sup>2</sup>); op koper werd de hoogste biofilmconcentratie waargenomen (240 pg ATP/cm<sup>2</sup>).
- Biofilmvorming op de materialen in de referentie-opstelling was geringer dan in de BVP-test (met uitzondering van RVS).
- Biofilmvorming op de materialen in de referentie-opstelling was geringer dan op glas in de biofilmmonitor. De biofilmvormingssnelheid gemeten met de biofilmmonitor bedroeg  $4,5 \pm 0,6$  pg ATP/cm<sup>2</sup>.dag. De gemiddelde biofilmvormingssnelheid op de materialen in de referentieopstelling bedroeg 0,8 à 1,5 pg ATP/cm<sup>2</sup>.dag.
- De koloniegetallen (22°C en 37°C) op de materialen waren in de regel laag. De hoogste koloniegetallen werden waargenomen op Al/PE-MD.
- Bij geen van de materialen werden de *Legionella*-bacteriën, *Pseudomonas* bacteriën, bacteriën van de coligroep of mycobacteriën waargenomen.
- De hoogste koloniegetallen in het water werden waargenomen na 28 dagen na stilstand (8 uur). Stilstand leidde in de regel niet tot een toename van het koloniegetal.
- De ijzerafzetting op de materialen was gering ( $< 1$  mg/cm<sup>2</sup>) en nagenoeg gelijk bij de verschillende materialen.



## 5 DISCUSSIE

### 5.1 Invloed van testcondities op biofilmvorming

Uit de resultaten van het onderzoek, beschreven in de hoofdstukken 3 en 4, komt naar voren dat de waarden van de biofilmvormingspotentie van de materialen gemeten in de (statische) BVP-test onderling duidelijk verschilden. De laagste waarde van de geteste materialen was 41 pg ATP/cm<sup>2</sup> (RVS); de hoogste waarde was 1400 pg ATP/cm<sup>2</sup> (PE-Xa). In de referentie-opstelling (dynamische test) waarmee minder materialen werden getest was de laagste waarde van de biofilmconcentratie 80 pg ATP/cm<sup>2</sup> (PVC-C) en de hoogste waarde 240 pg ATP/cm<sup>2</sup> (koper). Voor RVS en PE-Xa bedroeg de gemiddelde biofilmconcentratie in de referentieopstelling 100 respectievelijk 200 pg ATP/cm<sup>2</sup>. Deze waarden zijn beduidend lager dan de BVP-waarden (met uitzondering van RVS). De verschillen in groeibevorderende werking tussen de diverse materialen komen in de referentie-opstelling dus veel minder duidelijk naar voren dan in de BVP-test. Wanneer de vergelijking wordt gemaakt met de biomassa-productiepotentie (BBP), waarin ook de biomassa die onder invloed van het materiaal in het water is gevormd (in de BVP-test) wordt meegerekend, dan is het verschil in onderscheidend vermogen tussen de testen nog groter. Opmerkelijk is dat de biofilmconcentratie op de materialen in de referentie-opstelling zelfs geringer was dan de biofilmconcentratie op glas in de biofilmmonitor na 100 dagen. Een verklaring van deze verschillen vergt een nadere analyse van de biofilmvormingsprocessen in de beide testen en in de biofilmmonitor.

De hoeveelheid biomassa die wordt gevormd op het oppervlak van een materiaal in contact met water is afhankelijk van een aantal processen/factoren. Deze zijn in *tabel 15* genoemd, terwijl tevens is weergegeven of deze processen een rol spelen in de betreffende test.

*Tabel 15. Processen en factoren die van invloed zijn op de vorming van biomassa op het oppervlak van materialen onder diverse testomstandigheden.*

Proces	BVP-test	Referentie-opstelling	Biofilmmonitor
Afgifte van afbreekbare verbindingen door het materiaal	+	+	-
Aanvoer van afbreekbare verbindingen met het water	-	+	+
Afsterving (inclusief predatie door protozoa)	+	+	+
Afvoer van biomassa met het langsstromende water	-	+	+

*De snelheid van afgifte van afbreekbare verbindingen door het materiaal is waarschijnlijk vooral afhankelijk van de diffusie in het materiaal zelf en in principe gelijk voor de BVP-test en de referentie-opstelling. Voorwaarde hierbij is dat de afbreekbare verbindingen die beschikbaar komen aan het oppervlak van het materiaal direct wordt benut of afgevoerd. Het is echter ook mogelijk dat groei optreedt door aantasting van het materiaal. Onder de gehanteerde testcondities was de afgifte van afbreekbare verbindingen door de materialen in de referentie-opstelling waarschijnlijk geringer dan in de BVP-test om-*



dat de watertemperatuur in de referentie-opstelling duidelijk lager was ( $18,6 \pm 0,7$  °C) dan in de BVP-test, die bij  $25 \pm 1$  °C werd uitgevoerd.

*De aanvoer van gemakkelijk afbreekbare verbindingen met het water* is zeer gering in de BVP-test die wordt uitgevoerd in het biologisch stabiele filtraat van langzame zandfilters (laag AOC-gehalte en een lage biofilmvormingssnelheid). Mogelijk komen onder invloed van corrosie van metalen, waarbij organische stoffen door complexvorming worden gebonden, ook moeilijk afbreekbare organische verbindingen aanwezig in het water beschikbaar voor groei van micro-organismen op het materiaal. In de referentie-opstelling worden wel gemakkelijk afbreekbare verbindingen met het water aangevoerd. Deze aanvoer is echter zeer gering in vergelijking met de aanvoer in de biofilmmonitor. Een verbruik van 130 l/dag en een debiet van 260 l/uur komt neer op een doorstroming van 0,5 uur per 24 uur, dus slechts 2% van de tijd. De biofilmmonitor werd voortdurend doorstroomd. Een aanvoer van afbreekbare stoffen met het water die 2% bedraagt van de aanvoer in de biofilmmonitor levert na 100 dagen een bijdrage aan de biofilmdeichtheid van  $100 \times 4,5$  (BVS)  $\times 0,02 = 9$  pg ATP/cm<sup>2</sup>. Deze bijdrage is minder dan 10 % en dus verwaarloosbaar ten opzichte van de biofilmconcentraties waargenomen op de materialen in de referentie-opstelling.

*De mate van afsterving van biomassa (door endogene ademhaling en predatie door protozoa)* is afhankelijk van de concentratie van de biomassa en wordt tevens beïnvloed door de temperatuur. Bij een lage temperatuur is de afsterving geringer dan bij een hoge temperatuur.

*De afvoer van biomassa met het water* is zeer gering in de BVP-test. In deze test wordt bovendien de invloed van het materiaal bepaald door het meten van de concentratie van biomassa in het water. In de referentie-opstelling kan wel een sterke afvoer optreden, evenals in de biofilmmonitor. In de biofilmmonitor heerst een constante stroomsnelheid (0,2 m/s), waardoor zich een biofilm kan ontwikkelen van micro-organismen die zich relatief goed vasthechten. De afvoer van biomassa in de referentie-opstelling is waarschijnlijk relatief groot omdat de biofilm vrijwel geheel wordt gevormd tijdens stilstand van het water. In de leidingen van de referentie-opstelling heerst bij aftappen een stroomsnelheid tussen 0,35 m/s (RVS) en 0,85 m/s (PP-R). Bij deze snelheid is het stromingsbeeld van het water in de leidingen turbulent. Dit betekent dat gedurende de korte tijd dat de leidingen werden doorstroomd een relatief sterke erosie kan optreden van de biofilm die zich in de stilstandperiode heeft gevormd. Verschillen in stroomsnelheid in de diverse leidingen kunnen van invloed zijn geweest op de mate van biofilmvorming op het oppervlak van de diverse materialen in de referentie-opstelling.

Op grond van bovenstaande factoren kan worden verklaard waarom in de referentie-opstelling minder biofilmvorming werd waargenomen dan in de BVP-test en ook dat de mate van biofilmvorming zelfs geringer was dan in de biofilmmonitor. In de referentie-opstelling zijn overigens wel verschillen waarneembaar in biofilmconcentratie op de diverse materialen. De hoogste biofilmconcentraties werden waargenomen op de PE-materialen en op het koper en de laagste waarden op PVC-C, RVS en PP-R. Opmerkelijk is dat bij enkele materialen reeds na 28 dagen doorstromen een relatief hoge biofilmconcentratie werd waargenomen. Dit is het geval voor koper en de beide materialen op PE-basis. Tevens is duidelijk dat na een doorstroomperiode van 140 dagen voor de meeste materialen nog geen evenwichtssituatie was bereikt. Onduidelijk is of verdere toename van de biofilmconcentratie kan optreden op deze materialen. Opmerkelijk is dat op RVS meer biofilmvorming optrad dan verwacht mag worden op grond van de biofilmvormingssnelheid waargenomen in de biofilmmonitor en het lage percentage van de

tijd dat doorstroming van de referentie-opstelling optrad. Factoren die hierbij een rol zouden kunnen spelen zijn:

- aanwezigheid van een olielaagje op de binnenzijde van de stalen leiding (RVS werd bij 550 °C verhit vóór gebruik in de BVP-test);
- de mate van hechting van biomassa aan het leidingmateriaal (op staal mogelijk betere hechting dan op glas).

Het uitgevoerde onderzoek geeft echter geen uitsluitsel over de mogelijke rol van deze factoren.

Een ander opmerkelijk verschil tussen de resultaten in de BVP-test en die in de referentie-opstelling is dat in de referentie-opstelling geen groei van *Legionella*-bacteriën is waargenomen. De mogelijkheden voor groei van *Legionella*-bacteriën worden in de referentie-opstelling beperkt door de lagere temperatuur van het water (< 20°C) en de afvoer van biomassa als gevolg van het regelmatige aftappen van het water.

## 5.2 Keuze testmethode

Naast het bepalen van de mate van biofilmvorming op de diverse materialen onder de verschillende testcondities had het onderzoek tot doel om een aanzet te geven voor de beoordeling van leidingmaterialen op basis van de groeibevorderende eigenschappen. Een dergelijke beoordeling vereist een kritische beschouwing van de meetresultaten verkregen met de uitgevoerde testen. Een punt van discussie hierbij is de mate waarin de testomstandigheden representatief zijn voor situaties in de praktijk.

De omstandigheden in de praktijk (met name huishoudelijke drinkwaterinstallaties) zullen in veel gevallen meer overeenkomst vertonen met de condities in de referentie-opstelling dan met die in de BVP-test. Dat wil zeggen: meerdere malen per dag (in de referentie-opstelling 22 maal per etmaal) wordt het water in de leiding verversd. De waarnemingen duiden erop dat de geteste materialen onder omstandigheden die overeenkomen met de condities in de referentie-opstelling vrijwel geen invloed hebben op de microbiologische kwaliteit van het water. Vermeerdering van ongewenste micro-organismen werd niet waargenomen en ook de kolonietallen bepaald bij 22 en 37 °C bleven laag in het water voor en direct na doorstromen. Alleen in het water uit de leidingen van het materiaal Al/PE-MD lag de mediaanwaarde van het kolonietal bepaald bij 37 °C iets boven het in het Waterleidingbesluit (1984) genoemde richtniveau (10 kve/ml) voor deze parameter (tabel 13). Op grond van deze resultaten mag worden geconcludeerd dat toepassing van de geteste materialen in de praktijk onder omstandigheden die overeenkomen met de condities in de referentie-opstelling (frequente doorstroming, watertemperatuur < 20 °C) weinig invloed zal hebben op de microbiologische kwaliteit van het water.

De factoren die van invloed kunnen zijn op het optreden van groei van micro-organismen in drinkwaterinstallaties in de praktijk kunnen echter zeer sterk uiteenlopen. Dit betreft met name de verblijftijd (langdurige stagnatie), de watertemperatuur (o.a. seizoensinvloed, temperatuur binnenshuis) en de contacttijd bij doorstromen (lengte leiding). Ook onder ongunstige praktijkomstandigheden ('worst case' situaties) mogen geen problemen optreden die een gevolg zijn van groeibevordering door leidingmaterialen. Daarbij komt dat de microbiologische kwaliteit van het water in drinkwaterinstallaties (vrijwel) niet wordt gecontroleerd en de bescherming van de microbiologische kwaliteit geheel berust op preventie. Tegen deze achtergrond wordt aanbevolen om het gedrag in de BVP-test, waarin een extreem lange verblijftijd wordt gecombineerd met een relatief hoge water-

temperatuur, als basis te gebruiken voor de beoordeling van de materialen voor toepassing in drinkwaterinstallaties. De vraag hierbij is welke beoordelingscriteria moeten worden gehanteerd.

## 5.3 Parameters en beoordelingscriteria

### 5.3.1 Parameters en beoordelingsbasis

De beoordeling van de materialen op basis van groeibevordering in de BVP-test hangt af van de keuze van de parameters (BVP, BMC, BPP, groei van *Legionella*, groei van andere bacterietypen) en de criteria waaraan de meetresultaten kunnen worden getoetst. Uit de tabellen 3, 4, 5 en 6 komt naar voren dat alleen de resultaten die in het onderzoek zijn verkregen over de parameters voor biomassa en het aantal *Legionella*-bacteriën op het materiaal en in het water in aanmerking komen voor een beoordeling. Een dergelijke beoordeling kan vervolgens plaatsvinden op grond van:

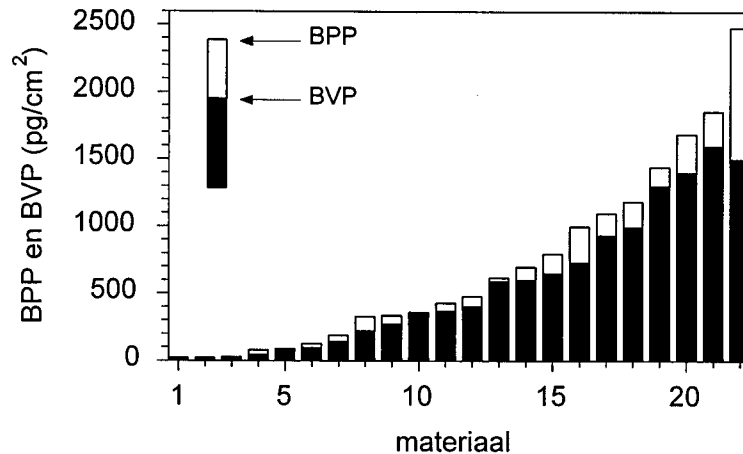
1. Een wetenschappelijk gefundeerde benadering waarbij aspecten zoals gezondheidsrisico (infectierisico) en esthetische of technische bezwaren verbonden aan groeibevordering worden betrokken;
2. Een vergelijking met de praktijkgegevens waarbij de mate van biofilmvorming in de BVP-test wordt vergeleken met waarnemingen over biofilmvorming in drinkwaterinstallaties en in het distributiesysteem.

Deze beoordelingsmogelijkheden zijn hieronder nader uitgewerkt.

#### *Beoordeling op basis van biofilmvorming*

##### *Esthetische en technische bezwaren*

Esthetische bezwaren die een gevolg zijn van een te sterke vermeerdering van micro-organismen zijn met name de vorming van smaakstoffen door schimmels en actinomyceten of het ontstaan van zuurstofloosheid, en de aanwezigheid van dierlijke organismen of deeltjes biomassa in het water. Een voorbeeld is de groei van actinomyceten op rubberen membranen in drukvaten, waardoor smaakproblemen ontstaan. In Engeland berust het criterium voor de beoordeling van de groeibevordering van materialen in contact met drinkwater op het waarnemen van zichtbare groei op de materialen. Een dergelijke zichtbare groei treedt op als het extra zuurstofverbruik van het betreffende materiaal in de Mean Dissolved Oxygen Difference (MDOD) test hoger is dan 2,3 mg/l (Colbourne, 1985). Door het ontbreken van gegevens over de relatie tussen de MDOD-waarde en de BVP-waarde kan genoemd criterium (nog) niet worden vertaald naar een BVP-waarde. Een ander esthetisch aspect is het vastleggen van ijzer en mangaan in de biofilm, waardoor periodiek klachten over de kleur van het water zouden kunnen ontstaan. Ook hierover ontbreken kwantitatieve gegevens. Een technische probleem verbonden aan biofilmvorming is de toename van de weerstand in de leiding. Een dergelijk probleem treedt waarschijnlijk pas op bij een extreme mate van biofilmvorming. Al met al is er onvoldoende informatie voorhanden om gebaseerd op esthetische en technische aspecten een kwantitatief criterium voor biofilmvorming te definiëren, waarmee de materialen kunnen worden beoordeeld.



Figuur 10. De geteste materialen, inclusief de controle-materialen gerangschikt op mate van biofilmvorming in de BVP-test. 1, 2 en 3, glas; 4, 5 en 6, RVS; 7, PVC-C(1); 8, PB(1); 9, PVC-C(2); 10, koper(2); 11, PP-R(1); 12, PE-Xc(2); 13, koper(1); 14, PP-R(2); 15, PB(2); 16, Al/PE-MD; 17, PE-Xc(2); 18, siliconen; 19 en 20, PE-Xa; 21 en 22, siliconen.

#### Vergelijking met praktijksituaties

Gegevens over de biofilmdichtheid in drinkwaterinstallaties in Nederland zijn niet voorhanden. Een vergelijking van de in de BVP-test waargenomen biofilmvorming met biofilmconcentraties in drinkwaterinstallaties is daarom niet mogelijk. In het kader van onderzoek naar nagroeiprocessen in distributiesystemen is wel informatie verzameld over de biofilmvormende eigenschappen van het drinkwater en de biofilmconcentratie in distributiesystemen. Uit onderzoek uitgevoerd met de biofilmmonitor is naar voren gekomen dat de biofilmvormingssnelheid (BVS) van de verschillende drinkwatertypen in Nederland ligt tussen waarden  $< 1$  pg ATP/cm<sup>2</sup>.dag (filtraat langzame zandfilters, drinkwater bereid uit zuurstofhoudend grondwater) tot waarden groter dan 50 pg ATP/cm<sup>2</sup>.dag (drinkwater bereid uit zuurstofloos grondwater). Tevens is gebleken dat mate van nagroei van *Aeromonas*-bacteriën in het leidingnet verband houdt met de biofilmvormingssnelheid van het drinkwater bij het verlaten van het pompstation (van der Kooij et al. 1997). Uit een onderzoek naar de biofilmconcentraties op de leidingwand (PVC), uitgevoerd in 22 distributiesystemen is naar voren gekomen dat de waarden van de biofilmconcentraties varieerden van 40 pg ATP/cm<sup>2</sup> (min.) tot 5800 pg ATP/cm<sup>2</sup> (max), met een mediaan-waarde van 670 pg ATP/cm<sup>2</sup> (van der Kooij et al. 1999). Niveaus boven 1000 pg ATP/cm<sup>2</sup> werden waargenomen in leidingnetten met nagroei van *Aeromonas*. De genoemde biofilmconcentraties zijn het gevolg van de opname van afbreekbare verbindingen uit het passerende drinkwater, want gebleken is dat de biofilmvormingspotentie van PVC-leidingmaterialen geringer is dan 100 pg ATP/cm<sup>2</sup>.

De gegevens over de biofilmconcentratie op de leidingwand kunnen worden gebruikt voor het beoordelen van de BVP- en BPP-waarde van leidingmaterialen. Hierbij zou als uitgangspunt kunnen worden gehanteerd dat een materiaal slechts in geringe mate mag bijdragen aan de biofilmvorming. In situaties waarbij het drinkwater zeer weinig biofilmvorming op de leidingwand veroorzaakt heeft toepassen van materialen die zo min mogelijk extra biofilmvorming veroorzaken de voorkeur.

### 5.3.2

### Indeling in kwaliteitsklassen

Op basis van de hierboven genoemde overwegingen kan voor materialen in contact met drinkwater een indeling in kwaliteitsklassen worden gemaakt. Met behulp van de BVP-test kan vervolgens worden vastgesteld in welke klasse bepaalde materialen vallen. Een mogelijkheid voor een dergelijke indeling op basis van BVP-waarden is weergegeven in *tabel 16*. Onduidelijk is nog of bij een dergelijke indeling moet worden uitgegaan van de BVP-waarde of van de BPP-waarde. Voor de meeste materialen is het verschil tussen deze parameters gering, echter in aanwezigheid van sommige materialen werd relatief veel vorming van biomassa in het water waargenomen (*figuur 10*).

*Tabel 16. Kwaliteitsklassen voor materialen in contact met drinkwater, gebaseerd op biofilmvormingspotentie (BVP).*

Klasse	BVP (pg ATP/cm <sup>2</sup> )	Materiaal
A	≤ 100	Glas, RVS, PVC*, teflon*
B	100 < BVP ≤ 500	PVC-C (1), PVC-C (2), PB (1), Koper (2), PP-R (1), PE-Xc (1)
C	500 < BVP ≤ 1000	Koper (1), PP-R (2), PE-Xc (2), Al/PE-MD, siliconen (2)
D	1000 < BVP ≤ 3000	PE-Xa, siliconen (1), siliconen (3)
E	BVP > 3000	Rubber typen*, zacht PVC*

\*, resultaat eerder uitgevoerd onderzoek.

Voorbeelden van materialen behorende tot de hoogste kwaliteitsklasse (BVP- of BPP-waarde < 100 pg ATP/cm<sup>2</sup>) zijn: glas (echter niet bruikbaar voor drinkwaterleidingen, tevens lichtdoorlatend); RVS, hard PVC en teflon. Voorbeelden van relatief sterk groei-bevorderende materialen (BVP- of BPP-waarde > 3000 pg ATP/cm<sup>2</sup>) zijn: natuurrubber en zacht PVC. Dergelijke materialen worden niet toegepast in contact met drinkwater, met uitzondering van situaties waarbij zeer kleine oppervlakken aan het water worden blootgesteld (bijvoorbeeld rubberen ringen in buiskoppelingen).

Uit de rangschikking van de materialen op basis van de BPP-waarden (*figuur 10*) blijkt dat een aantal materialen in de BVP-test gelijk aan of beter scoorden dan koper. Reeds eerder is opgemerkt dat de koperen leidingen een relatief sterke biofilmvorming te zien gaven in de BVP-test en ook in de referentie-opstelling. Opvallend is dat in de BVP-test de biofilmconcentratie op de koperen materialen lineair toenam als functie van de tijd. Hieruit werden biofilmvormingssnelheden berekend van circa 4 (koper(2)) en 20 (koper(1)) pg ATP/cm<sup>2</sup>.d. Deze biofilmvorming is waarschijnlijk een gevolg van de aanwezigheid van minerale olie op de koperen leiding, want de sterkste biofilmvorming is waargenomen op het koper waarop de meeste minerale olie aanwezig was. Speelt echter ook corrosie een rol dan mag worden verwacht dat ook de watersamenstelling (pH, anorganische en organische koolstof) van invloed zal zijn op de groeibevordering door koper. Hierover is geen nadere informatie beschikbaar.

Deze waarnemingen geven aan dat koper met betrekking tot biologische stabiliteit minder goed scoort dan werd verwacht op grond van de aanname dat koper geen groeibevorderende verbindingen afgeeft en bovendien groeiremmend zou zijn. Deze groeiremming geldt echter niet voor alle micro-organismen. *Pseudomonas* soorten, en ook *Aeromonas* soorten zijn relatief gevoelig zijn voor koper, maar lage concentraties koper wei-

nig effect hebben op *Legionella*-bacteriën en *Mycobacterium* soorten. Dit blijkt ook uit de resultaten van dit onderzoek.

Samenvattend kan worden geconcludeerd dat op basis van biofilmvorming/biomassa-productie een duidelijk onderscheid tussen materialen kan worden gemaakt, waardoor indeling in kwaliteitsklassen mogelijk is. Het is echter nog niet mogelijk om aan te geven welke voor toepassingsgebieden de materialen van de diverse kwaliteitsklassen in aanmerking komen. Bij het definiëren van de toepassingsgebieden spelen factoren zoals lengte van de leiding, diameter (oppervlakte/volume-verhouding) en watertemperatuur een belangrijke rol.

### 5.3.3 Beoordeling op basis van gezondheidsrisico verbonden aan groeibevordering van ziekteverwekkende bacteriën

Potentieel ziekteverwekkende micro-organismen, die zich kunnen vermeerderen in (drink)waterinstallaties, zijn met name: *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp. en *Pseudomonas* spp. Het is aannemelijk dat groei van dergelijke micro-organismen sterker zal zijn wanneer meer voedingsstoffen aanwezig zijn. Daarnaast zijn ook temperatuur en mate van uitspoeling van belang. Onder de testcondities is (vrijwel) geen vermeerdering van *Pseudomonas* en *Mycobacterium* waargenomen. Groei van *Legionella* bacteriën is wel waargenomen en daarom wordt hieronder nader ingegaan op de mogelijkheid om materialen te beoordelen op basis van (de risico's verbonden aan) de bevordering van de groei van *Legionella*-bacteriën.

#### *Groei van Legionella in het testsysteem*

In aanwezigheid van groeibevorderende materialen kan de groei van *Legionella*-bacteriën worden versterkt waardoor een gezondheidsrisico ontstaat. *Legionella*-bacteriën komen wijd verbreid voor in water en vermeerderen zich met name in biofilms bij voldoende hoge temperatuur. Uit de resultaten verkregen met de BVP-test blijkt dat een aantal materialen relatief sterk de groei van *Legionella*-bacteriën bevorderde. Vermeerdering van *Legionella*-bacteriën was in de regel sterker naarmate de groeibevordering van het materiaal sterker was (figuur 4). Het duidelijkste verband tussen de mate van groeibevordering en de groei van *Legionella*-bacteriën blijkt uit de relatie tussen de BPP-waarden en de groei van *Legionella*-bacteriën op de materialen en in het water (figuur 4). De spreiding is echter relatief groot en de mate van groeibevordering van *Legionella* -bacteriën kan voor een bepaald materiaal niet zonder meer worden afgeleid van de BVP- of de BPP-waarde. Een mogelijke oorzaak van deze grote spreiding kan de in de BVP-test gehanteerde watertemperatuur (25 °C) zijn. Deze temperatuur is beduidend lager dan de optimum temperatuur (35 à 37 °C) voor de groei van *Legionella*-bacteriën, waardoor concurrentie met andere bacteriën wordt bemoeilijkt. De potentie tot bevordering van de groei van deze bacteriën komt waarschijnlijk duidelijker tot uiting bij temperaturen die dichter liggen bij de optimale groei temperatuur van dit organisme, namelijk 30-37 °C.

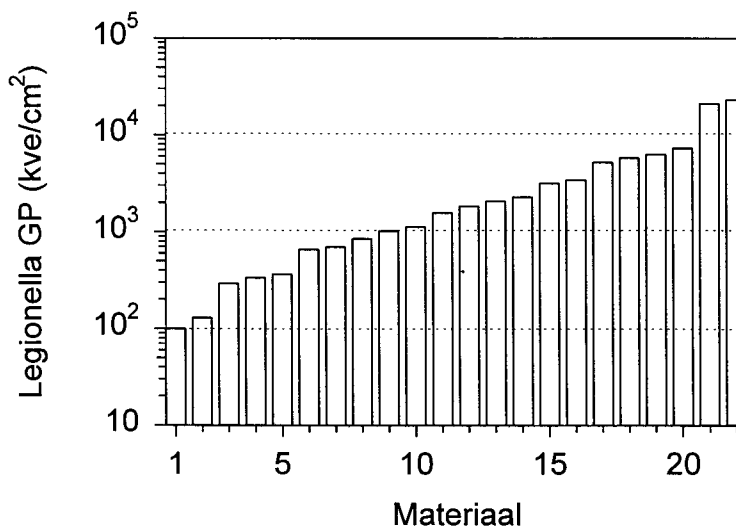
#### *Gezondheidsrisico*

Kan nu op basis van de groeibevordering van *Legionella*-bacteriën in de BVP-test een beoordelingscriterium worden afgeleid gebaseerd op een gezondheidsrisico? In warmtapwatersystemen in Nederland zijn *Legionella*- bacteriën waargenomen in aantallen die liggen tussen  $5 \times 10^3$  kve/l tot  $2 \times 10^5$  kve/l (Van der Kooij en Hoekstra, 1984). Meenhorst (1984) vond aantallen tot enkele honderden kve/ml, en gevallen van legionellose werden waargenomen bij concentraties  $> 40$  kve/ml. In Duitsland is een concentratie van 10 kve/ml voorgesteld als niveau waarboven corrigerende maatregelen genomen dienen te worden. Bij aanwezigheid van *L. pneumophila* serogroep 1 zouden ook bij lagere ni-

veaus maatregelen nodig zijn (Exner et al. 1993). Een normwaarde voor het maximale aantal *Legionella*-bacteriën, gerelateerd aan een besmettingsrisico (van bijvoorbeeld  $10^4$  per persoon per jaar) ontbreekt echter. Complicerende factoren voor het vaststellen van een dergelijk niveau (in water) zijn:

- besmetting treedt op via aerosolen die met dit water worden gevormd;
- de vele soorten en serotypen van *Legionella*-bacteriën, die onderling sterk verschillen in mate van virulentie;
- het ontbreken van gegevens over het gezondheidsrisico bij blootstelling aan *Legionella*-bacteriën ('infectieuze dosis').

De concentraties van *Legionella*-bacteriën in het water van de BVP-test lagen tussen 10 en 1500 kve/ml en waren dus hoger dan de aantallen in water in warmtapwatersystemen waarbij legionellose is waargenomen cq. waarbij corrigerende maatregelen zijn voorgesteld. De omstandigheden in de BVP-test zijn echter relatief gunstig voor de groei van *Legionella*'s, ondanks het feit dat de watertemperatuur niet optimaal is voor de groei van *Legionella*-bacteriën. Voor het 'vertalen' van de resultaten in de BVP-test zijn gegevens nodig over de relatie tussen het aantal *Legionella*-bacteriën in de biofilm en in het water bij een bepaalde frequentie van verversen (in de praktijk en in de test). Vervolgens is een kwantitatief criterium voor het aantal *Legionella*-bacteriën in water nodig voor het beoordelen van het resultaat in de test. Met de huidige gegevens kan een beoordelingscriterium voor materialen op basis van groeibevordering van *Legionella*-bacteriën in de BVP-test dus nog niet worden afgeleid.



*Figuur 11. Legionellagroepotentie van de materialen.*

1,2,3= glas; 4=PVC (1); 5= RVS; 6= PE-Xa; 7=siliconen (1); 8= RVScontrolle (1); 9= koper (2); 10=RVScontrolle (2); 11= PE-Xc (1); 12=siliconen (2); 13= koper (1); 14= PP-R (1); 15= PB (2); 16= PVC-C (2); 17= PE-Xc (2); 18= PB (1); 19= PP-R (2); 20= siliconen (3); 21= Al/PE-MD; 22= PE-Xa (herhaling).

#### 5.3.4 Beoordeling van leidingmaterialen voor binneninstallaties

Uit bovenstaande beschouwingen komt naar voren dat een objectief beoordelingscriterium voor materialen in binneninstallaties op basis van groeibevordering nog niet kan worden afgeleid. Aangegeven is welke mogelijkheden er zijn om te komen tot een beoordelingssysteem. Het definiëren van kwaliteitsklassen, gebaseerd op groeibevordering, waarbij per klasse het toepassingsgebied is aangegeven, biedt mogelijkheden om te komen tot een duidelijk toelatingsbeleid. Nagegaan dient te worden of kan worden volstaan met een beoordeling op basis van biofilmvorming cq. biomassaproductie, of dat de mate van vermeerdering van pathogene micro-organismen, met name *Legionella*, bij de indeling in kwaliteitsklassen (en bij de uitvoering van de test) dient te worden opgenomen. Bij de beoordeling van de invloed van materialen op de kwaliteit van drinkwater speelt de VROM-Kiwa Commissie Gezondheidsaspecten van Chemicaliën en Materialen in contact met Drinkwater (CGCMD) een centrale rol. Mede gezien de potentiële gezondheidsrisico's verbonden aan de bacteriegroeibevorderende werking van materialen in contact met drinkwater, ligt het voor de hand om deze commissie bij de verdere uitwerking van de hierboven benadering te betrekken.





## 6 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

### 6.1 Conclusies

1. Een dertiental leidingmaterialen, waaronder koper en roestvast staal, die worden gebruikt in drinkwaterinstallaties, is getest op bevordering van bacteriegroei. Bij dit onderzoek is gebruik gemaakt van twee verschillende testsystemen, namelijk de statische biofilmvormingspotentie (BVP)-test en de referentie-opstelling (doorstroomstelsel).
2. In de BVP-test bleek dat de materialen onderling duidelijk verschilden voor wat betreft de bevordering van de groei van micro-organismen. De minste groeibevordering werd waargenomen met roestvast staal; bij enkele materialen op PE-basis werd een circa 30 x sterkere groeibevordering waargenomen..
3. De biofilmvorming op de leidingmaterialen was in de referentie-opstelling geringer dan in de BVP-test (met uitzondering van RVS). De verklaring hiervoor is dat de biomassa die werd gevormd in de referentie-opstelling werd afgevoerd met het water, terwijl in de BVP-test dit niet het geval was. Op geen van de materialen in de referentie-opstelling is groei waargenomen van *Legionella*-bacteriën, *Pseudomonas*-bacteriën, mycobacteriën of bacteriën van de coligroep. Op grond van deze waarnemingen kan worden geconcludeerd dat onder normale omstandigheden de geteste materialen weinig invloed hebben op de microbiologische kwaliteit van het water.
4. Op koper trad een (in vergelijking met de geteste kunststoffen en RVS) relatief sterke biofilmvorming op, zowel in de BVP-test als in de referentie-opstelling. Waarschijnlijk hangt deze biofilmvorming samen met de aanwezigheid van minerale olie op het koper. Mogelijk spelen (ook) corrosie-processen waarbij organische verbindingen uit het water beschikbaar komen voor micro-organismen een rol.
5. Tussen de mate van groeibevordering gemeten als biofilmvorming, resp. biomassa-productie en de groeibevordering van *Legionella*-bacteriën werd in de BVP-test een significant verband waargenomen. De mate van groeibevordering van *Legionella*-bacteriën kan echter niet zonder meer van de mate van biofilmvorming of biomassa-productie worden afgeleid.
6. Beoordeling van de materialen op basis van biofilmvorming resp. biomassa-productie gerelateerd aan hygiënische, esthetische of technische is nog niet mogelijk. Ook het ontbreken van informatie over biofilmconcentraties in drinkwaterinstallaties bemoeilijkt de evaluatie van de resultaten van de BVP-test.
7. Beoordeling van de materialen op basis van groeibevordering (in de BVP-test) van *Legionella*-bacteriën is niet mogelijk door het ontbreken van informatie over de relatie tussen aantallen *Legionella*-bacteriën in het water en in de biofilm onder verschillende hydraulische condities, en het ontbreken van een criterium voor het aantal *Legionella*-bacteriën in water.

### 6.2 Aanbevelingen

1. Aanbevolen wordt om de beoordeling van materialen op groeibevordering te baseren op het gedrag in de BVP-test. Vooralsnog is het van belang om in deze test naast de biofilmvorming/biomassaproductie ook de groei van *Legionella*-bacteriën te bepalen. Uitvoering van de BVP-test bij 30 °C geeft waarschijnlijk een beter kwantitatief beeld van de mate waarin de groei van *Legionella* kan worden bevorderd dan uitvoering van de test bij 25°C.

2. Aanbevolen wordt om voor de beoordeling van materialen op groeibevordering, zoals bepaald in de BVP-test, een systeem van kwaliteitsklassen op te stellen. Het vereiste kwaliteitsniveau hangt onder meer af van de omstandigheden waaronder het materiaal wordt toegepast (lengte leiding, oppervlakte/volume-verhouding, temperatuur etc.).
3. Om de voor de diverse toepassingen vereiste kwaliteitsniveaus vast te stellen wordt aanbevolen om nader onderzoek uit te voeren. Dergelijk onderzoek omvat:
  - het verzamelen en beoordelen van gegevens over biofilmconcentratie, biofilmsamenstelling (o.a. aanwezigheid van *Legionella*) en concentraties van micro-organismen in het water in drinkwaterinstallaties in relatie tot de in deze systemen heersende condities;
  - het bepalen van het effect van verversen van het water in de BVP-test op de biofilmvorming resp. biomassa-productie en de verdeling van biomassa en micro-organismen (*Legionella*) over biofilm en water;
  - het verzamelen van gegevens voor het definiëren van een kwantitatief criterium voor *Legionella*-bacteriën in water in drinkwaterinstallaties.

## LITERATUUR

### BRITISH STANDARD

Suitability of non-metallic products for use in contact with water intended for human consumption with regard to their effect on the quality of water. Section 2.4 Growth of aquatic microorganisms.  
British Standards Institution BS 6920 2.4 (1988)

### BURMAN, N.P. AND COLBORNE, J.S.

Effect of non-metallic materials on water quality.  
J. Inst. Wat. Eng. Sci. 33: 11-18 (1979)

### COLBOURNE, J.S AND PRATT, D.J.

Water fittings as sources of *Legionella pneumophila* in a hospital plumbing system. The Lancet; 28:210-213 (1984)

### COLBOURNE, J.S.

Materials usage and their effects on the microbiological quality of water supplies. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 47S-59S (1985)

### COMMISSIE INTEGRAAL WATERBEHEER. WERKGROEP IV

Handreiking Regionale aanpak diffuse bronnen. CUWVO, (februari 1997).

### CUWVO

Landelijk watersysteemrapportage 1992. Rapport RIZA-Lelystad (1993)

### DIN 50 931 TEIL 1

Korrosion der Metalle. Korrosionsversuche mit Trinkwässern. Teil1: Veränderung der Trinkwasserbeschaffenheit. Deutsche Norm (1996)

### DVGW

Vermehrung von Microorganismen auf Materialien für den Trinkwasserbereich. Prüfung und Bewertung. Technische Regeln. Arbeitsblatt W270. DVGW (1990)

### ENGEL, H.W.B. EN BERWALD, L.G.

Verder onderzoek naar het voorkomen van *Mycobacterium kansasii* in leidingwater. Rijksinstituut voor de Volksgezondheid, rapport nr 76/80 Bact, Bilthoven (1980)

### EXNER, M., G.J. TUSCHEWITZKI, B. LANGER F. WERNICKE UND ST. PLEISCHL

Vorkommen und Bewertung von Legionellen in Krankenhäusern und anderen Grossgebäuden. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden und Lufthygiene 91:105-130 (1993)

### GOOD, R.C.

Opportunistic Pathogens in the Genus *Mycobacterium*. Ann. Rev. Microbiol. 39, p. 347-369 (1985)

### GROOTHUIS, D.G., BERWALD, L.G., AND BAAS, J.G.

Groei van *Mycobacterium kansasii* in verschillende typen leidingwater; invloed van bebroedingstemperatuur en toevoeging van lood, koper, polyvinylchloride (PVC) en tylene. RIV-Rapport. 1983; rapportnummer 128009001

### GROOTHUIS, D.G., BERWALD, L.G., HAVELAAR, A.H., AND BAAS, J.G.

Voorkomen van mycobacteriën in een zwembad met beweegbare bodem. RIV-Rapport. 1983; rapportnummer 128106001

### HABICHT, WILYA, AND MULLER, HANS. E.

Occurrence and Parameters of Frequency of *Legionella* in Warm Water Systems of Hospitals and Hotels in Lower Saxony. Zentralblatt Bakt. Hyg. B. 1988; 186:79-88

### HUISVOORSCHRIFT LMB-002

Bepaling van het adenosinetrifosfaat-gehalte in water en suspensies. versie 5 (1997)

JANSEN, P.F.C.

Duurzaam bouwen: Nationaal pakket woningbouw.  
Rotterdam Stichting Bouwresearch SBR-publicatie 359-H-96  
ISBN 90-5367-175-7. Losbladig

KIWA

Lijst met goedgekeurde systemen. Leidingsystemen van kunststof bestemd voor: drinkwaterinstallaties binnenshuis; verwarmingsinstallaties: radiatoraansluitingen; vloerverwarmingsinstallaties. Actueel tot 01-10-1998 (1998)

KOOIJ, D. VAN DER, AND HOEKSTRA, A.C.

*Legionella pneumophila* in warmtapwaterinstallaties.  
Ziekenhuishygiëne en Infectiepreventie 84-5 p. 103-106 (1984)

KOOIJ, D. VAN DER, AND VEENENDAAL, H.R.

Biofilm development on surfaces in drinking water distribution systems. Proceedings 19th International Water Supply Congress. 1993 Oct 2-1993 Oct 8; SS 1:1.1-1.7

KOOIJ, D. VAN DER, AND VEENENDAAL, H.R.

Assessment of the biofilm formation potential of synthetic materials in contact with drinking water during distribution.

Proceedings Water Quality Technology Conference, p. 1395-1407 (1993)

KOOIJ, D. VAN DER, VROUWENVELDER, J. S., AND VEENENDAAL, H. R.

Bepaling en betekenis van de biofilmvormende eigenschappen van drinkwater H<sub>2</sub>O, 25, p 767-771 (1997).

MEENHORST, P.L.

1984. Legionnaires' disease. Some clinical, diagnostic and epidemiological aspects. Dissertatie. Leiden (1984)

NEN 6265

Bacteriologisch onderzoek van water. Onderzoek naar de aanwezigheid en het aantal kolonievormende eenheden (KVE) van *Legionella*-bacteriën.  
Nederlands Normalisatie Instituut, Delft (juni 1991, 1e druk)

NEN 6550

Bacteriologisch onderzoek van water. Bepaling van het kolonietal op glucose-gistextract bij 37 °C.  
Nederlands Normalisatie Instituut, Delft (december 1979, 1e druk)

NEN 6560

Bacteriologisch onderzoek van water. Bepaling van het kolonietal op glucose-gistextract bij 22 °C.  
Nederlands Normalisatie Instituut, Delft (juni 1982, 1e druk)

NEN 6573

Bacteriologisch onderzoek van water. Onderzoek met behulp van membraanfiltratie naar de aanwezigheid en het aantal kolonievormende eenheden (KVE) van *Pseudomonas aeruginosa*.  
Nederlands Normalisatie Instituut, Delft (mei 1987, 1e druk)

NEN 6553

Bacteriologisch onderzoek van drinkwater. Onderzoek met behulp van membraanfiltratie naar de aanwezigheid van bacteriën van de coligroep.  
Nederlands Normalisatie Instituut, Delft (december 1981, 1e druk)

NIEDEVELD, COR.J., PET, FRED M., AND MEENHORST, PIETER L.

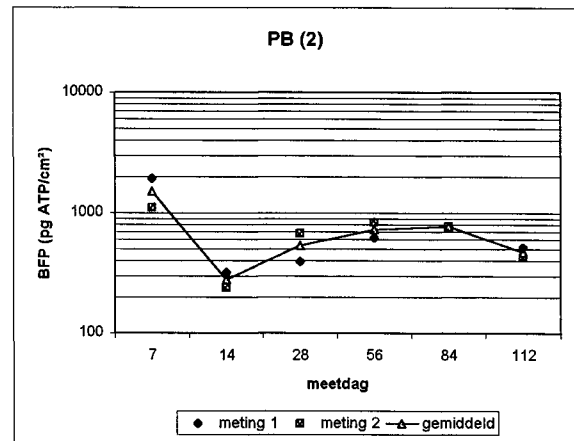
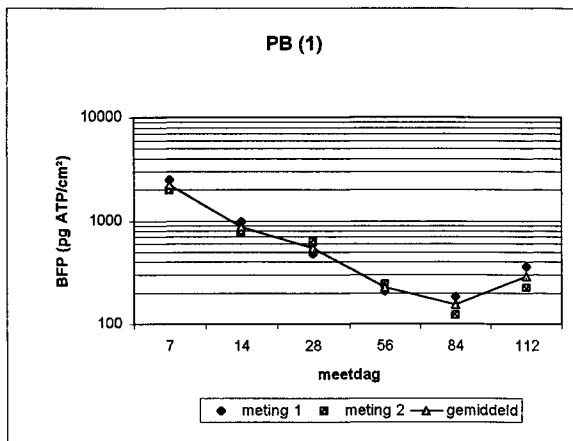
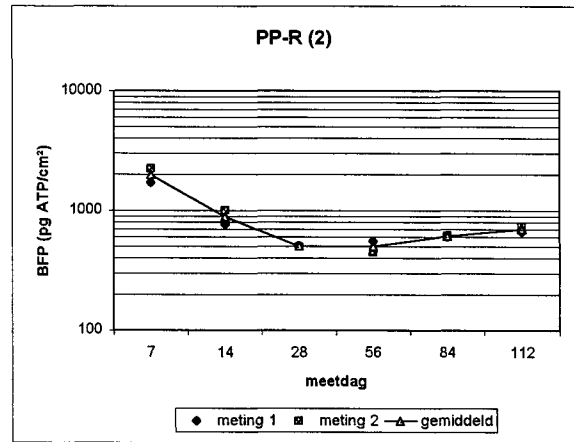
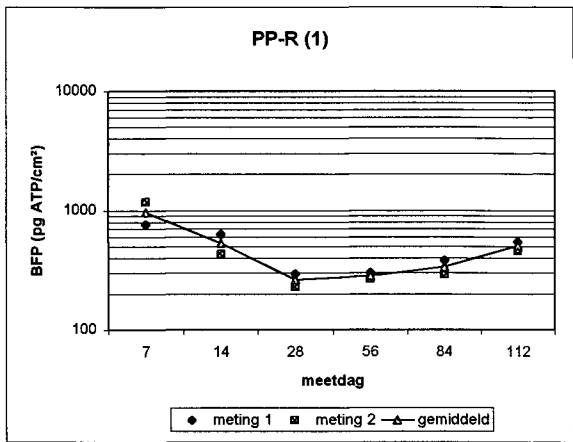
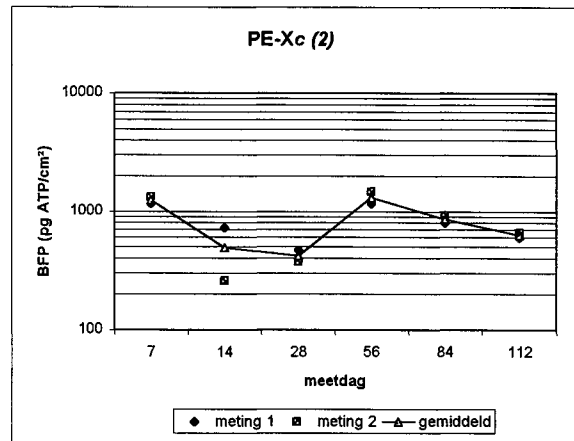
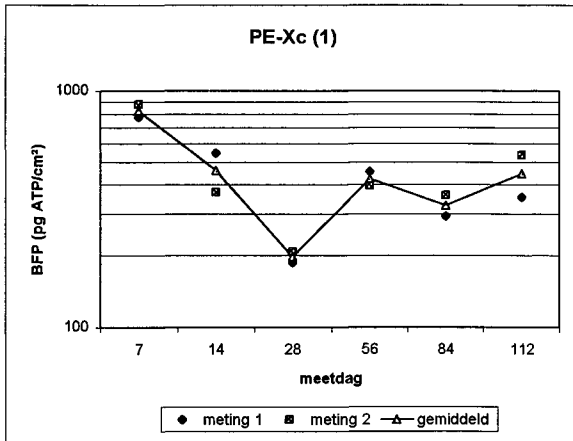
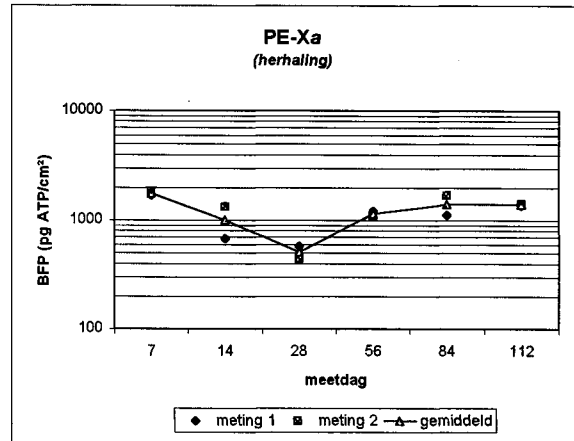
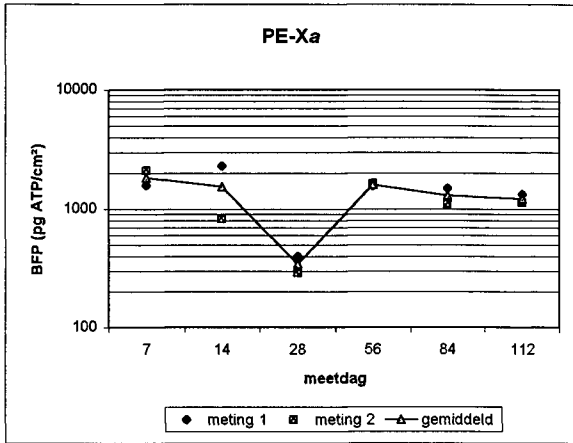
Effect of rubbers and their constituents on proliferation of *Legionella pneumophila* in naturally contaminated hot water. The Lancet. 1986 Jul 26; 180-184

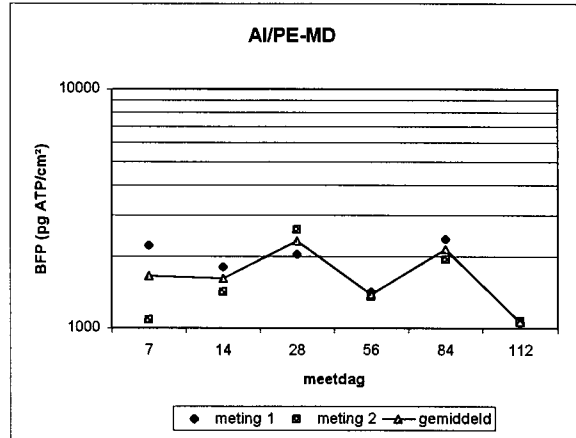
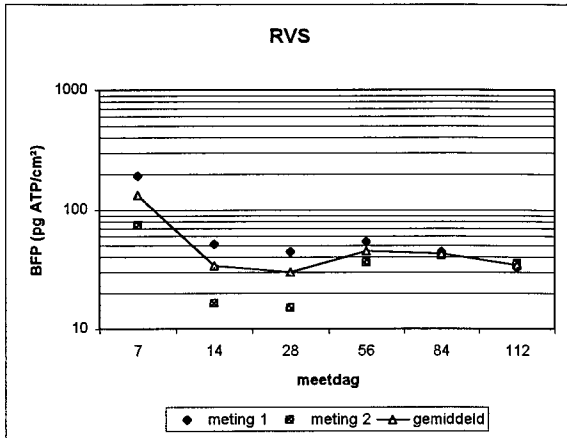
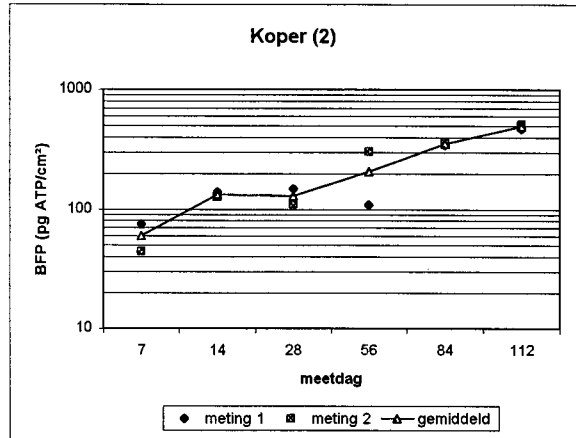
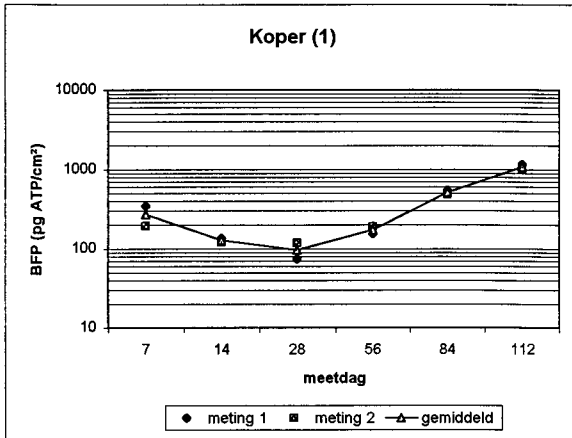
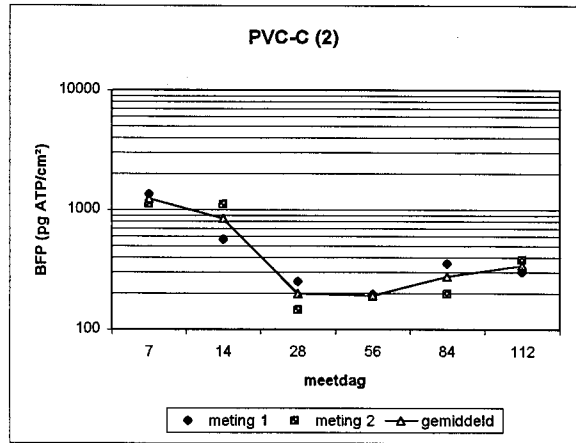
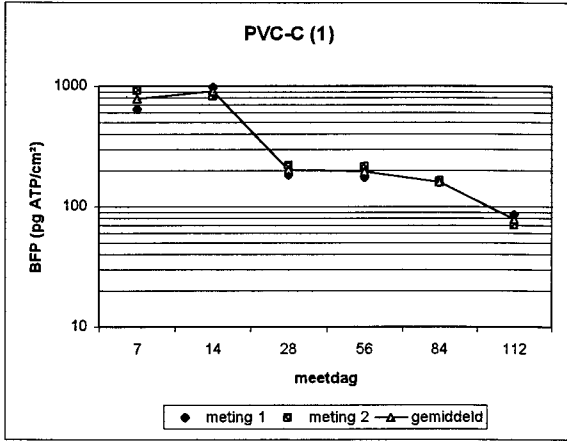
- ROGERS, JULIE, DOWSETT, A.B. DENNIS, P.J. LEE, J.V. AND KEEVIL, C.W.  
Influence of Plumbing materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in Potable Water Systems. Applied and Environmental Microbiology. 1994; 60(6):1842-1851
- SHULZE-RÖBBECKE, R. UND C. HAGENAU  
Verhalten von Mikroorganismen und Viren bei der Trinkwasseraufbereitung.  
Mykobakterien.  
DVGW-Schriftenreihe Wasser nr. 110, p. 191-202
- SLAATS, P.G.G  
Vergelijking materialen binnenleidingen  
Kiwa-rapport KOA 96.097 (1996)
- VEWIN  
Statistiek wateronderzoek 1992 (1992).
- VROUWENVELDER, J.S. en VAN DER KOOIJ, D.  
Samenstelling en concentratie van biofilm op leidingwanden van distributiesystemen in Nederland. Kiwa-rapport 1999 (In voorbereiding).
- WATERLEIDINGBESLUIT  
(1984)

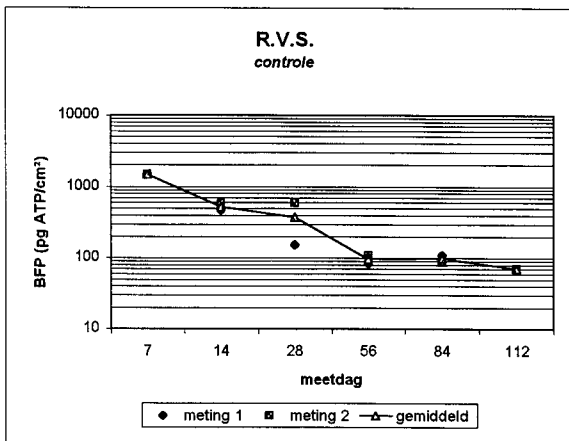
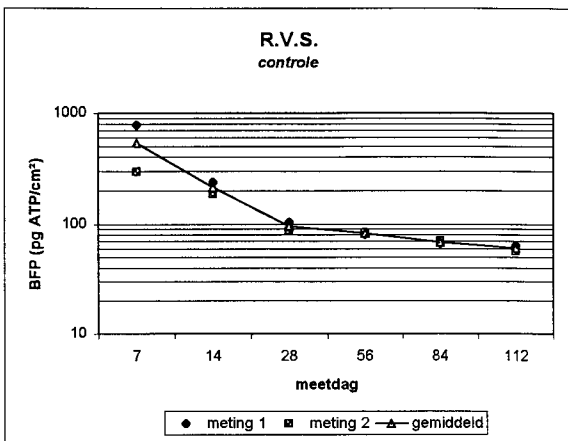
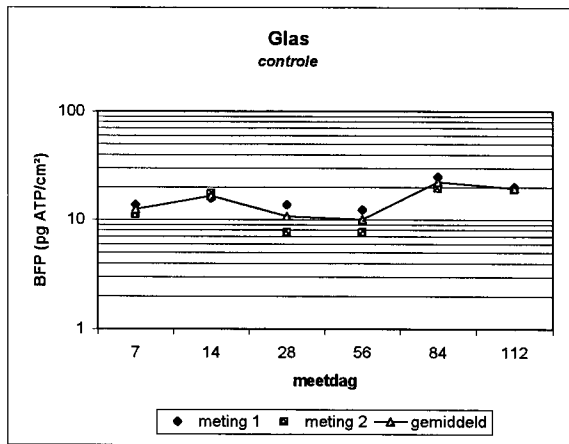
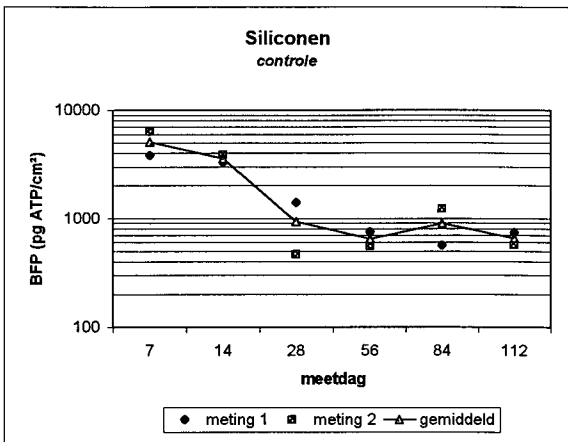
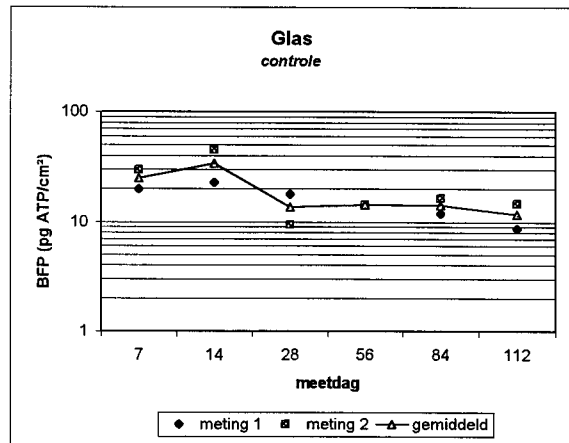
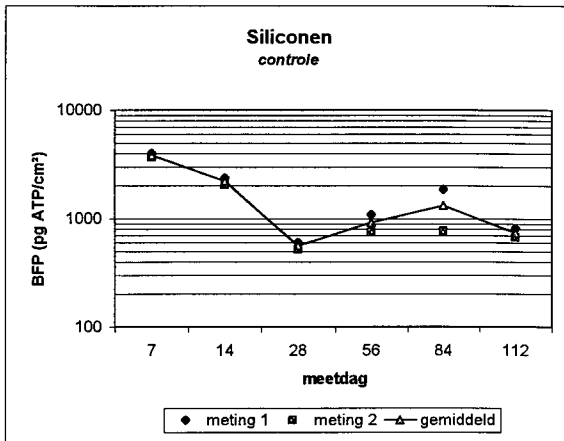
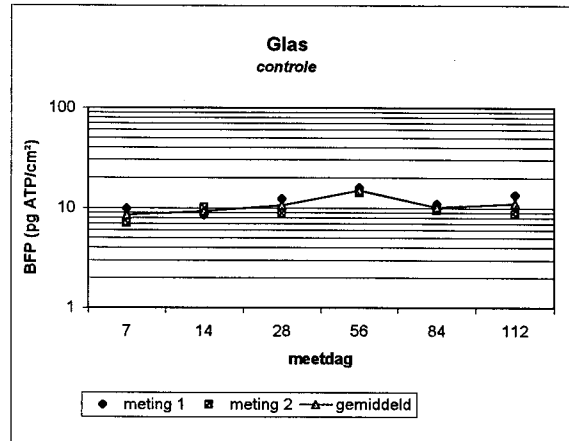
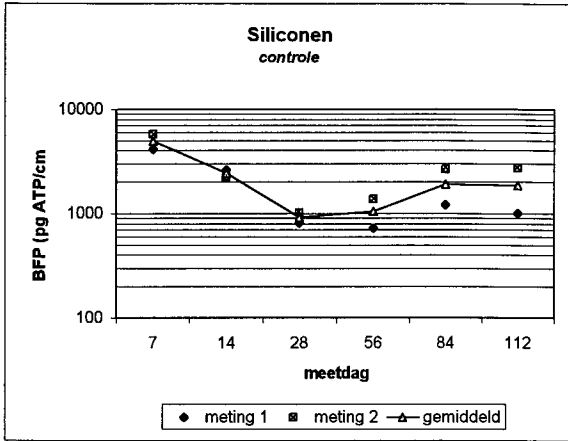


**BIJLAGE 1**  
**Afzonderlijke meetwaarden van de biofilmconcentratie op de materialen**

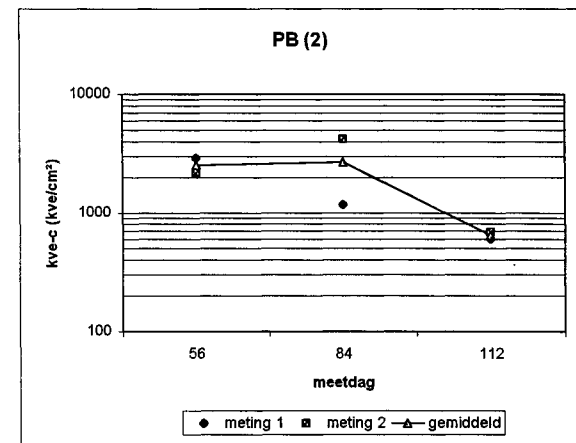
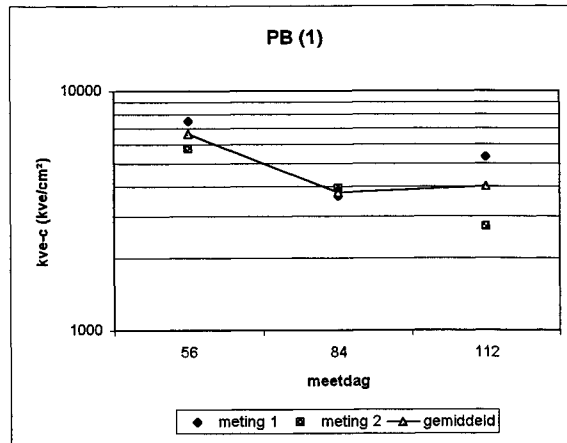
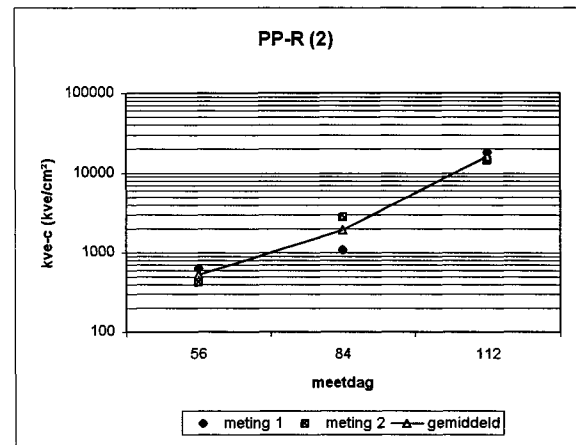
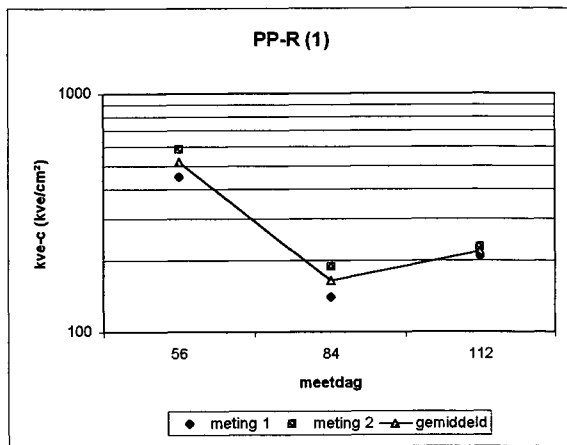
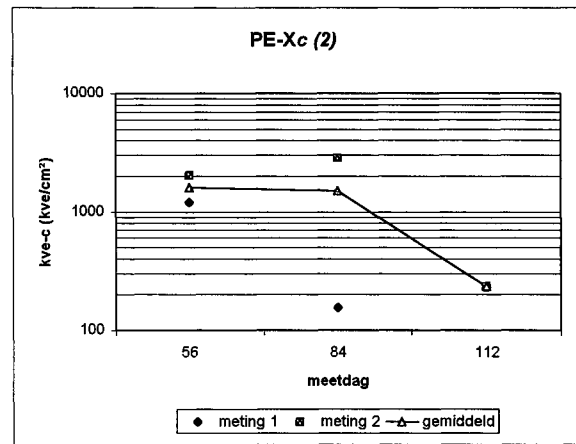
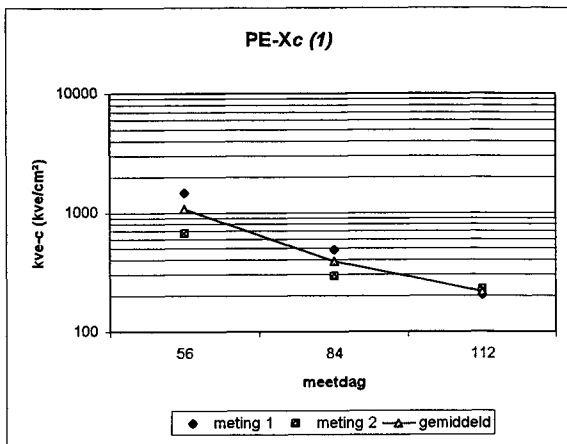
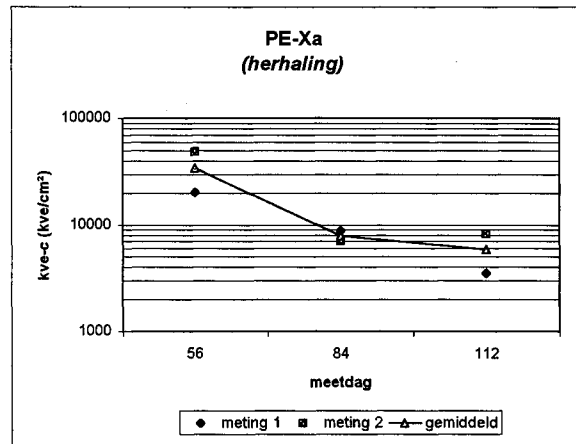
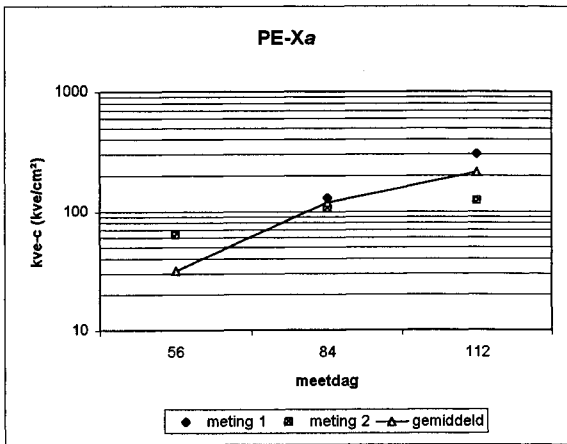


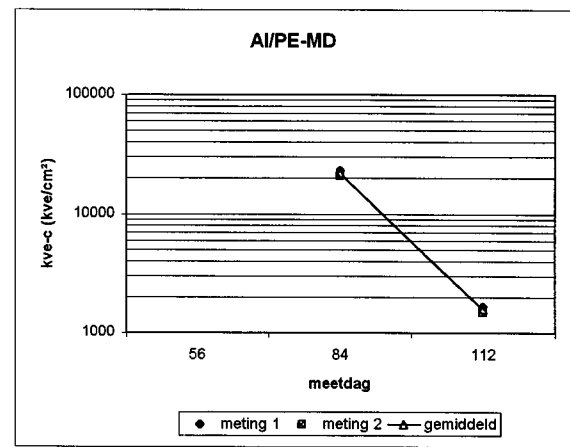
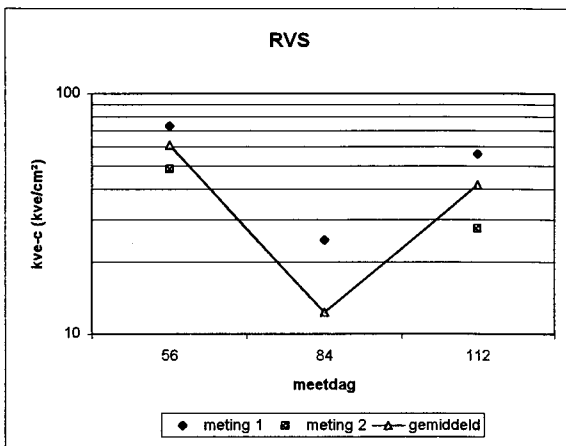
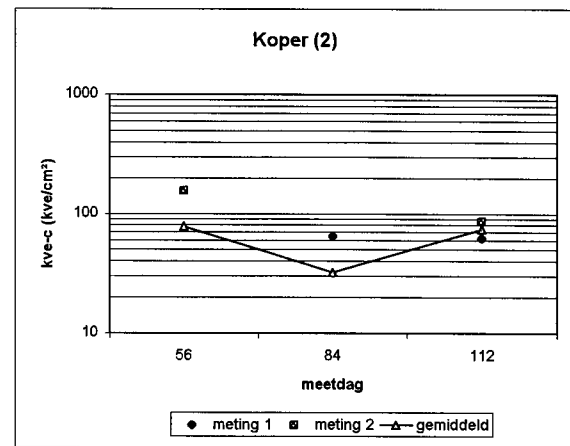
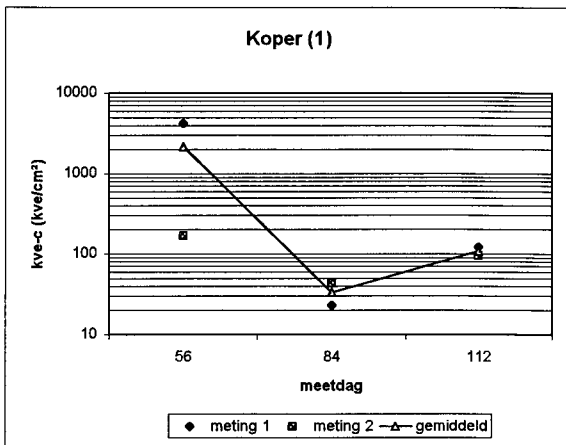
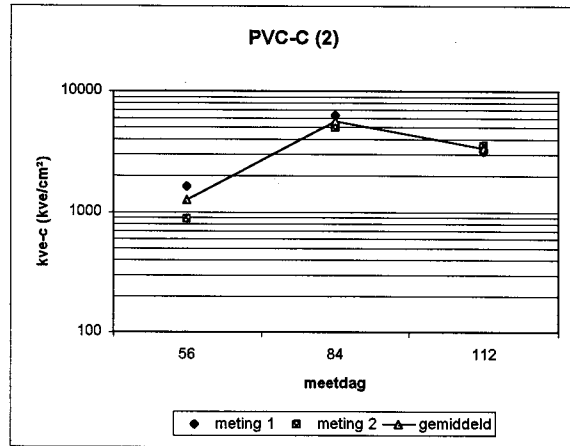
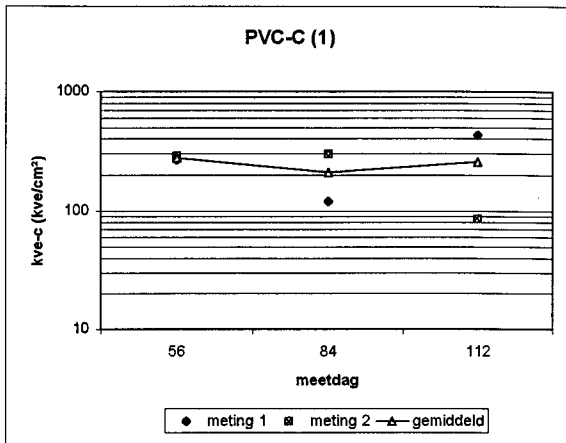


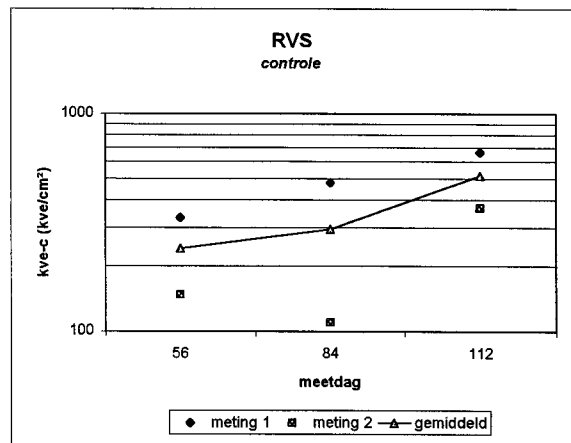
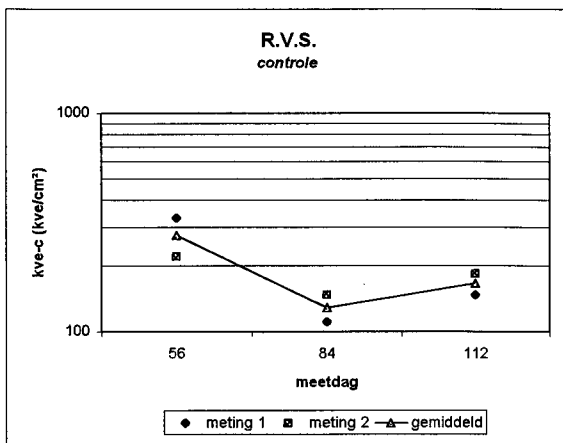
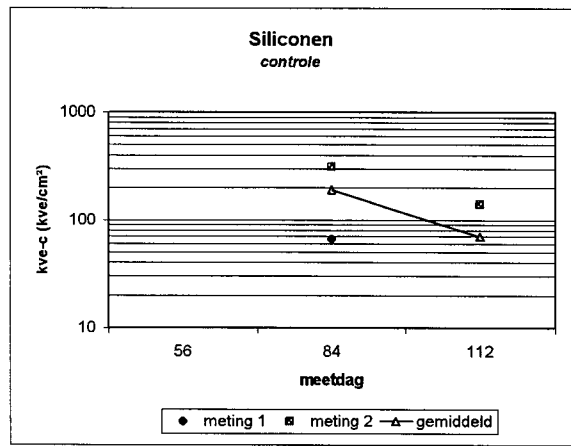
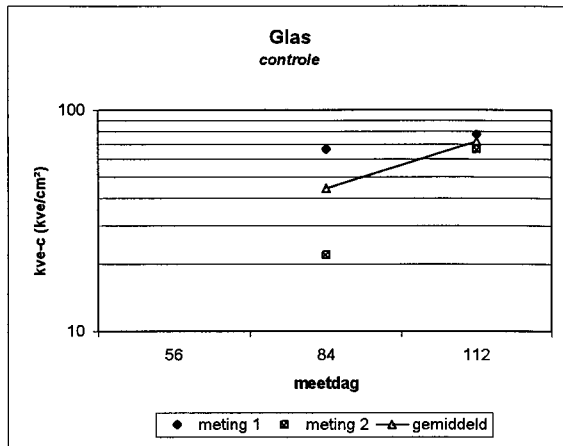
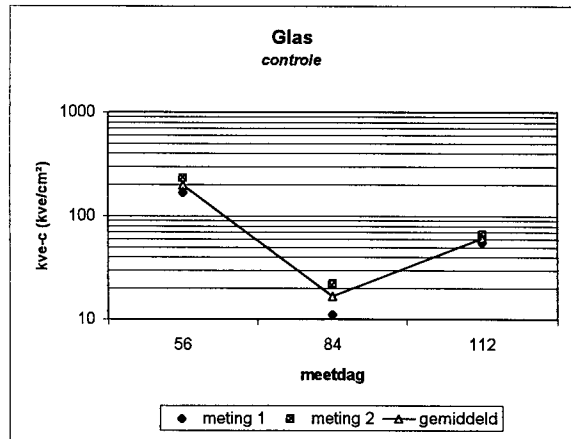
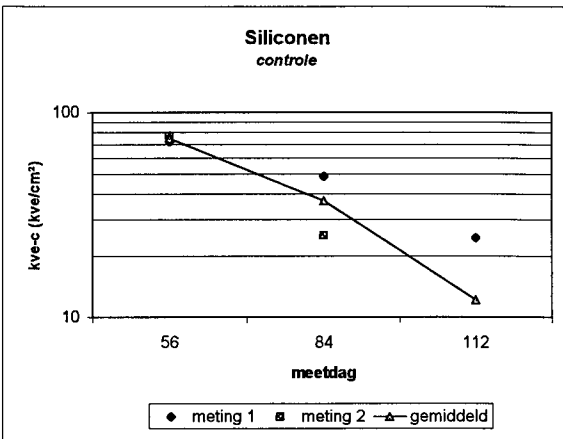
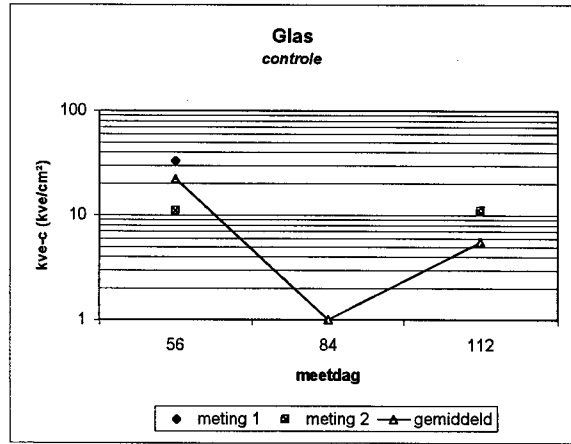
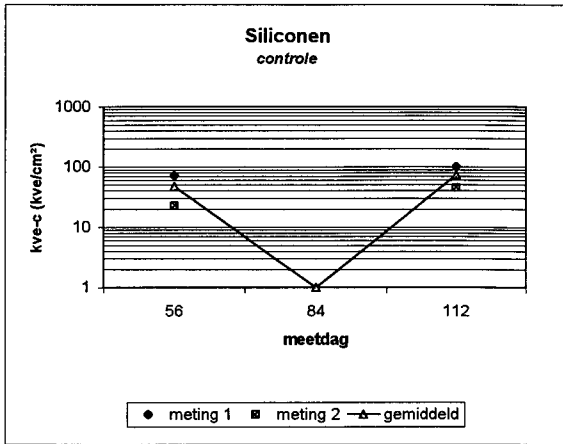




**BIJLAGE 2**  
**Afzonderlijke meetwaarden *Legionella*-concentratie op materialen**

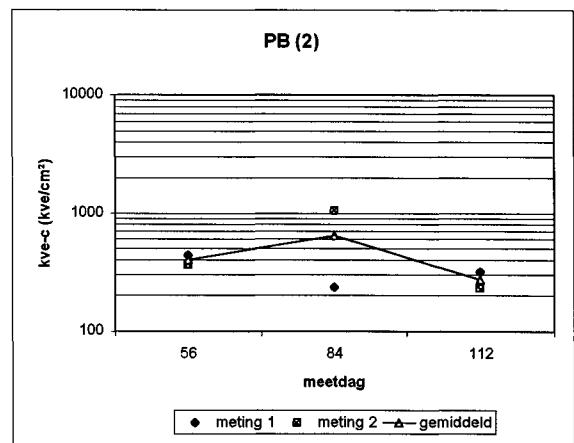
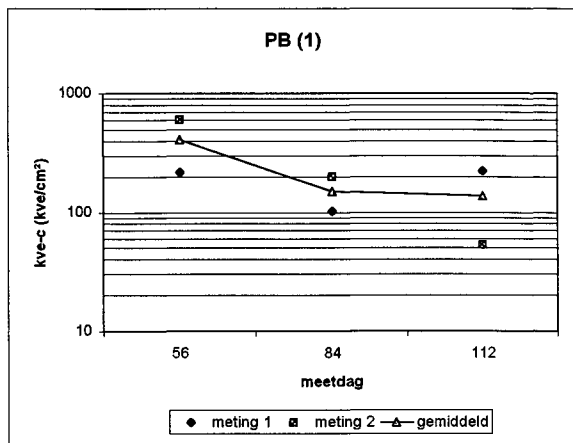
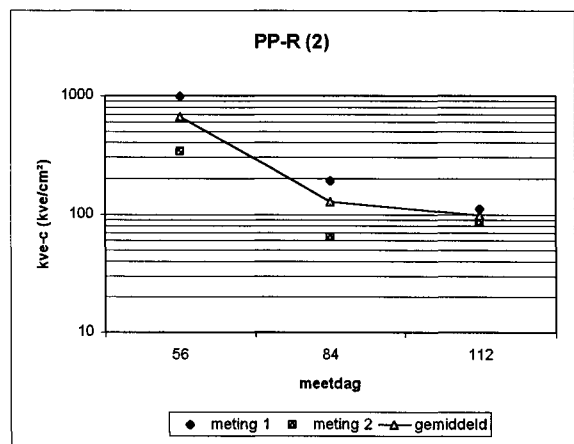
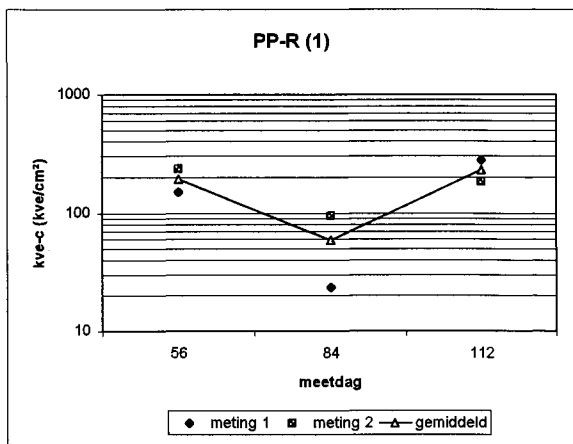
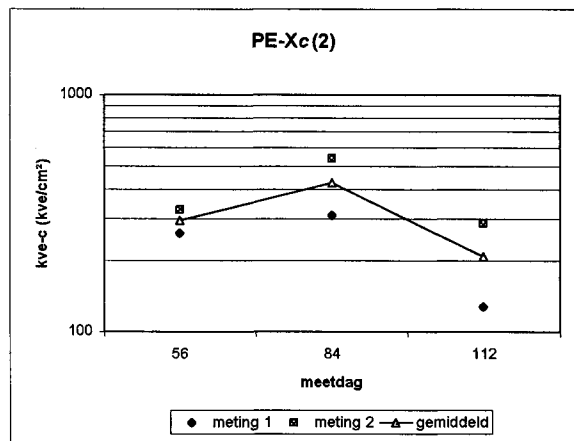
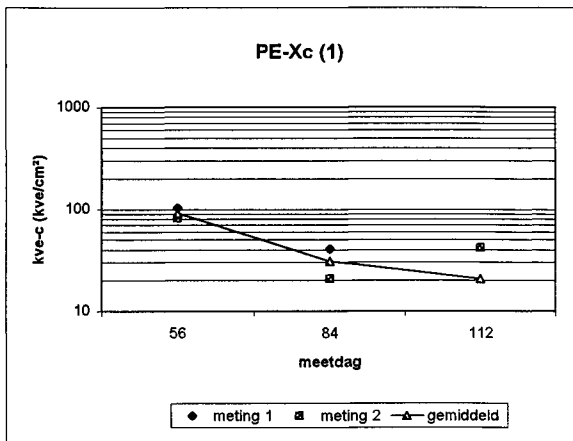
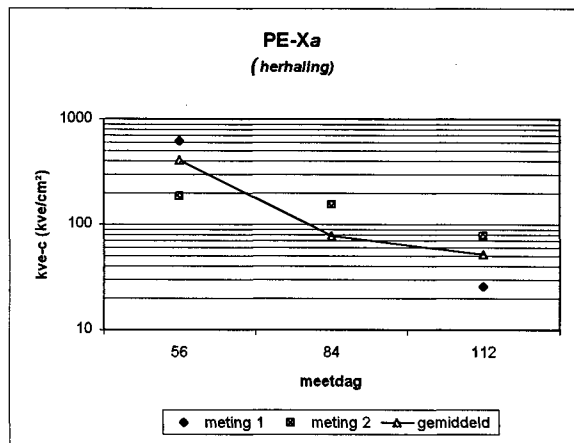
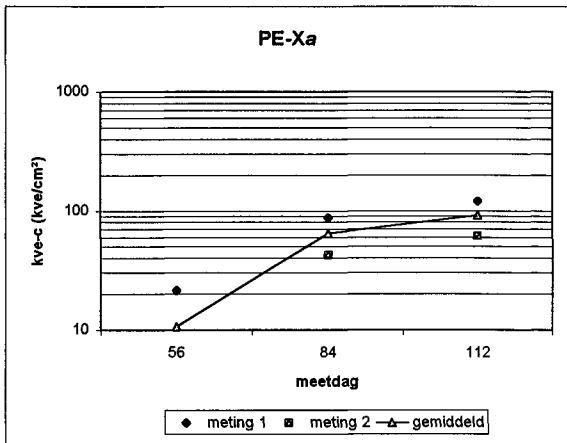


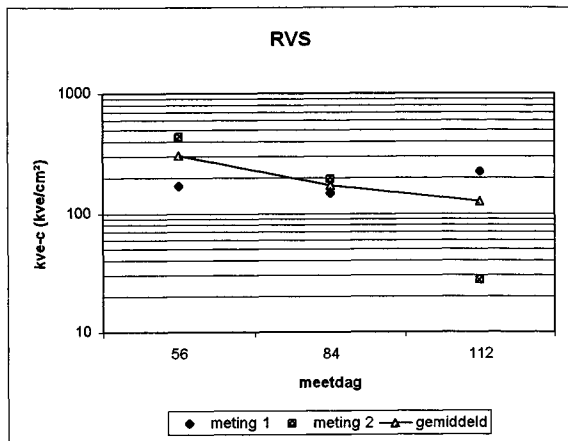
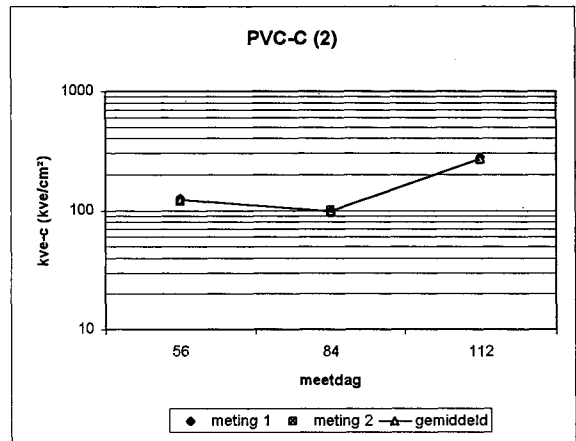
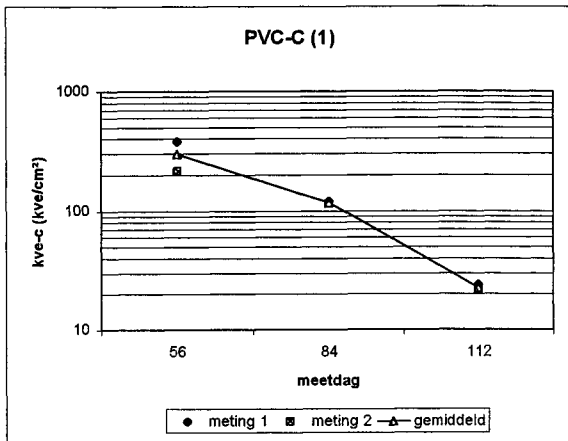


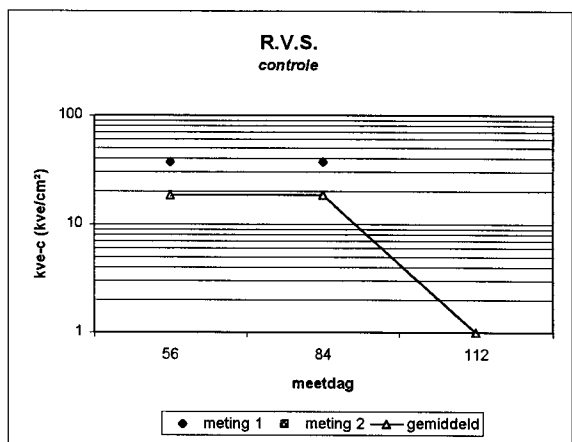
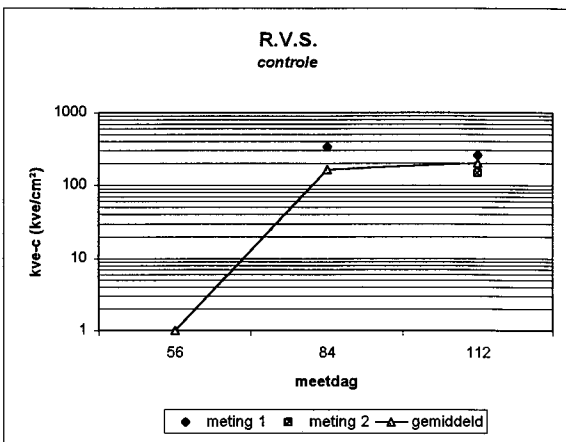
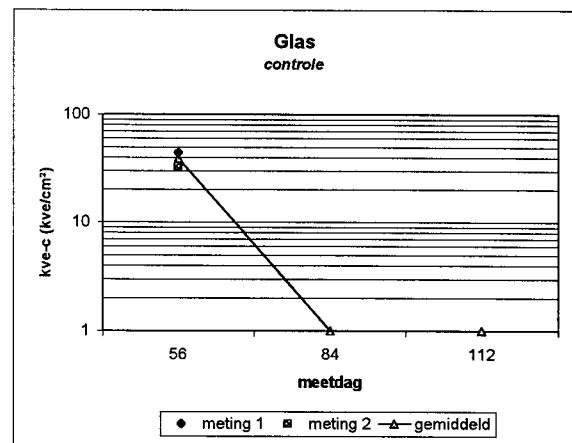
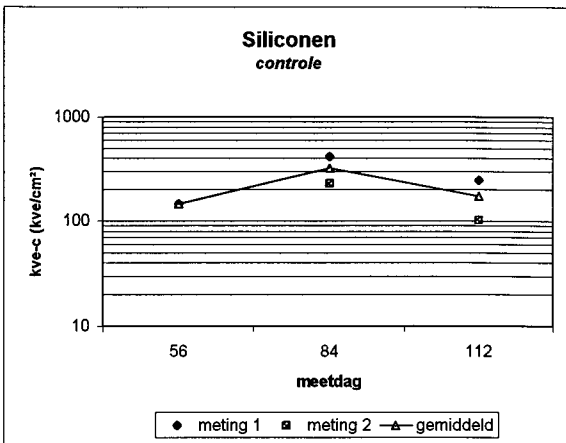
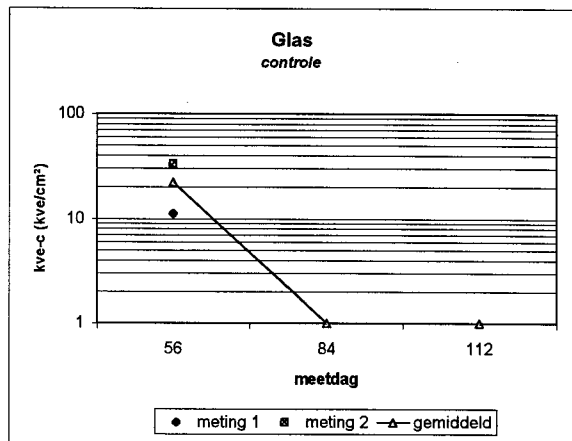
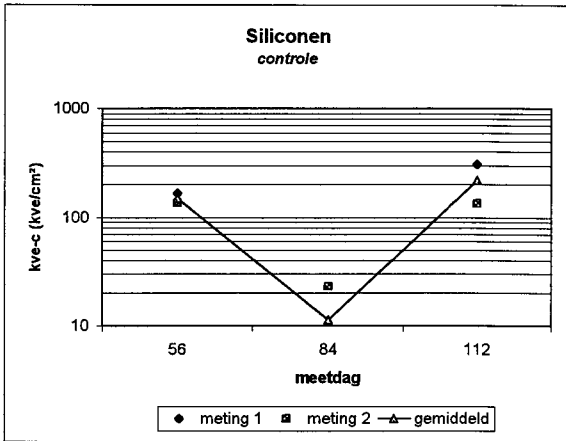


**BIJLAGE 3**  
**Afzonderlijke meetwaarden *Pseudomonas*-concentratie op materialen**

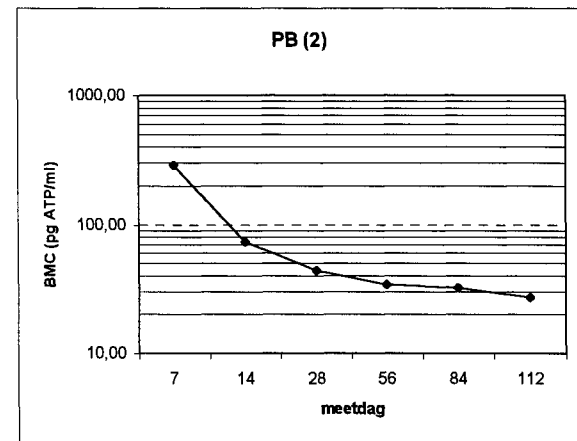
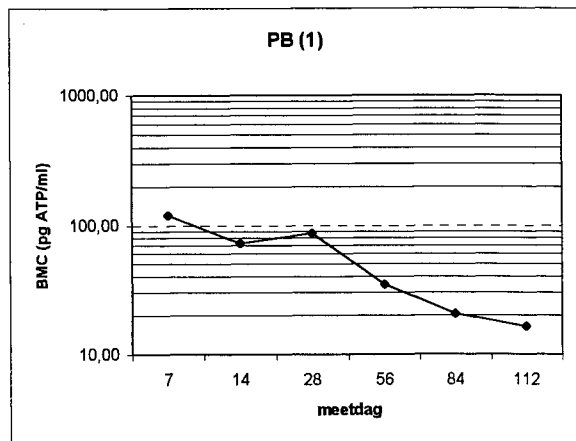
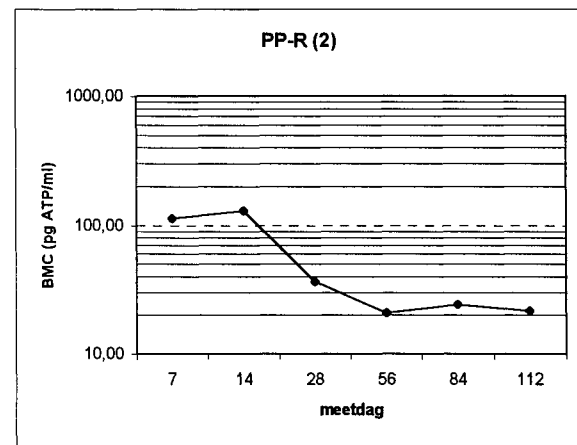
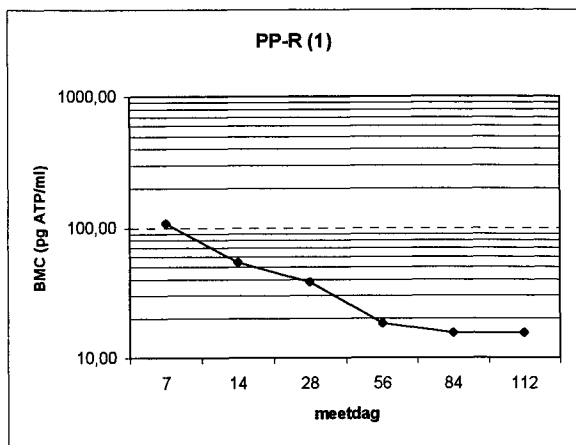
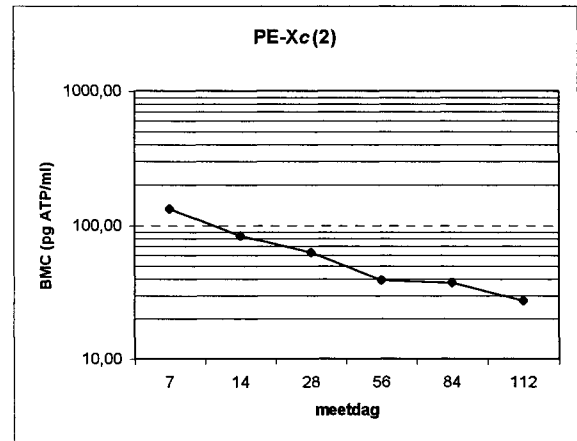
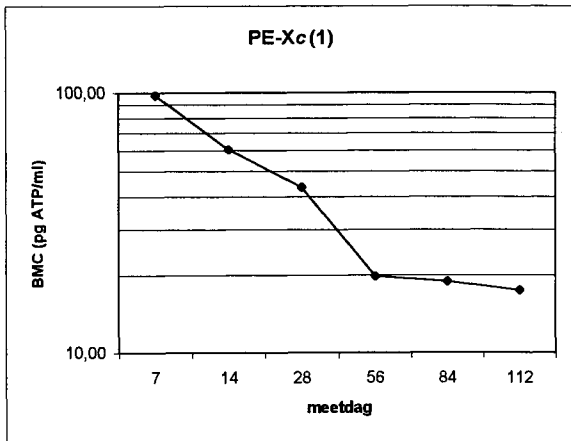
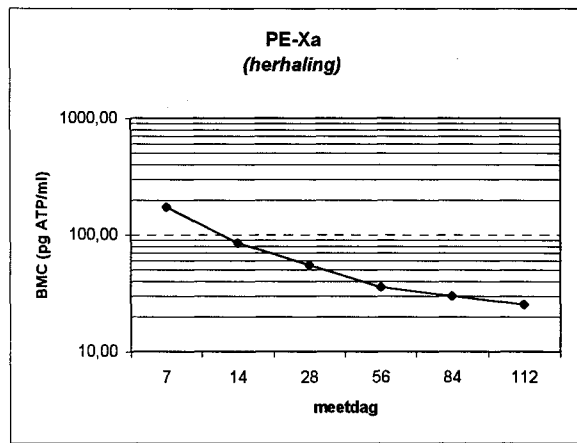
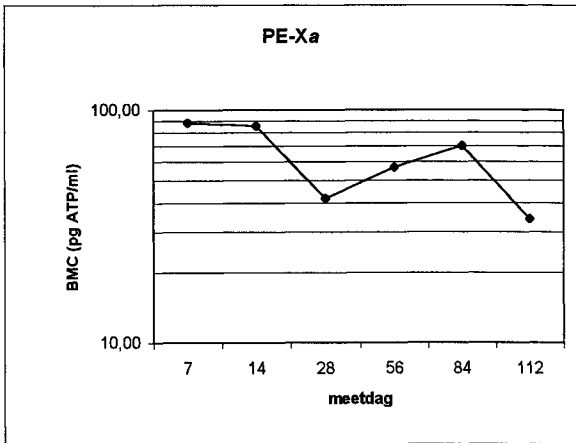


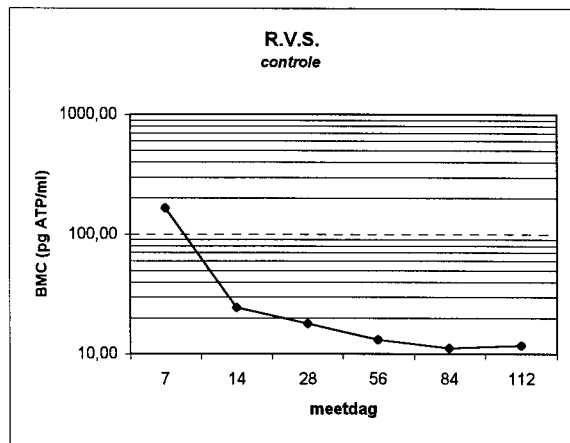
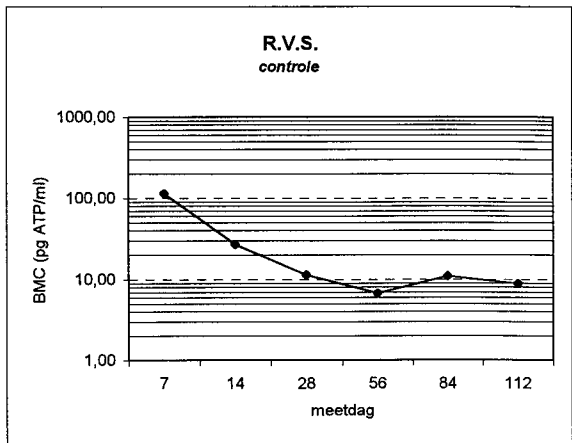
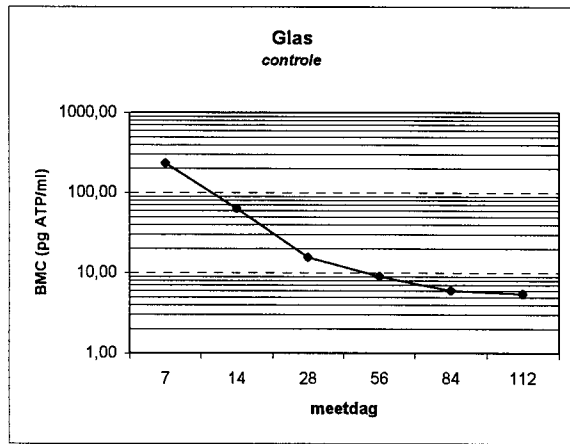
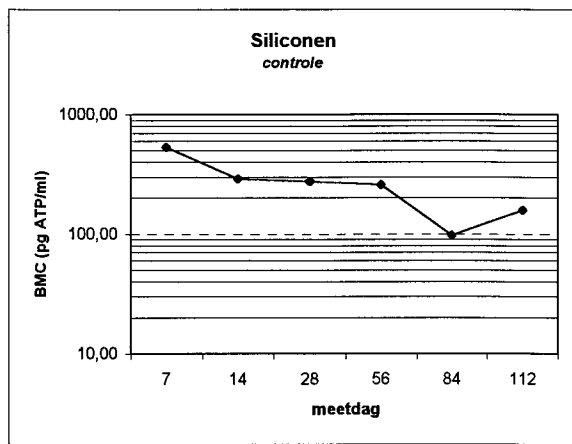
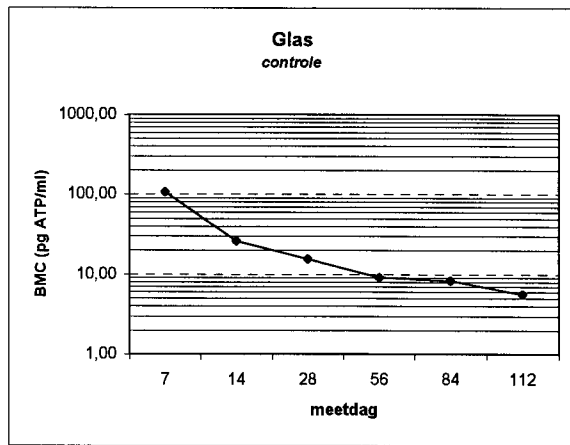
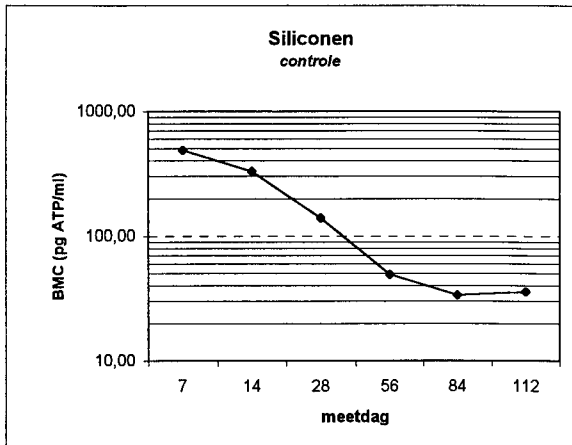
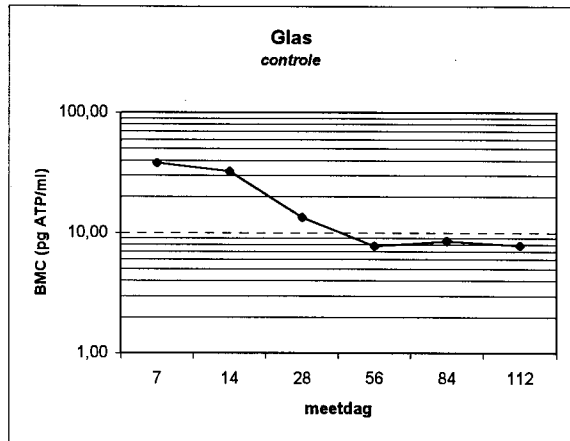
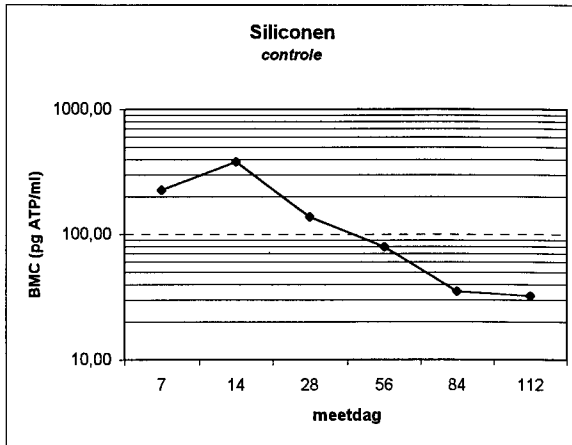


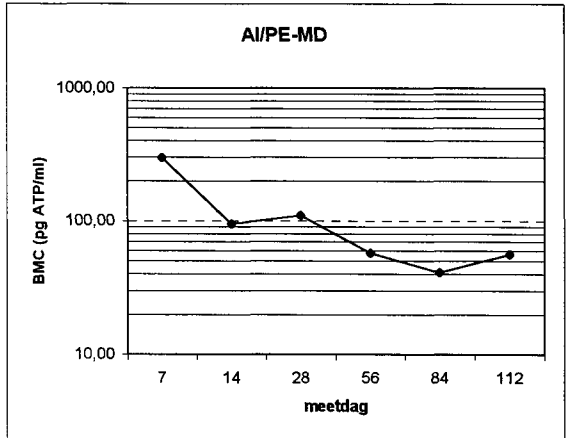
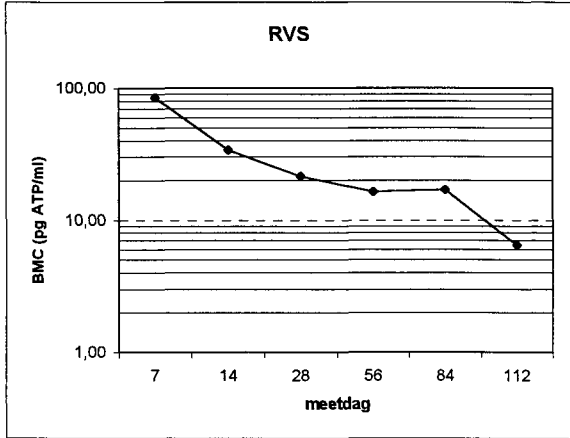
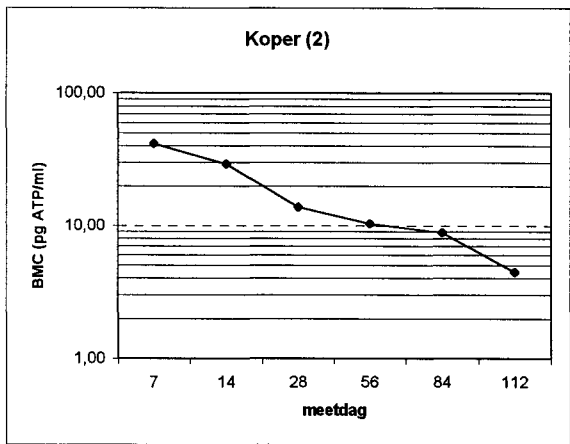
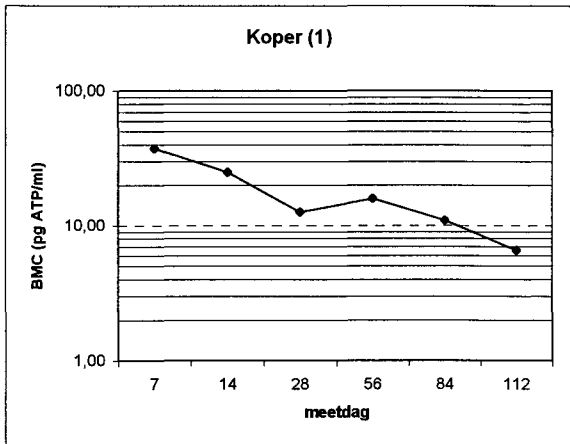
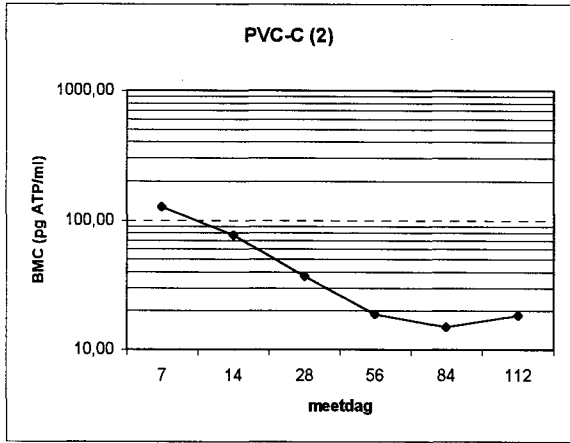
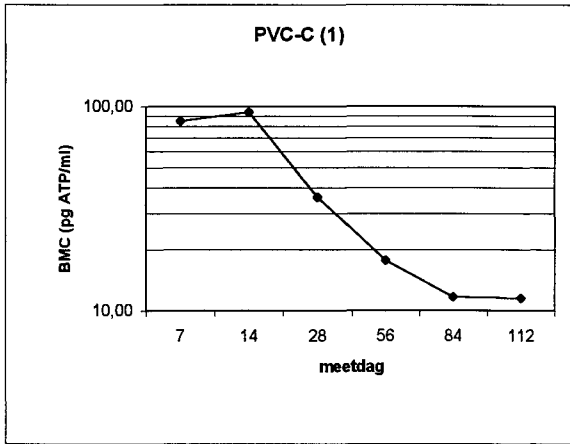




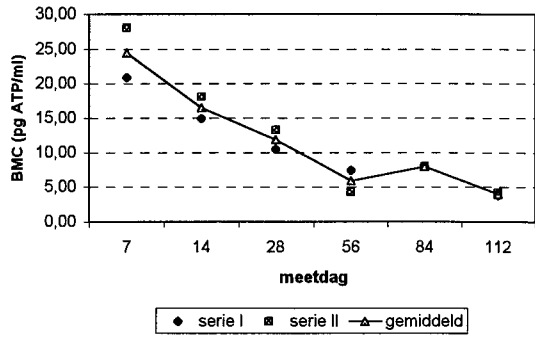
**BIJLAGE 4**  
**Afzonderlijke meetwaarden Biomassaconcentraties in het water**



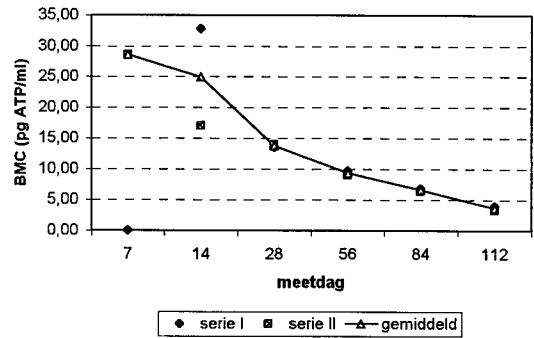




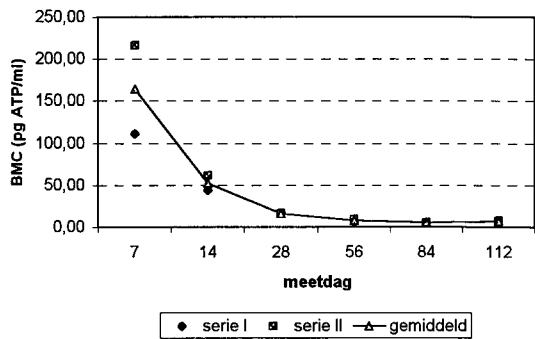
Testwater  
controle



Testwater  
controle



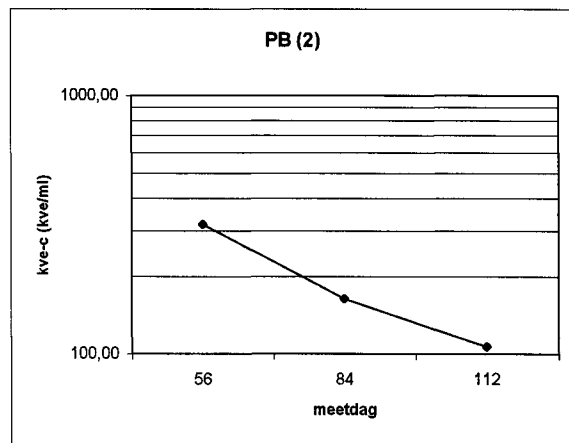
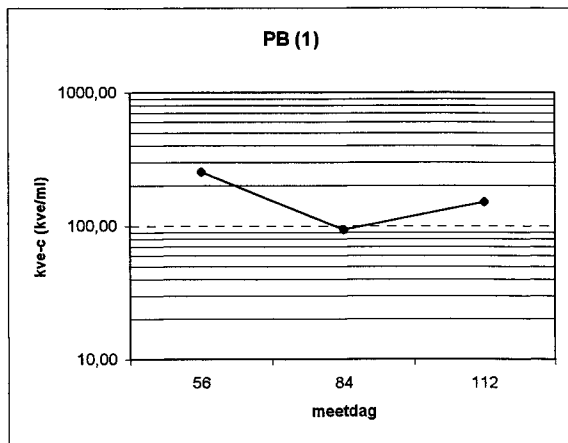
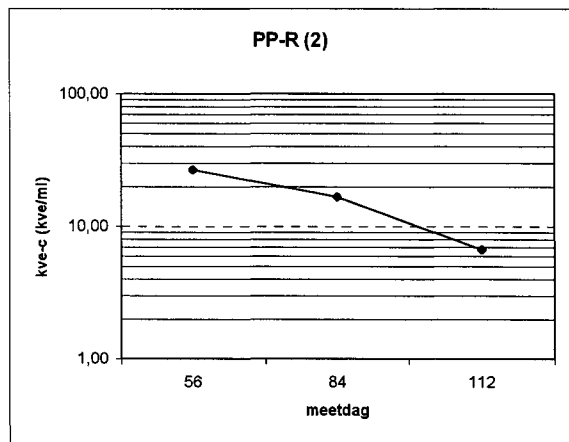
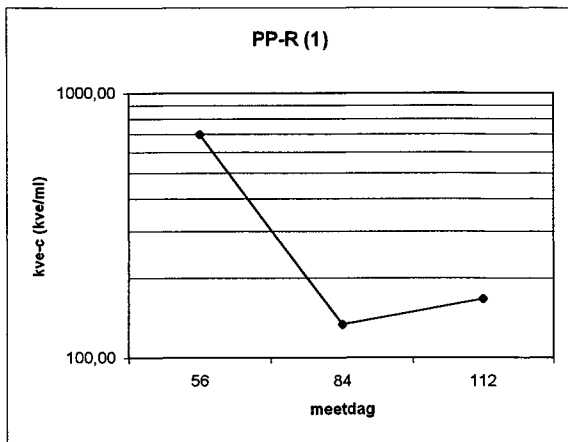
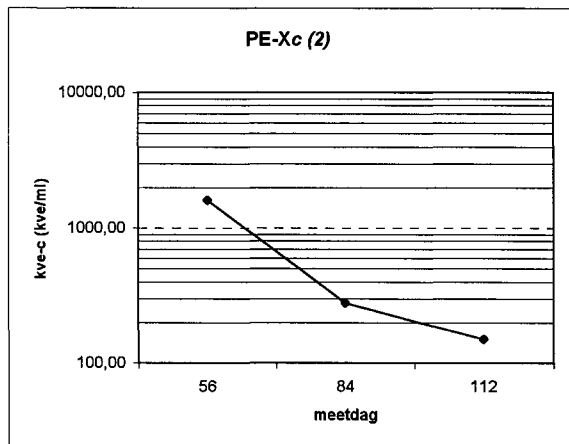
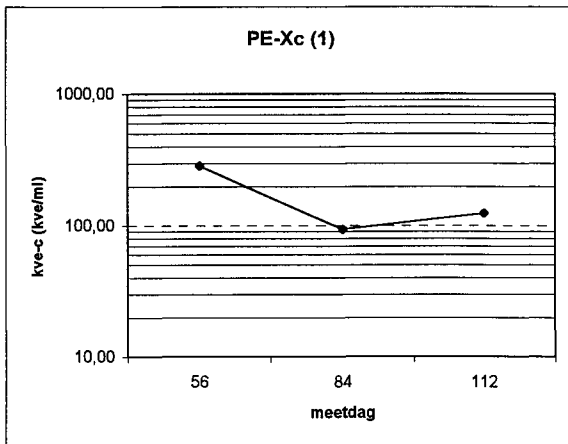
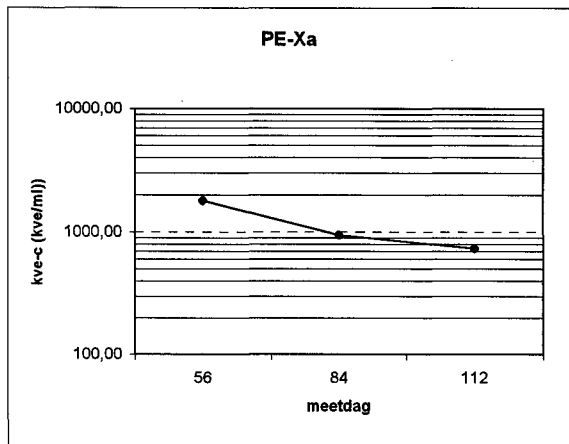
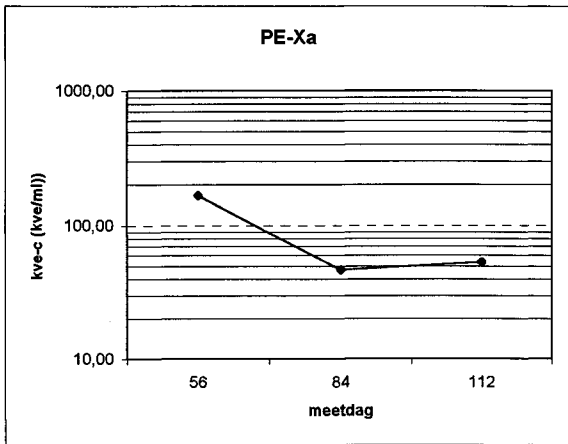
Testwater  
controle

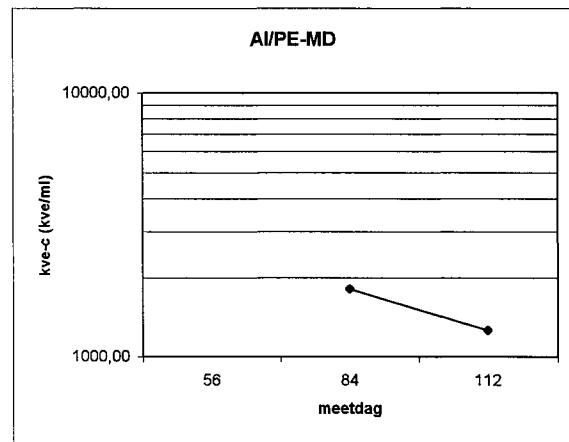
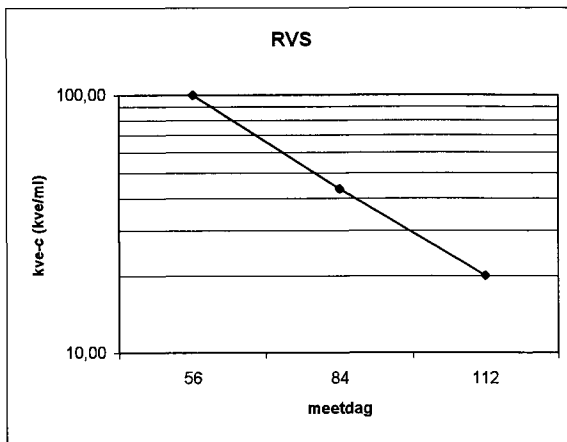
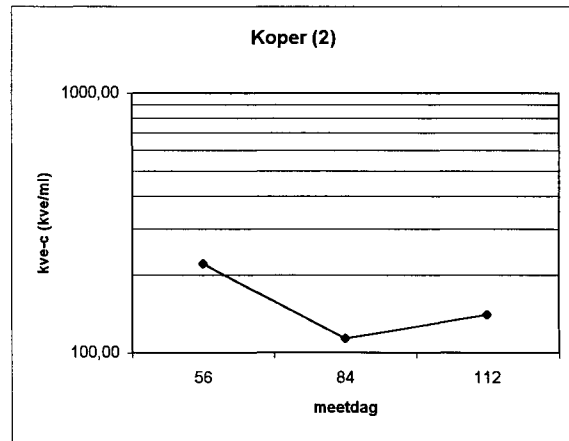
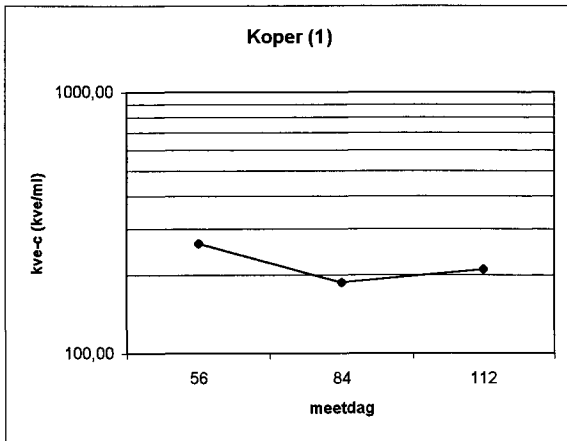
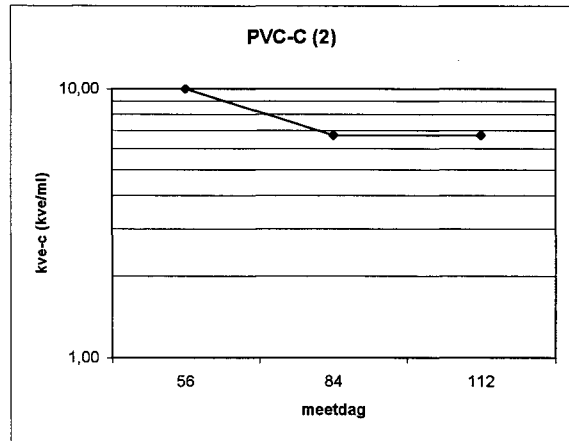
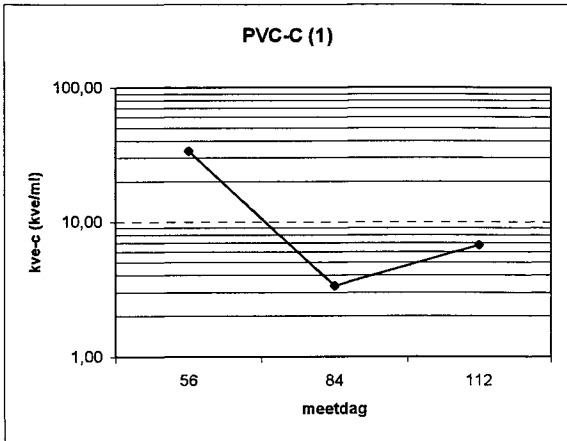


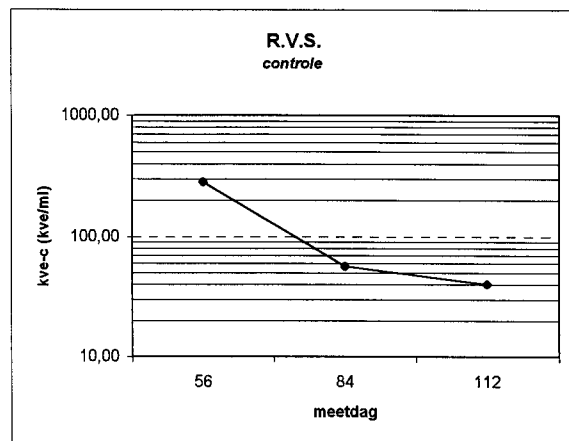
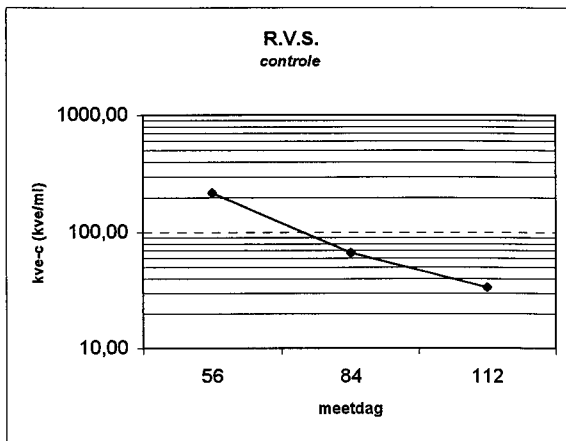
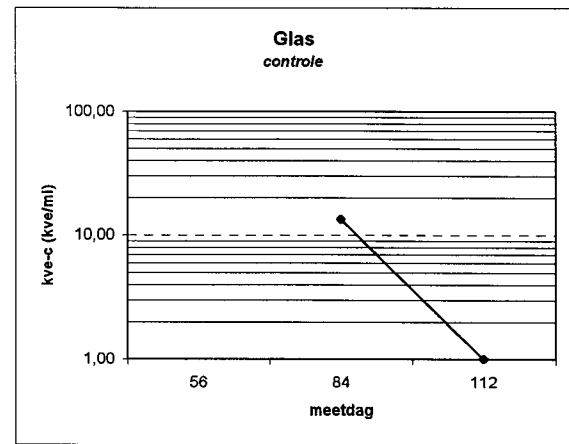
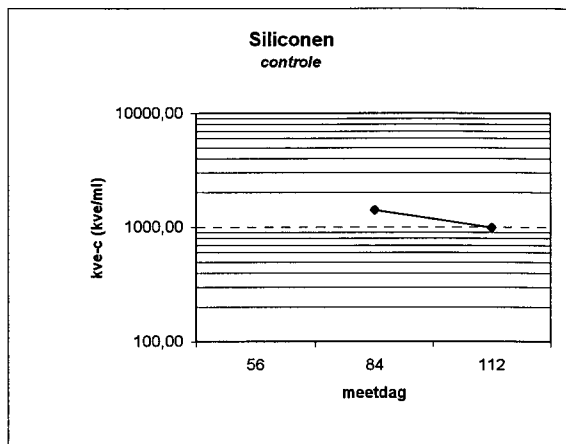
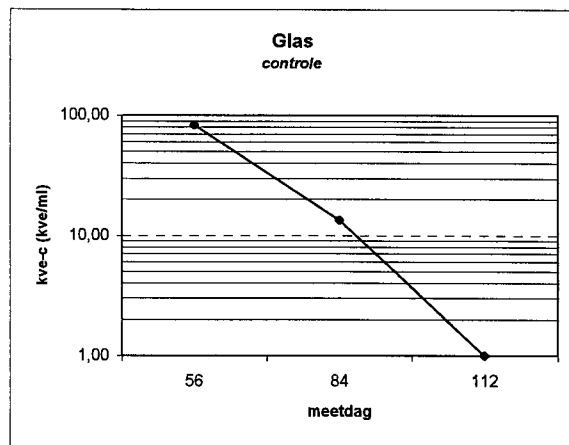
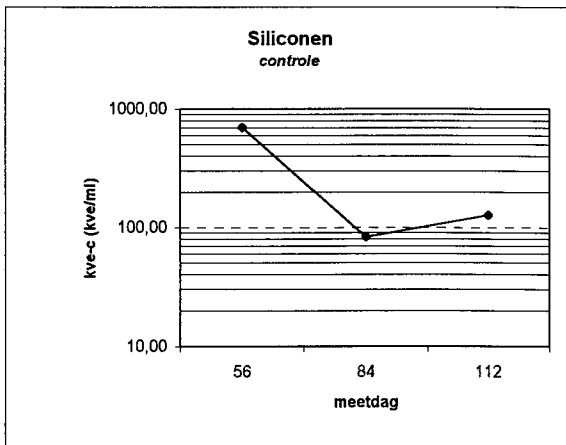
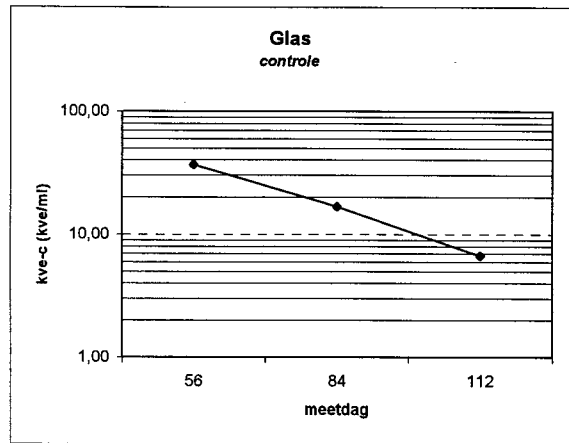
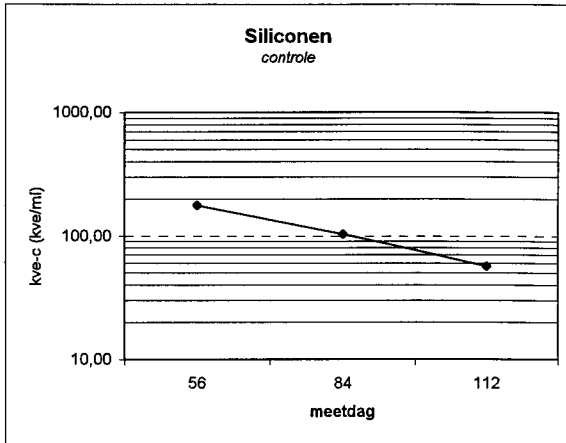




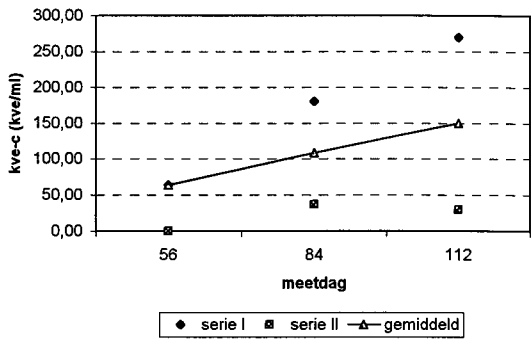
**BIJLAGE 5**  
**Afzonderlijke meetwaarden *Legionella* in het testwater**



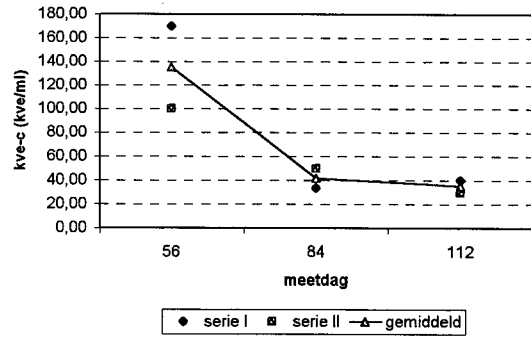




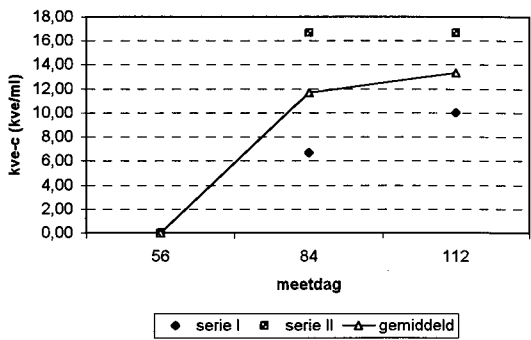
Testwater  
controle



Testwater  
controle



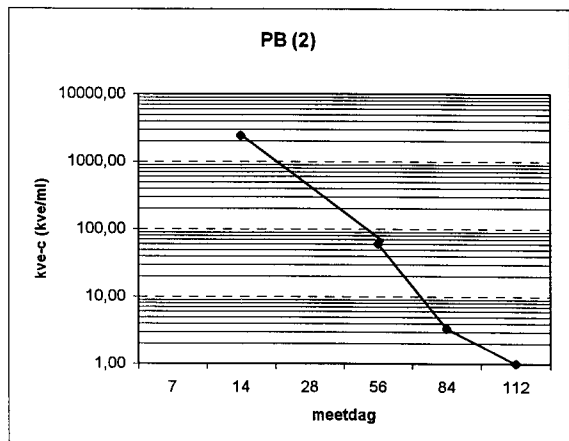
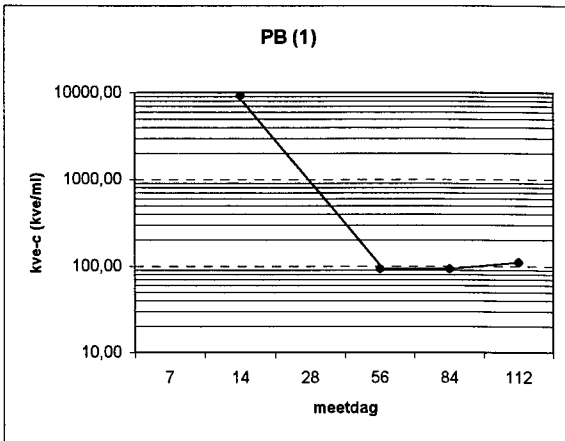
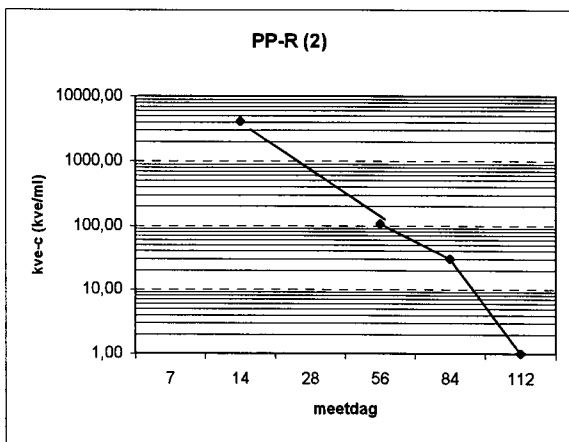
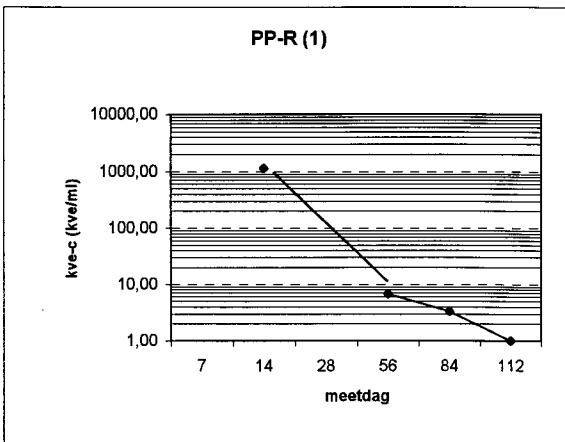
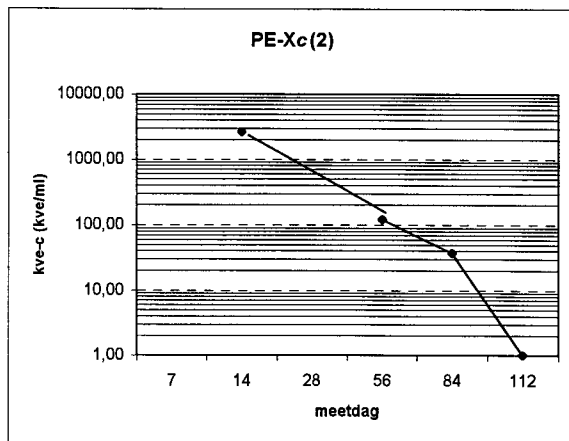
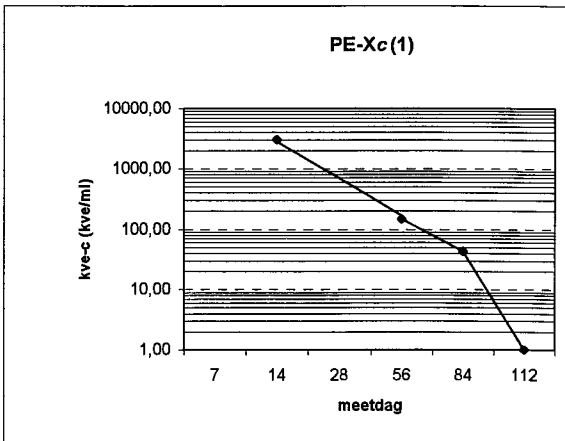
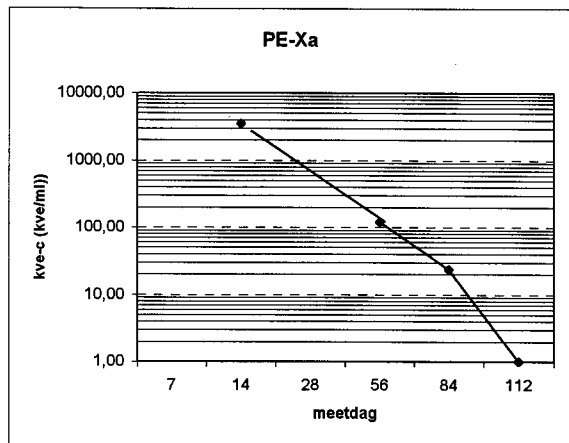
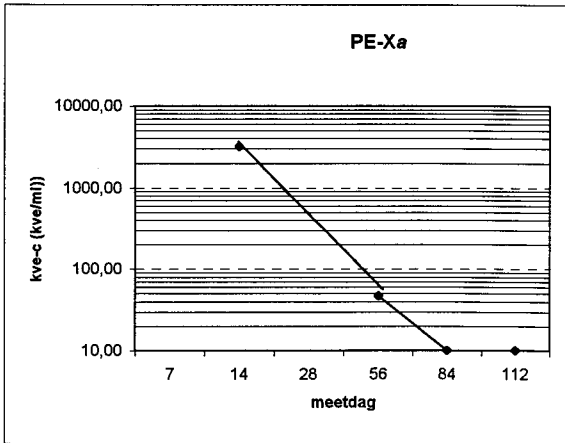
Testwater  
controle

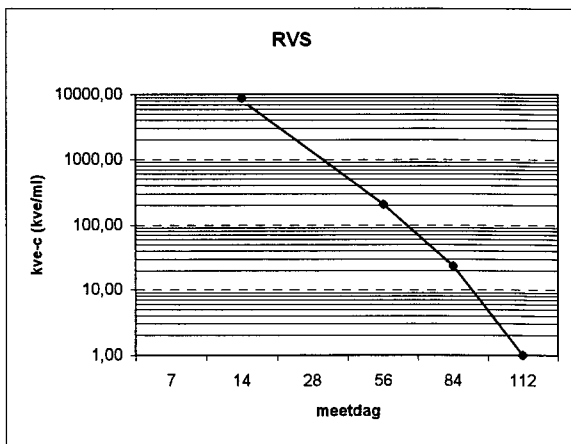
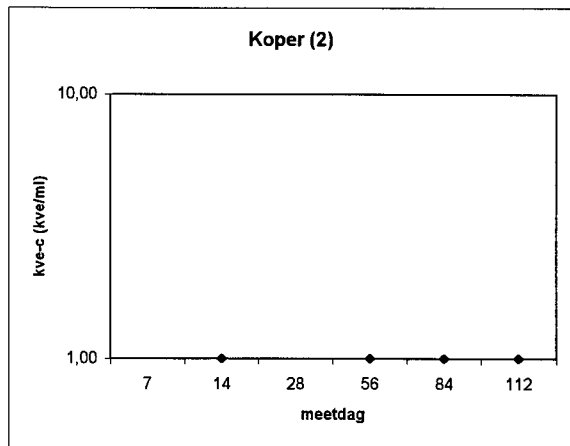
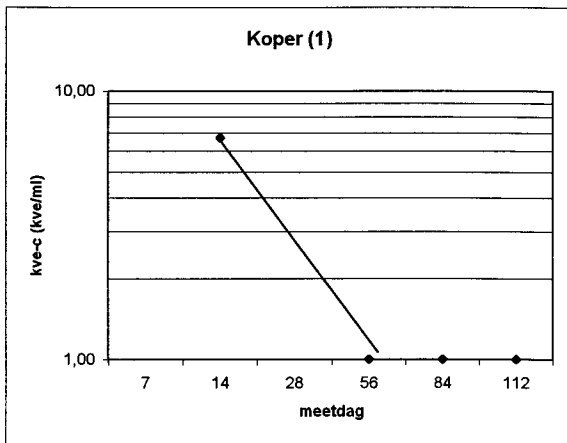
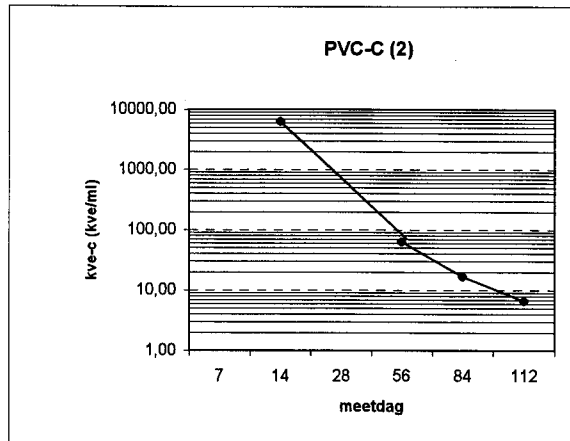
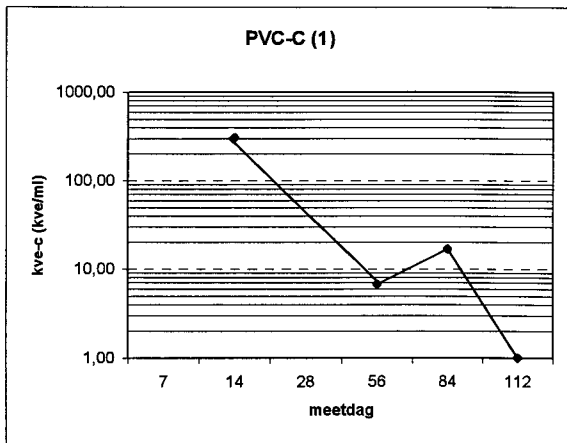


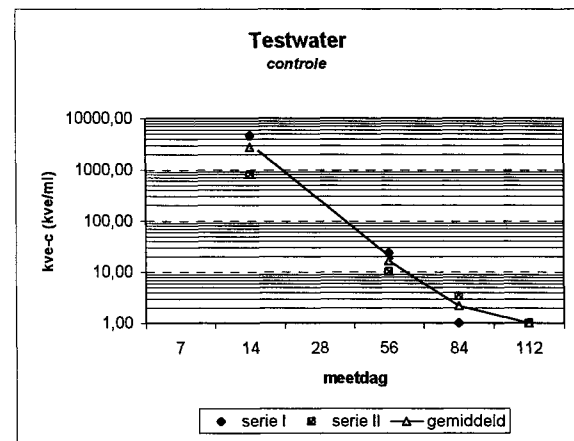
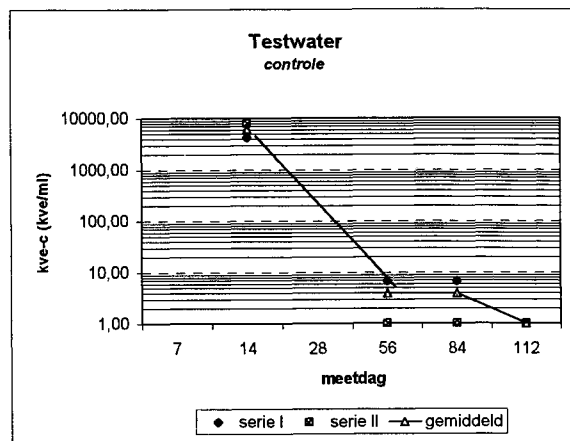
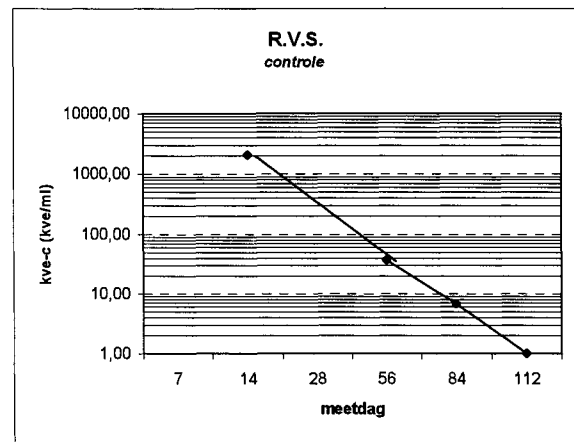
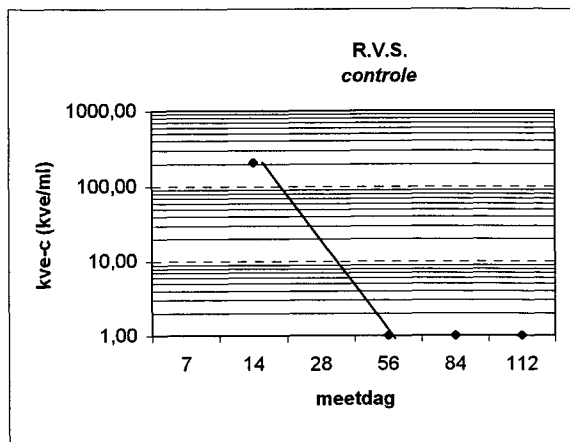
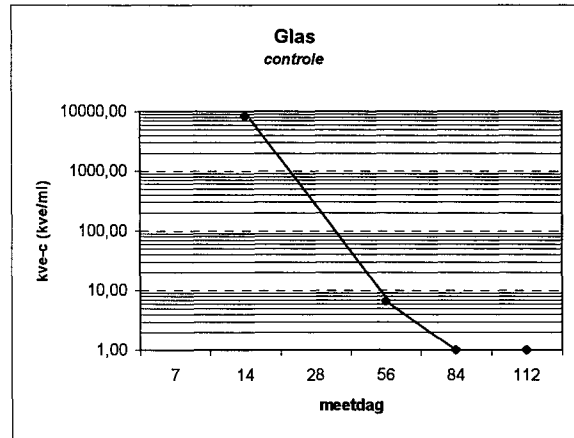
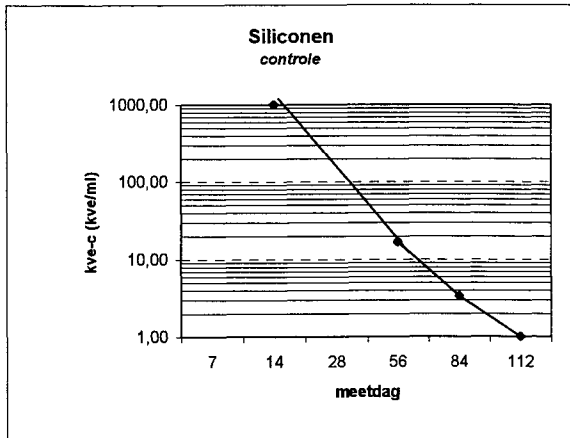
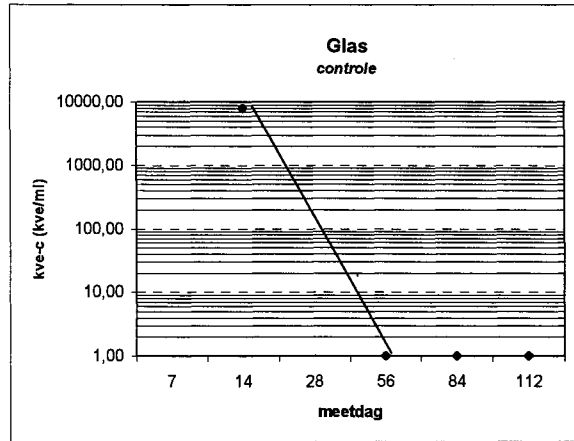
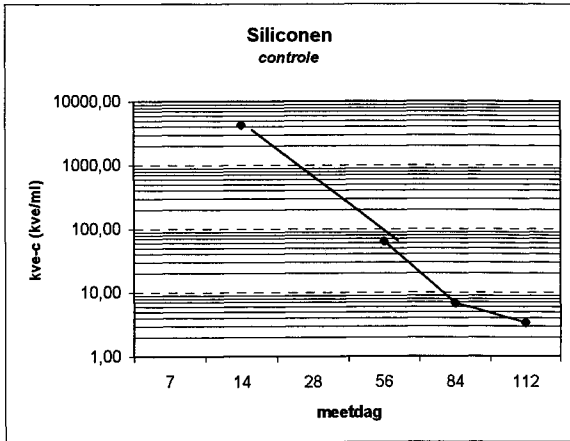


**BIJLAGE 6**  
**Afzonderlijke meetwaarden *Pseudomonas*-concentratie in het testwater**

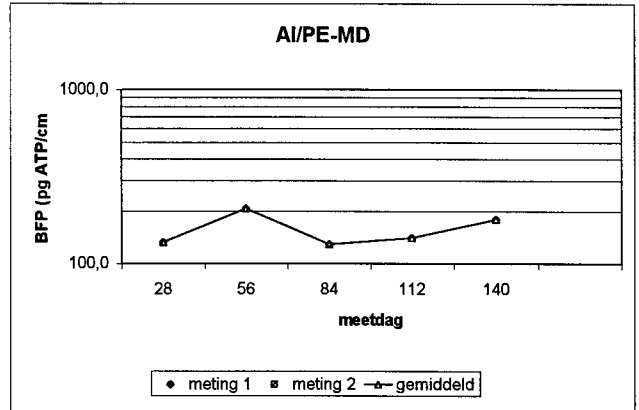
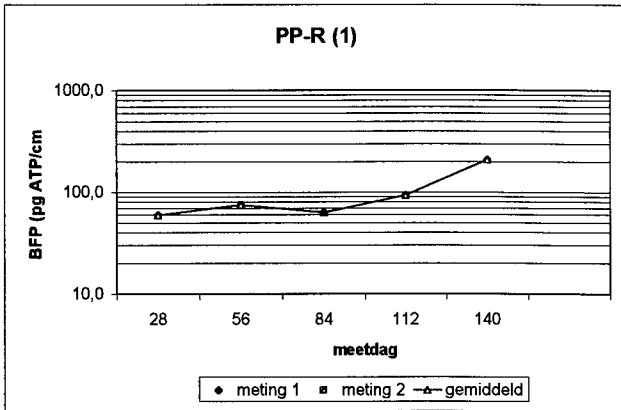
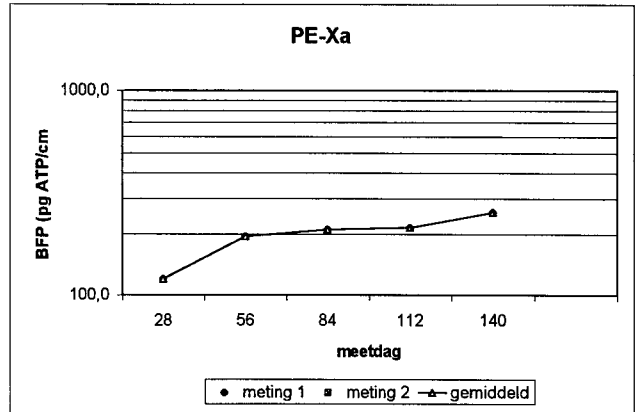
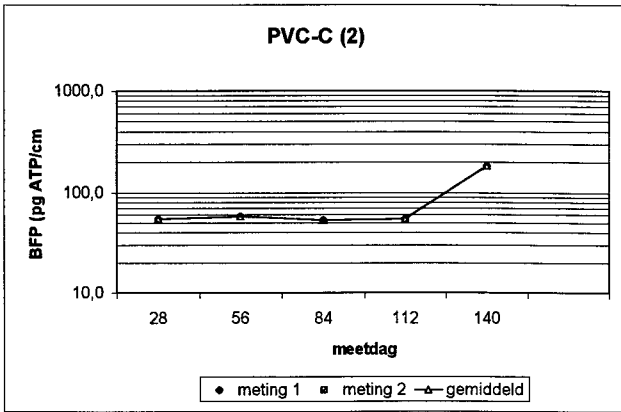
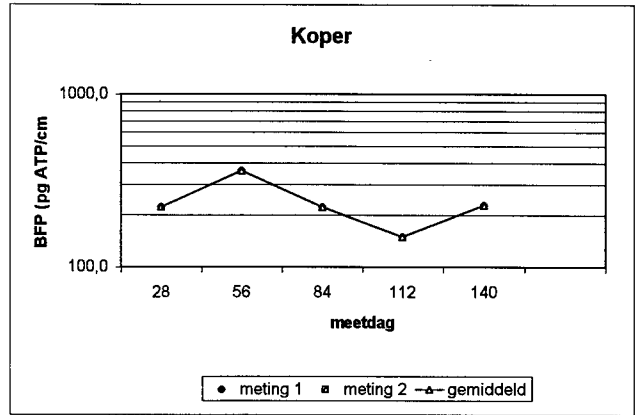
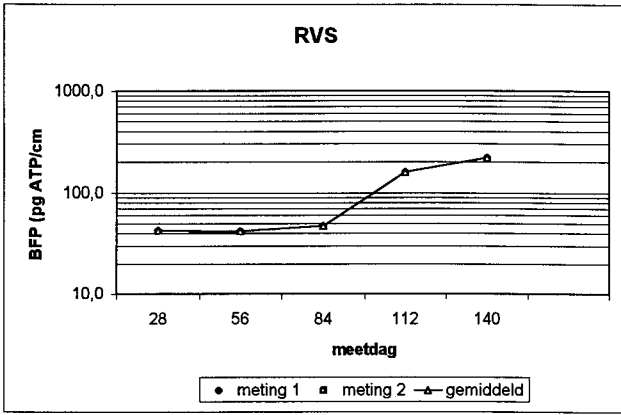




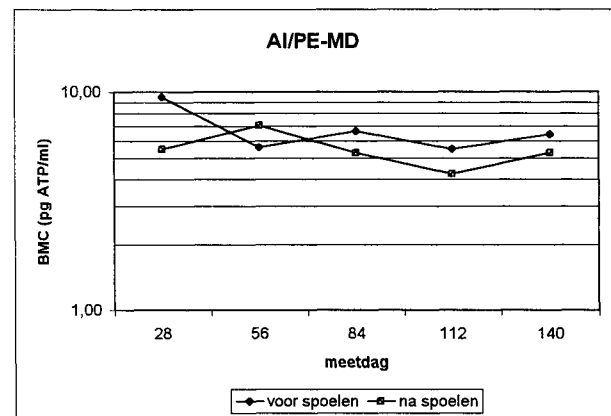
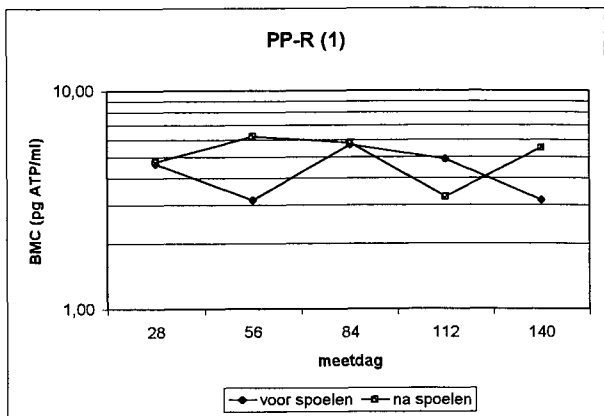
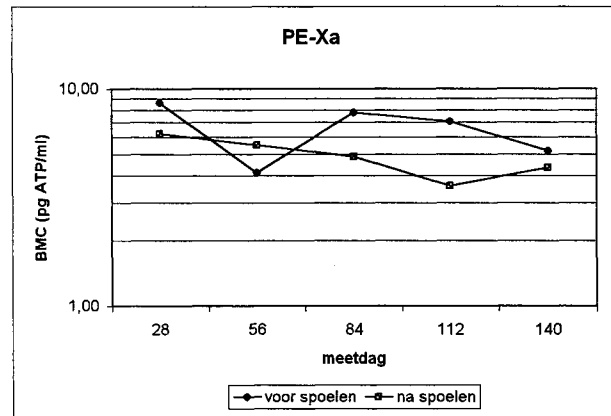
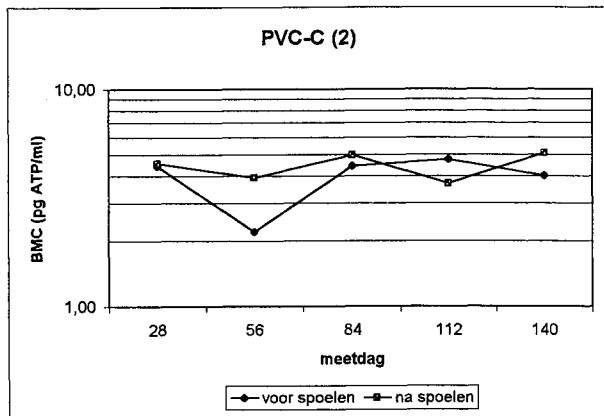
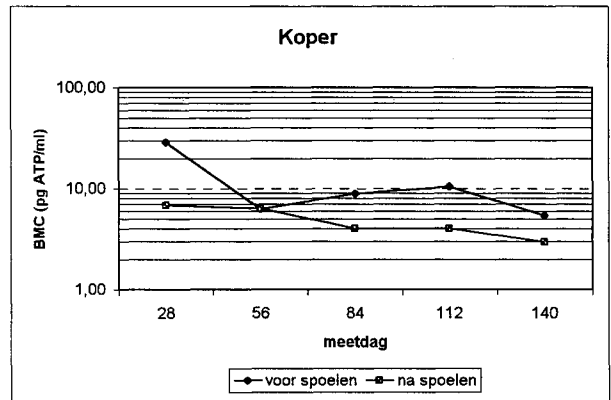
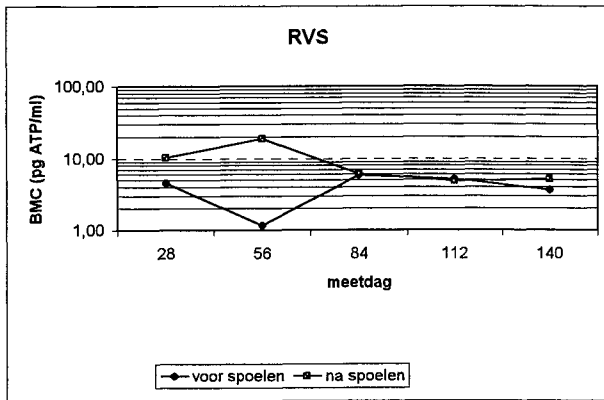




**BIJLAGE 7**  
**Biofilm op de binnenwand van de leidingen (ATP-gegevens)**

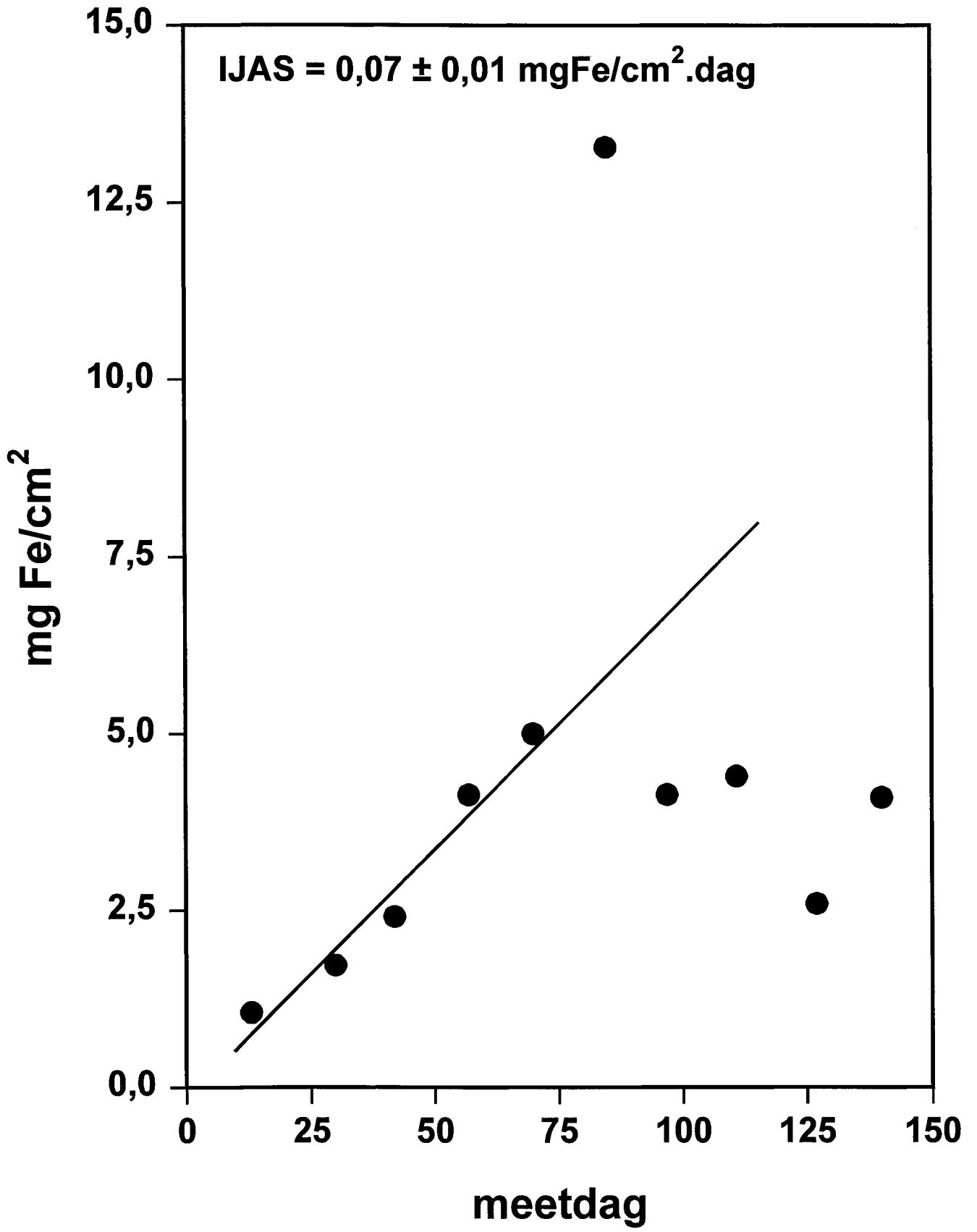


**BIJLAGE 8**  
**Meetwaarden waterkwaliteit (ATP-metingen)**

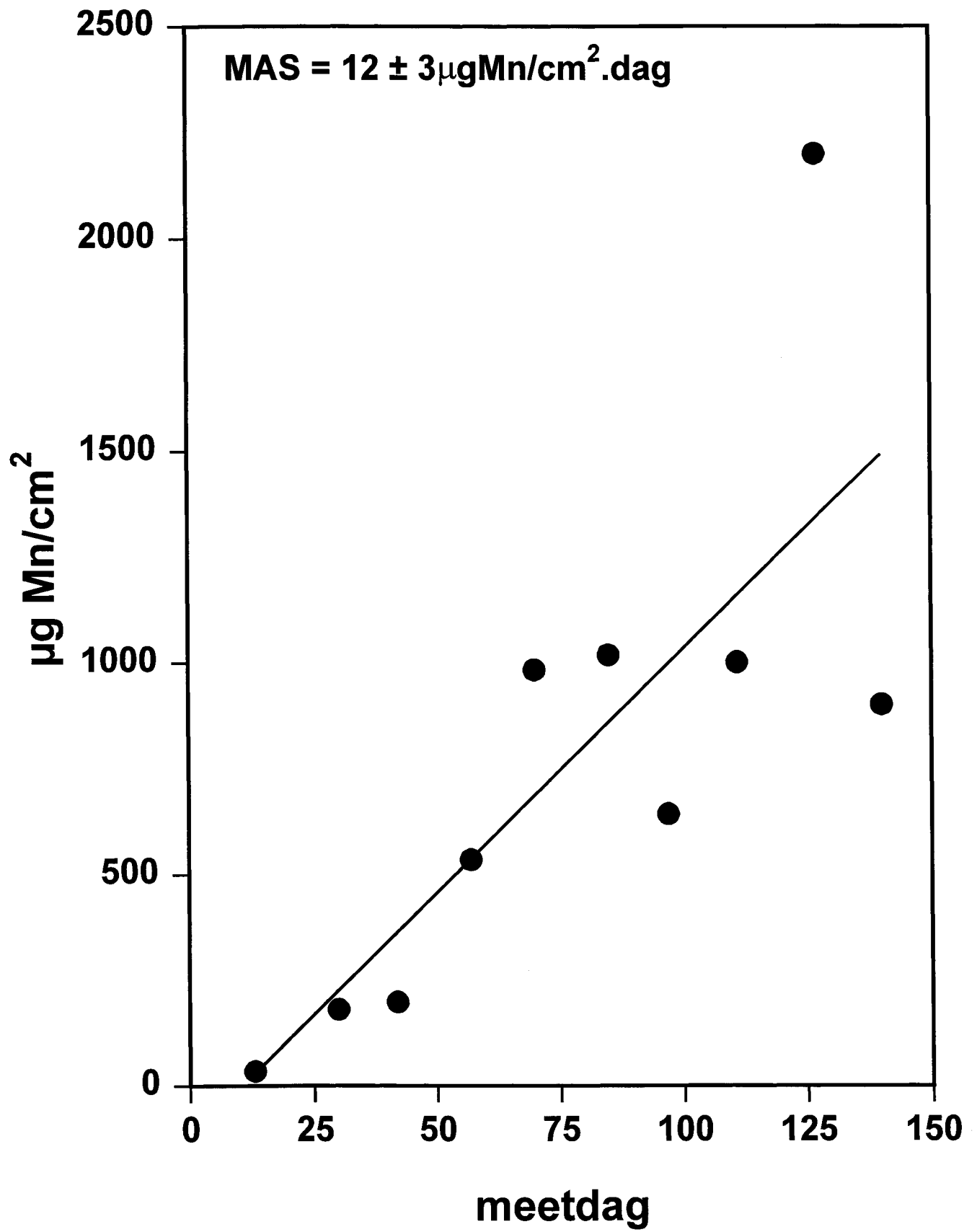


**BIJLAGE 9**  
**IJzerafzettingssnelheid van het water**





**BIJLAGE 10**  
**Mangaanafzettingssnelheid van het water**



**BIJLAGE 11**  
**Voorschrift voor het bepalen van de biofilmvormingspotentie (LMB-006)**

## **Bepaling van de Biofilmvormingspotentie van materialen die in aanraking komen met (drink)water**

nummer	versie	datum	bladzijde	autorisatieparaaf
LMB-006	2	7 januari 1999	1 van 11	

---

### **1 Onderwerp**

Dit voorschrift beschrijft de bepaling van de mate waarin biofilm wordt gevormd op materialen in testwater in aanwezigheid van de van nature in drinkwater voorkomende micro-organismen in combinatie met een rivierwaterent als gevolg van de afgifte van groeibevorderende verbindingen door de betreffende materialen.

### **2 Toepasbaarheid**

Dit voorschrift is van toepassing op alle soorten materialen met een vast oppervlak die in contact komen met drinkwater en die geen toxische verbindingen bevatten c.q. afgeven. Hieronder vallen primair de synthetische materialen en materialen die organische verbindingen bevatten die door micro-organismen kunnen worden benut. Ook kan de werkwijze worden toegepast op materialen die bij andere toepassingen in aanraking komen met water, bijv. met zwembadwater, (medische)apparatuur, verpakking van levensmiddelen.

Het doel van deze bepaling is het bepalen van het vermogen van materialen om de groei van micro-organismen te bevorderen.

### **3 Definities**

3.1 Biofilmdichtheid (BD): het ATP gehalte per cm<sup>2</sup> materiaal.

3.2 Biofilmvormingspotentie (BFP): de gemiddelde dichtheid actieve biomassa op het oppervlak van het materiaal, gemeten als adenosine trifosfaat (ATP) per cm<sup>2</sup> materiaal, na 8, 12 en 16 weken, in testwater onder gedefinieerde omstandigheden geïncubeerd.

3.3 Biomassaconcentratie (BMC): de gemiddelde hoeveelheid actieve micro-organismen, gemeten als adenosine trifosfaat (ATP), geproduceerd per cm<sup>2</sup> materiaal in testwater, na 8, 12 en 16 weken incubatie.

### **4 Beginsel**

Representatieve monsters van het te onderzoeken materiaal worden geplaatst in drinkwater waaraan bepaalde zouten en micro-organismen uit rivierwater

titel

## **Bepaling van de Biofilmvormingspotentie van materialen die in aanraking komen met (drink)water**

nummer	versie	datum	bladzijde
LMB-006	2	7 januari 1999	2 van 11

---

zijn toegevoegd. Deze monsters worden gedurende 16 weken geïncubeerd waarbij de vorming van een biofilm op het materiaal wordt gevolgd aan de hand van adenosine-5'-trifosfaat (ATP) metingen die worden uitgevoerd met stukjes materiaal die periodiek uit de kolven worden genomen. Tevens wordt, met dezelfde frequentie het ATP-gehalte in het testwater gemeten.

### **5 Veiligheid en milieu**

Het biologisch afval wordt gescheiden ingezameld en afgevoerd volgens KCB-005.

### **6 Controles**

Neem bij elke bepaling de volgende controles mee. Behandel de controles identiek aan de monsters.

#### **6.1 Procedureblanco**

De procedureblanco bestaat uit geënt testwater waaraan geen materialen zijn toegevoegd.

Het biomassaconcentratie moet kleiner zijn dan 15 ng ATP/l.

Tevens wordt, indien dit in de test gebruikt wordt, een procedureblanco uitgevoerd van RVS.

Het biofilmvormingspotentie van RVS moet kleiner zijn dan 150 pg ATP/cm<sup>2</sup>. De biomassaconcentratie moet kleiner zijn dan 20 ng ATP/l.

Voldoet de procedureblanco niet aan de genoemde criteria, dan dient de test herhaald te worden. Onderzoek de oorzaak van de overschrijding.

#### **6.2 Positieve controle**

De positieve controle bestaat uit siliconenslang.

Het biofilmvormingspotentie van siliconenslang moet groter zijn dan 10<sup>3</sup> pg ATP/cm<sup>2</sup>. De biomassaconcentratie moet groter zijn dan 50 ng ATP/l.

Indien de positieve blanco niet voldoet aan deze criteria, dan dient de test herhaald te worden. Onderzoek de oorzaak van de overschrijding.

#### **6.3 Negatieve controle**

De negatieve controle bestaat uit glas.

De biofilmvormingspotentie van glas moet kleiner zijn dan 50 pg ATP/cm<sup>2</sup>. De biomassaconcentratie van glas moet kleiner zijn dan 10 pg ATP/ml.

titel

## **Bepaling van de Biofilmvormingspotentie van materialen die in aanraking komen met (drink)water**

nummer	versie	datum	bladzijde
LMB-006	2	7 januari 1999	3 van 11

---

Indien de negatieve controle niet voldoet aan deze criteria, dan dient de test herhaald te worden. Onderzoek de oorzaak van de overschrijding.

### **7 Reagentia en hulpstoffen**

Gebruik alléén reagentia van analytische zuivere kwaliteit en gedemineraliseerd water.

#### **7.1 Kaliumdichromaat oplossing**

##### **7.1.1 Samenstelling**

$K_2Cr_2O_7$	100 g
$H_2SO_4$ (95-98%)	900 ml
demi-water	1000 ml

##### **7.1.2 Bereiding**

Los het kaliumdichromaat op in het demi-water.

Voeg het zwavelzuur toe aan de kaliumdichromaat oplossing, koel op ijs.

Voeg na koeling demiwater toe tot de kristallen opgelost zijn.

#### **7.2 Kaliumdiwaterstoffosfaat oplossing.**

##### **7.2.1 Samenstelling**

$KH_2PO_4$	0,2 g
water	100 ml

##### **7.2.2 Bereiding**

Los het kaliumdiwaterstoffosfaat op in het water in een AOC-vrije kolf (6.3.1) en autoclaveer (15 min,  $121^\circ C \pm 1^\circ C$ ) deze oplossing.

#### **7.3 Kaliumnitraat oplossing.**

##### **7.3.1 Samenstelling**

$KNO_3$	1 g
water	100 ml

##### **7.3.2 Bereiding**

Los het kaliumnitraat op in het water in een AOC-vrije kolf (8.3.1) en autoclaveer (15 min,  $121^\circ C \pm 1^\circ C$ ) deze oplossing.

#### **7.4 Verdunningsvloeistof.**

Verdunningen worden gemaakt in geautoclaveerd (15 min bij  $121^\circ C \pm 1^\circ C$ ) leidingwater van drinkwaterkwaliteit met een kopergehalte kleiner dan  $50\mu g/l$  en een pH tussen de 6,5 en 8,5.

## Kiwa-huisvoorschrift

titel

### **Bepaling van de Biofilmvormingspotentie van materialen die in aanraking komen met (drink)water**

nummer	versie	datum	bladzijde
LMB-006	2	7 januari 1999	4 van 11

---

#### 7.5 Testwater.

Drinkwater vrij van groei-remmende verbindingen (zoals vrij chloor) met een:

- kopergehalte < 50 µg/l,
- een pH tussen de 6,5 en 8,5,
- een hoge mate van bacteriologische stabiliteit, d.w.z. met een AOC-gehalte van <10 en een DOC-gehalte <2 mg/l.

*Noot: Langzaam zandfiltraat voldoet in het algemeen aan deze voorwaarden.*

#### 7.5.1 Samenstelling

testwater	600 ml
kaliumnitraatoplossing (7.1.3)	1,45 ml
kaliumdiwaterstoffosfaat oplossing (7.1.2)	0,55 ml

#### 7.5.2 Bereiding

Weeg lege AOC-kolven. Tap vervolgens, volgens LMB-018, ongeveer 600 ml testwater in de AOC-vrije kolven. Sluit de erlenmeyers met de glazen stoppen en breng ze naar het laboratorium, waar ze direct in behandeling genomen worden. Weeg de kolven vervolgens opnieuw en stel de inhoud gelijk aan 600 ml ± 20 ml.

Voeg daarna het kaliumnitraat en het kalium-diwaterstoffosfaat met behulp van AOC-vrije pipetten (8.3.2) aseptisch toe aan de kolven. Meet de pH van het testwater in water uit één van de kolven. Voldoet de pH niet aan de norm (pH 6,5-8,5), tap dan nieuw water.

#### 7.6 Entmateriaal.

##### 7.6.1 Samenstelling

Vers rivierwater	250 ml
------------------	--------

##### 7.6.2 Bereiding

Plaats een filterhouder met membraanfilter (8.3.5) op de vacuümpot en sluit deze aan op de vacuümpomp.

Plaats een potje van 250 ml in de vacuümpot onder de filterhouder en filtreer het rivierwater voor de verwijdering van protozoën.

Vang het filtraat op in het sterieflesje. Het entmateriaal is klaar voor gebruik.

#### 7.7 Stromend koud water, drinkwaterkwaliteit.



## **Bepaling van de Biofilmvormingspotentie van materialen die in aanraking komen met (drink)water**

nummer	versie	datum	bladzijde
LMB-006	2	7 januari 1999	5 van 11

---

### **8 Toestellen en hulpmiddelen**

#### **8.1 Toestellen**

De sterilisatie-, koel- en incubatietemperaturen worden vastgelegd volgens werkinstructie KLMB-004.

- 8.1.1 Oven voor droogsterilisatie van glaswerk bij 150-175°C.
- 8.1.2 Oven voor hittebehandeling van pipetten bij 250°C.
- 8.1.3 Oven bij 550° voor hittebehandeling van conische kolvens en roestvrij staal (RVS), dat gebruik wordt om materiaal eventueel te verzwaren.
- 8.1.4 Broedstoof ingesteld op 25°C ± 1°C.
- 8.1.6 Analytische balans met een nauwkeurigheid van 0,1 mg.
- 8.1.7 Balans met een nauwkeurigheid van 10 mg.
- 8.1.8 Vortexmixer
- 8.1.9 pH meter
- 8.1.10 Ultrasoon waterbad
- 8.1.11 ATP-meetapparatuur  
Vacuümpomp
- 8.1.12 Thermometer 0-30°C

#### **8.2 Steriel glaswerk**

Het glaswerk dient van een zodanige kwaliteit te zijn dat het bestand is tegen veelvuldig verhitten bij 250°C of 550°C. Borosilicaat- en Pyrexglas voldoen aan deze eis.

AOC-vrije-erlenmeyers, -pipetten en -verdunningsbuizen moeten worden gereinigd volgens 8.3.

- 8.2.1 Erlenmeyers van 1000 ml, met een inwendige halswijdte van 25mm, voorzien van een geslepen glazen stop.
- 8.2.2 Bekerglazen van 100 ml.
- 8.2.3 AOC-vrije glazen pipetten verdeeld in 0,01 ml.
- 8.2.4 Cultuurbuizen 16-18, 160 mm, steriel, met een autoclaveerbare dop.
- 8.2.5 Cultuurbuizen 21-24, 200 mm, steriel, met een autoclaveerbare dop.
- 8.2.6 Cilinderglas (h=45 cm, d=15 cm) met een glazen hevel.
- 8.2.7 Dispensor, autoclaveerbaar, voor volumes tot 10,0 ml.
- 8.2.8 Maatcilinder, 250 ml.
- 8.2.9 Glazen potjes, 250 ml.
- 8.2.10 Bekerglazen van 500 ml.

titel

## **Bepaling van de Biofilmvormingspotentie van materialen die in aanraking komen met (drink)water**

nummer	versie	datum	bladzijde
LMB-006	2	7 januari 1999	6 van 11

---

### 8.3 Reinigen van het glaswerk

#### 8.3.1 AOC-vrije kolven

Was de erlenmeyers in de wasmachine. Doe vervolgens een chroom-nikkel haakje tussen de hals en de fles. Steriliseer de flessen gedurende 4 uur bij  $550^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ .

#### 8.3.2 Pipetten

Zet glazen pipetten verticaal in een glazen maatcilinder met zwavelzuur-dichromaat oplossing. Plaats deze pipetten de volgende dag in de glazen cilinder met het hevel-systeem en was ze met drinkwater gedurende 4 uur. Laat het water uit de pipetten lopen, breng ze in stalen kokers en steriliseer gedurende 4 uur bij  $250^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Deze pipetten mogen beslist **GEEN** watterproppen bevatten!

#### 8.3.3 Verdunningsbuizen

Was cultuurbuizen in de rekjes in de wasmachine. Plaats de doppen op de buizen. Steriliseer de buizen gedurende 4 uur bij  $150^{\circ}\text{C}$ - $175^{\circ}\text{C}$ .

### 8.4 Hulpmiddelen

8.4.1 Stalen afsluitbare kokers, voor droogsterilisatie van pipetten.

8.4.2 Buizenrekjes, voor grote en kleine buizen.

8.4.3 Chroom-nikkel stalen haakjes ( $\phi 1,0$  mm, lengte 90 mm).

8.4.4 Pincetten, met afgeronde hoeken voor het opnemen van membraanfilters, materialen en chroom-nikkel stalen haakjes.

8.4.5 Membraanfilters, poriegrootte  $1,2 \mu\text{m}$ , diameter 47 mm.

8.4.6 Schuifmaat, nauwkeurigheid 0,01 cm.

8.4.7 Schaar, (stanley)mes en/of zaag en tangen voor het bewerken van de materialen, alles vetvrij.

8.4.8 Smeltend ijs.

8.4.9 Steriele pipetten van 10 ml.

Testmateriaal voor controles:

- Ringetjes van siliconen-slang met een oppervlakte van  $8 \text{ cm}^2$ .
- Glazen ringetjes ( $\phi 15\text{mm}$ ) met een oppervlakte van  $8 \text{ cm}^2$
- RVS ringetjes en draad ( $\phi 0,8$  mm) voor het verzwaren van de materialen. Beide van zware kwaliteit, DIN 125A.

Leg de ringetjes en stukjes draad in een glazen bakje en steriliseer deze vervolgens gedurende 4 uur bij  $550^{\circ}\text{C}$ .

Gebruik bij verdere behandeling van de ringetjes (het verzwaren van de materialen) schoongemaakte tangen.

Spoel de tangen vóór gebruik 3 x met petroleum ether, vervolgens 3 x met aceton en spoel ze vervolgens goed af onder stromend water. Droog daarna met een tissue.

## **Bepaling van de Biofilmvormingspotentie van materialen die in aanraking komen met (drink)water**

nummer	versie	datum	bladzijde
LMB-006	2	7 januari 1999	7 van 11

---

### **9 Te onderzoeken monster**

Voor transport van fabrikant naar laboratorium dienen de monsters dusdanig te worden verpakt dat geen contaminatie door stof, vet of olie kan optreden. Tevens moeten ze worden beschermd tegen de invloed van hitte, zonlicht en vluchtige chemicaliën. In het laboratorium kunnen ze in het donker bij kamertemperatuur worden bewaard; tenzij de fabrikant anders voorschrijft.

*Noot: Test geen met inkt of potlood beschreven monsters of monsters met lijmresten van labels. Zorg bij het hanteren van de monsters voor schone handen om contaminatie met huidvet te voorkomen. In geval de materialen gezaagd dienen te worden, dan mag dit niet m.b.v. olie of andere sfbreekbare verbindingen plaatsvinden.*

Per materiaal zijn 24 stukjes van ongeveer 8 cm<sup>2</sup> nodig. Test van tevoren of deze stukjes drijven. Is dit het geval dan worden deze stukjes per stuk verzwaard met behulp van roestvrij-stalen ringetjes en roestvrij-stalen draad.

### **10 Werkwijze**

Voer de testen uit in een ruimte, waarin de atmosfeer vrij is van vluchtige organische verbindingen, aangezien deze in dusdanige concentraties in het testwater kunnen oplossen dat zij een (sterke) bacteriegroei teweegbrengen, die de groei ten gevolge van het te onderzoeken monster maskeert.

#### **10.1 Beënting en incubatie**

Spoel de monsters op de dag dat de test wordt gestart gedurende 1 uur in een bekersglas van 500 ml met koud stromend drinkwater.

Voor elk monster worden twee kolven met testwater gebruikt (kolf A en kolf B).

Voeg aan elke kolf de stukjes materiaal toe. Ent ze vervolgens met 1 ml entmateriaal (7.6).

Zet bekersglasjes over de gesloten kolven om contaminatie door stof te voorkomen. Incubeer, zonder schudden, de kolven gedurende 16 weken in een broedstoof bij 25°C ± 1°C.

#### **10.2 Bepaling van de groei**

De biofilmdichtheid op het materiaal (fles A) en de biomassaconcentratie (fles B) wordt bepaald d.m.v. ATP-metingen.

titel

## **Bepaling van de Biofilmvormingspotentie van materialen die in aanraking komen met (drink)water**

nummer	versie	datum	bladzijde
LMB-006	2	7 januari 1999	8 van 11

---

### 10.2.1 Materiaalfase

Bepaal de biofilmdichtheid (BD, pg ATP/cm<sup>2</sup>) op het oppervlak van de materialen op dag 56, 84 en 112. Indien de projectleider dat wenst, kan ook op dag 7, 14 en 28 worden gemeten.

Neem hiervoor twee stukjes materiaal met een uitgegloeide en afgekoelde pincet uit het water van kolf A. Plaats elk stukje in een grote reageerbuis met 10 ml steriel leidingwater. Tril dit stukje gedurende 2 minuten in een ultrasoon trilwaterbad. Vul dit waterbad met demiwater zodat het waterniveau in de buis gelijk is aan het waterniveau in het waterbad. Pipetteer de 10 ml uit de buis, laat 9 ml weglopen en vang 1 ml op in een steriele reageerbuis. Plaats deze buis in smeltend ijs. Voeg opnieuw 10 ml steriel leidingwater toe aan het materiaal en herhaal de procedure. Controleer regelmatig de temperatuur van het trilwaterbad. Komt deze boven de 25°C, koel het water dan door toevoeging van ijs. Tril elk materiaal, m.u.v. glas en RVS, 6x. Tril glas en RVS 3 x. Van het verzamelde volume (6 of 3 ml) wordt het ATP-gehalte bepaald. Aan de hand daarvan kan de biofilmdichtheid op het materiaal berekend worden (11.1).

Meet de materialen en bereken de oppervlakte ervan.

### 10.3 Vloeistoffase

Bepaal groeicurves aan de hand van periodieke ATP metingen (T= 56, 84 en 112) aan het testwater van kolf B. Eventueel, op aanvraag van de projectleider, kan ook op dag 7, 14 en 28 gemeten worden.

Zwenk de kolven met de hand vlak vóór de monsterneming. Voorkom dat de glazen stoppen van de kolven hierbij nat worden. Droog zonodig de stop en hals van de kolf in een helder brandende gasvlam.

Gebruik voor de monsterneming uitsluitend AOC-vrije pipetten (8.3.2).

### 10.4 Additionele analyses (optioneel)

Gedurende de test en aan het eind van de testperiode, kunnen, indien de projectleider dat wenst, additionele analyses uitgevoerd worden. In tabel 1 is een opsomming gegeven van deze additionele analyses.

## Kiwa-huisvoorschrift

titel

### **Bepaling van de Biofilmvormingspotentie van materialen die in aanraking komen met (drink)water**

nummer  
LMB-006

versie  
2

datum  
7 januari 1999

bladzijde  
9 van 11

Parameter	Procedure	Volume
Bacteriën van de coligroep	LMB-028	100 ml
Koloniegetal bij 22°C	LMB-032	≤ 1 ml
Koloniegetal bij 37°C	LMB-032	≤ 1 ml
Koloniegetal bij 25°C op R <sub>2</sub> A-medium	LMB-014	≤ 1 ml
<i>Aeromonas</i> spp.	LMB-022	≤ 1 ml
<i>Legionella</i> spp.	LMB-027	≤ 1 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NEN 6573	≤ 1 ml
Totaal organisch koolstof		
pH	NEN 6411	

## **11 Identificering en kwantificering**

### **11.1 Berekening van het biofilmdichtheid (BD) per cm<sup>2</sup>**

Bereken de biofilmdichtheid op het materiaal m.b.v. de volgende formule:

$$BD = \frac{ATP_{\text{verzamelde volume}} \times \text{toegevoegde volume}}{\text{oppervlakte materiaal}}$$

### **11.2 Berekening van de biofilmvormingspotentie (BFP)**

Bereken de biofilmvormingspotentie m.b.v. de volgende formule:

$$BFP = \frac{BD_{\text{dag } 56} + BD_{\text{dag } 84} + BD_{\text{dag } 112}}{3}$$

Bereken tevens de standaarddeviatie.

### **11.3 Berekening van de biomassaconcentratie (BMC)**

Bereken de biomassaconcentratie m.b.v. de volgende formule:

## Kiwa-huisvoorschrift

titel

### **Bepaling van de Biofilmvormingspotentie van materialen die in aanraking komen met (drink)water**

nummer	versie	datum	bladzijde
LMB-006	2	7 januari 1999	10 van 11

---

$$BMC = \frac{ATP_{ml_{dag\ 56}} + ATP_{ml_{dag\ 84}} + ATP_{ml_{dag\ 112}}}{3}$$

Bereken tevens de standaarddeviatie.

## **12 Kengetallen**

Niet van toepassing

## **13 Verslag**

Vermeld in het verslag:

- de gegevens die noodzakelijk zijn voor het identificeren van het monster.
- de toegepaste methode; volgens LMB-006
- de gevonden hoeveelheid ATP op het materiaal in pg per cm<sup>2</sup> en in het water in pg per ml, in grafiekvorm.
- De biofilmvormingspotentie (BFP) en de biofilm-vormingsconcentratie (BMC) van het materiaal met de bijbehorende standaarddeviaties.
- alle resultaten van de eventueel uitgevoerde optionele analyses.
- de eventuele bijzonderheden, tijdens de behandeling waargenomen.
- alle niet in het voorschrift voorgeschreven handelingen die het resultaat hebben kunnen beïnvloeden.

## **14 Literatuur**

- 14.1 NEN 6271: Bacteriologisch onderzoek van water. Bepaling van het gehalte gemakkelijk Assimileerbaar Organisch Koolstof (AOC).
- 14.2 Van der Kooij, D. A. Visser and W.A.M. Hijnen 1982. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water J. Am. Water Works Assoc. 74: 540-545
- 14.3 Van der Kooij, D. 1992. Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. J. Am. Water Works Assoc. 84: 57-65
- 14.4 Van der Kooij, D., H.R. Veenendaal. 1992. Assesment of the biofilm formation characteristics of drinking water. Proceedings AWWA Water

## Kiwa-huisvoorschrift

titel

### **Bepaling van de Biofilmvormingspotentie van materialen die in aanraking komen met (drink)water**

nummer	versie	datum	bladzijde
LMB-006	2	7 januari 1999	11 van 11

---

Quality Technolgy Conference, Toronto, Canada. November 15-19; pp 1099-1110

14.5 Van der Kooij, D., J.S. Vrouwenvelder, H.R. Veenendaal and M.J.C. van Raalte-Drewes. 1994. Multiplication of aeromonads in ground-water supplies in relation with the biofilm formation characteristics of drinking water. Proceedings AWWA Water Quality Technology Conference, November 6-11, San Francisco, California

14.6 Van der Kooij, D., H.R. Veenendaal. 1993. Assesment of the biofilm formation potential of synthetic materials in contact with drinking water during distribution. Proceedings AWWA Water Quality Technology Conference, Miami, Florida, November 7-11, pp 1395-1407

## **15 Opmerkingen**

geen

## **16 Bijlagen**

16.1 Bijlage 1: Informatieblad.

16.2 Bijlage 2: Meetresultatenblad ATP-meting.

16.3 Bijlage 3: Meetresultatenblad opp. berekening.

16.4 Bijlage 4: Meetresultatenblad ATP-berekening monsters.

**BIJLAGE 12**  
**Waterkwaliteit Pompstation Tull en 't Waal (1992)**



Waterleidingbedrijf : WMN			jaar	Meetpunt: 029-05 A01				
Pompstation	: 029B05 TULL EN 'T WAAL		1992					
Laboratorium	: WMN							
Contactpersoon	: drs.F.A.Jutte					Rein		
KIWA Wb.	Naam parameter	Meeteenheid	gem.	min.	max.	gem.	min.	max.
120	8	Temperatuur	°C			13	12	13
122	12	Zuurstof, opgelost	mg/l O2			5.3	4.5	7.1
126	2	Troebelingsgraad	FTE			0.16	0.10	0.55
128	3	Gesuspendeerde stoffen	mg/l					
140	65	Totaal beschikbaar chloor	mg/l Cl2					
141	65	Vrij beschikbaar chloor	mg/l Cl2					
160	64	Totaal beta-radioactiviteit	Bq/l					
162	64	Rest beta-radioakt.(tot.-K40)	Bq/l					
164	63	Tritium	Bq/l					
170	6	Geurverduunningsfactor						
172	7	Smaakverduunningsfactor				1.0	1.0	1.0
174	7	Geur, kwalitatief						
176	7	Smaak, kwalitatief						
180	9	Zuurgraad	pH			7.7	7.6	7.9
182		Evenwichts-pH	pHs					
200	5	EGV (elek.geleid.verm., 20 °C)	mS/m			38.8	38.3	39.6
202	4	Droogrest, 105 °C	mg/l					
220	21	Koolstofdioxide	mg/l CO2			8.3	6.0	9.2
222	21	Waterstofcarbonaat	mg/l HCO3			265	260	270
230	27	Chloride	mg/l Cl			9.4	9.1	9.6
232	22	Sulfaat	mg/l SO4			< 2.0	< 2.0	< 2.0
240	28	Natrium	mg/l Na			12.5	11.7	12.8
242	29	Kalium	mg/l K			1.05	0.71	1.18
244	30	Calcium	mg/l Ca			71.9	71.1	72.7
246	31	Magnesium	mg/l Mg			5.89	5.81	5.98
250		Totale hardheid	mmol/l			2.04	2.01	2.06
270	18	Ammonium	mg/l N			< 0.02	< 0.02	0.02
274		Stikstof, Kjeldahl	mg/l N					
276	17	Org. gebonden stikstof	mg/l N			< 0.005	< 0.005	0.005
280	19	Nitriet	mg/l N					
282	20	Nitraat	mg/l N			0.14	0.12	0.15
284	23a	Orthofosfaat	mg/l P			0.027	< 0.005	0.038
286	23	Totaal fosfaat	mg/l P					
288	24	Silicaat	mg/l Si			8.6	8.5	8.6
300	37	IJzer	mg/l Fe			0.04	0.02	0.10
304	36	Mangaan	mg/l Mn			< 0.01	< 0.01	0.02
310	32	Aluminium	µg/l Al					
312	43	Antimoon	µg/l Sb					

