

BTO 2018.032 | September 2018

BTO rapport

Invloed van
leidingmateriaal op de
uitwisseling van
bacteriën tussen biofilm
en water

BTO

Involed van leidingmateriaal op de uitwisseling van bacteriën tussen biofilm en water

BTO 2018.032 | September 2018

Opdrachtnummer

401028 & 400554-184

Projectmanager

Michiel Hootsmans

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische activiteit

Kwaliteitsborger

Paul van der Wielen

Auteur

Kimberly Learbuch

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is na één jaar openbaar.

Jaar van publicatie
2018

Meer informatie

K.L.G. (Kimberly) Learbuch

T 030 60 69 599

E Kimberly.Learbuch@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511

F +31 (0)30 60 61 165

E info@kwrwater.nl

I www.kwrwater.nl

The logo for KWR (Watercycle Research Institute) features the letters 'KWR' in a bold, blue, sans-serif font. The 'K' and 'W' are connected, and the 'R' is slightly separated.

Watercycle
Research
Institute

BTO 2018.032 | Maart 2018 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

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

Keywords

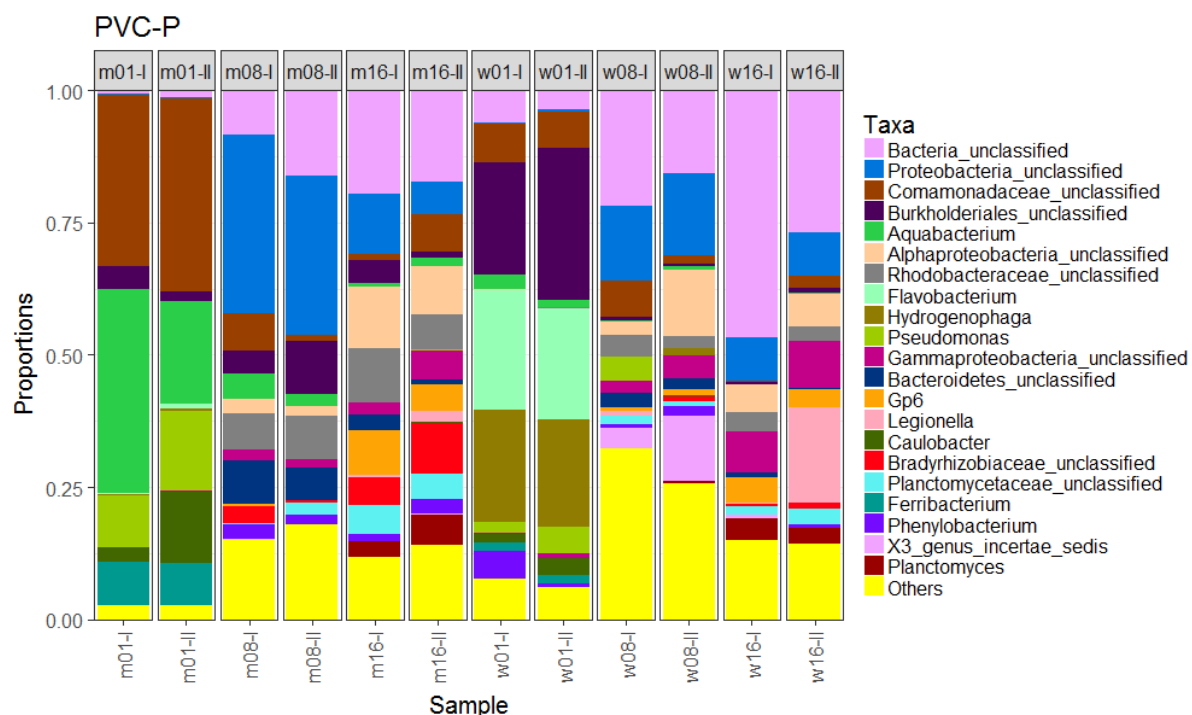
Biologische activiteit

BTO Managementsamenvatting

Leidingmateriaal beïnvloedt populatiesamenstelling van micro-organismen tussen waterfase en biofilm

Auteur Kimberly Learbuch, Msc.

Verschillen in leidingmaterialen leiden tot verschillende samenstellingen in bacteriepopulaties in water en biofilm. Dit blijkt uit een studie waarin vijf verschillende leidingmaterialen zijn geanalyseerd met de Biomassa Productie Potentie (BPP)-test. Van water- en biofilmmonsters zijn de ATP-concentraties bepaald, KG25-aantallen, specifieke qPCR genkopieën en de bacteriële populatie (met *next generation sequencing* NGS). Kennis over de biofilm op de buiswand en op sediment in het distributiesysteem is belangrijk voor het waarborgen van de microbiologische waterkwaliteit aan de tap, omdat de waterkwaliteit wordt beïnvloed door de mate van nagroei. Aanwijzingen voor uitwisseling tussen waterfase en biofilm aanwezig, maar cijfers ontbreken i.v.m. missende waarden voor validatie van het model.



Meest voorkomende bacteriën in monsters van PVC-P leidingmateriaal in water (w) en biofilm (m), in kolven I en II gedurende weken 1, 8 en 16.

Belang: effect uitwisseling tussen biofilm en water op nagroei en invloed leidingmateriaal achterhalen
Voor waterbedrijven is het belangrijk te weten of opportunistische pathogenen en wettelijke parameters voor nagroei in het drinkwater voorkomen. De mate van nagroei kan invloed hebben op de microbiologische waterkwaliteit aan

de tap. Biomassa in het distributiesysteem is voornamelijk aanwezig in de biofilm op de buiswand en sediment, waardoor uitwisseling tussen biofilm en water een belangrijke rol kan spelen in de microbiologische waterkwaliteit. Het is echter onduidelijk wat de mate van uitwisseling is van micro-organismen tussen de waterfase en de

biofilm en wat het effect van leidingmaterialen hierop is. Deze studie heeft als doel meer zicht hierop te krijgen.

Aanpak: analyse verschillende leidingmaterialen in statische test en praktijk

In Leeuwarden zijn met de Biomassa Productie Potentie (BPP)-test de volgende leidingmaterialen geanalyseerd: koper, PE-Xb, PE-Xc, PVC-C en PE-100. Van de water- en biofilmmonsters zijn de ATP-concentraties bepaald, evenals KG25-aantallen, specifieke qPCR genkopieën (*Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., Schimmel, *Aspergillus fumigatus* en *Vermamoeba vermiformis*) en de samenstelling van de bacteriële populatie (met NGS). Daarnaast zijn in de praktijksituatie 'de Bloemendalerpolder' watermonsters genomen. Ook zijn hier PVC-U en PE-100 leidinguitnames uitgevoerd.

Resultaten: populatiesamenstelling micro-organismen verschilt per leidingmateriaal

Het verschil tussen de verdeling tussen de waterfase en biofilm komt overeen met de BPP-waarden. Hoe hoger de waarde, hoe groter het aandeel in de biofilm. In het geval van de hier geteste leidingmaterialen PVC-P, PE-Xc en PVC-C viel de BPP-waarde hoog uit. Percentueel bevinden de meeste aantallen (*Legionella* spp.,

Mycobacterium spp., *Pseudomonas* spp. en *Aeromonas* spp. 16S rRNA genkopieën) zich in het water. De genkopieën van schimmels en *Vermamoeba vermiformis* zijn vooral aanwezig in de biofilm. Het materiaaltype lijkt dus geen invloed te hebben op de relatieve verdeling van deze micro-organismen over water en biofilm. Wel werden met NGS voor verschillende materialen door de tijd heen verschillen in populatiesamenstelling aangetoond tussen water en biofilm. Vier biofilmmonsters uit de praktijksituatie Bloemendalerpolder wezen op verschillend samengestelde bacteriepopulaties, ook wanneer het ging om overeenkomstige materialen of locaties.

Implementatie: aanvullende meetmomenten nodig om uitwisselingsmodel te valideren

Ondanks aanwijzingen voor uitwisseling tussen waterfase en biofilm is berekening van percentages voor afzonderlijke micro-organismen met het gebruikte model nog niet mogelijk. Herhaling van het experiment met aanvullende meetmomenten zorgt voor validatie.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Invloed van leidingmateriaal op de uitwisseling van bacteriën tussen biofilm en water* (BTO 2018.032).

Samenvatting

De microbiologische waterkwaliteit aan de tap wordt onder andere beïnvloed door de mate van nagroei in het drinkwaterdistributiesysteem. Biomassa in het distributiesysteem is voornamelijk aanwezig in de biofilm op de buiswand en sediment, waardoor uitwisseling tussen biofilm en water een belangrijke rol kan spelen in de microbiologische waterkwaliteit. Het is echter onduidelijk wat de mate van uitwisseling is van micro-organismen tussen de waterfase en de biofilm en wat het effect van leidingmaterialen hierop is. Er is altijd aangenomen dat de uitwisseling van bacteriën tussen biofilm en waterfase dusdanig groot is, dat de microbiële populatie in het drinkwater aan de tap grotendeels bestaat uit bacteriën uit de biofilm. Echter recent onderzoek heeft aangetoond dat de dominante bacteriepopulatie in het drinkwater aan de tap vergelijkbaar is met de bacteriepopulatie af pompstation. Hieruit volgt de vraag in hoeverre heeft biofilmvorming in het distributiesysteem een negatieve invloed op de microbiologische waterkwaliteit aan de tap. Dergelijke informatie is van belang voor drinkwaterbedrijven omdat deze uitwisseling, voor een deel, bepaald of opportunistische pathogenen (bv *Pseudomonas aeruginosa*) en wettelijke parameters voor nagroei (KG22, *Aeromonas* en *Legionella*) in het drinkwater voorkomen. Deze informatie kan bruikbaar zijn om aan te geven in hoeverre microbiologische waterkwaliteitsparameters gemeten aan de tap afhankelijk zijn van de biofilmconcentratie en - samenstelling in het distributiesysteem (en de binnenhuisinstallatie). Zo wordt het bijvoorbeeld mogelijk om op een gerichtere manier, te proberen, om de microbiologische waterkwaliteit op probleemlocaties te verbeteren. Doordat duidelijk wordt of beheersmaatregelen zich op de waterfase, de biofilm fase of beide moet richten. In dit onderzoek is daarom de verdeling van de microbiologie over de biofilm- en waterfase bepaald voor vijf verschillende materialen (koper, PE-Xb, PE-Xc, PVC-C en PE-100). Daarvoor zijn deze materialen geanalyseerd met de biomassa productie potentie (BPP)-test in Leeuwarden. Van de water en biofilm monsters zijn de ATP concentraties bepaald, KG25 aantallen, specifieke qPCR's genkopieën en de bacteriële populatie (NGS). Voor de meeste materialen geldt dat het grootste gedeelte van de biomassa (ATP) zich in de biofilm bevindt. Het verschil tussen de verdeling tussen de waterfase en biofilm komt overeen met de BPP-waarden. Wanneer de BPP-waarde van het materiaal hoger is (PVC-P, PE-Xc en PVC-C) dan is het aandeel in de biofilm ook hoger, terwijl wanneer de BPP zeer laag is (glas) dan is het aandeel in de biofilm ook kleiner. PVC-P heeft de hoogste BPP-waarde, en dus de meeste voedingsstoffen aan het oppervlakte van het materiaal. Deze stoffen zijn blijkbaar ook goed te gebruiken door bacteriën die worden bepaald met KG25, aangezien de KG25-aantallen in de biofilm van PVC-P het hoogst waren. De materialen PE-Xc en PE-100 hebben een duidelijk lagere BPP-waarde dan PVC-P, maar de BPP-waarde en ATP-concentraties in de biofilm bij deze materialen is wel hoger dan voor glas, koper of PVC-C. De hogere BPP-waarden van de PE-materialen resulteerde echter niet in hogere KG25 aantallen. Dus stoffen die vrijkomen bij PE-Xc en PE-100 aan het oppervlakte lijken minder goed afbreekbaar door bacteriën die worden gemeten met KG25. De percentuele verdeling van het aantal *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp. en *Aeromonas* spp. 16S rRNA genkopieën over de twee verschillende matrices water en biofilm die zich heeft gevormd op verschillende materialen in de BPP-test, laat percentueel zien dat de meeste bacteriën zich in het water bevinden. Het materiaaltipe lijkt dus geen invloed te hebben op de relatieve verdeling van deze bacteriegroepen over water en biofilm. De percentuele verdeling van het aantal schimmels en *Vermamoeba vermiformis* 18S rRNA genkopieën over de twee verschillende matrices water en biofilm die zich heeft gevormd op verschillende materialen in de BPP-test,

laat percentueel zien dat de meeste schimmels en *Vermamoeba vermiformis* zich in de biofilm bevinden. Het materiaaltype lijkt dus geen invloed te hebben op de relatieve verdeling van deze micro-organismen over water en biofilm. De NGS resultaten van de materialentest laten variatie van de populatiesamenstelling tussen water en biofilm op een bepaald materiaal, in de tijd en tussen de verschillende materialen. De bacteriële populatie van week 1 verschilt veel t.o.v. week 8 en 16. Week 8 en 16 laten veel overeenkomsten zien, dus de bacterie populatie is relatief stabiel geworden tussen van 8 tot 16 weken.

Er was geen gestandaardiseerde manier beschikbaar voor het kijken naar uitwisseling van micro-organismen tussen de waterfase en biofilm. Het model dat is opgesteld bleek niet toe te kunnen worden gepast omdat er meer controlemonsters mee hadden moeten worden meegenomen (zoals dag 0 en ATP concentraties iedere week), en zo de uitwisseling van micro-organismen tussen biofilm en waterfase te kunnen kwantificeren. In de huidige berekeningen met het model worden er teveel aannames gedaan, waardoor geen betrouwbare resultaten worden verkregen.

De resultaten van de praktijkmonsters van de Bloemendalerpolder laten zien dat de samenstelling van de bacteriepopulatie in de biofilm tussen de vier biofilmmonsters verschillen, waarbij ook verschillen worden waargenomen tussen dezelfde materialen of dezelfde locatie. Een vergelijking van de resultaten van de materialentest en de Bloemendalerpolder laat zien dat in de praktijksituatie andere bacteriegroepen dominant zijn op PE-10 of PVC-U dan in de materialentest en dat in de materialentest bepaalde bacteriegroepen dominant zijn in de biofilm en opzichte van water, terwijl in de praktijksituatie dit andersom is.

Concluderend zijn er aanwijzingen voor uitwisseling tussen waterfase en biofilm, maar cijfers ontbreken i.v.m. missende waarden voor validatie van het model. Daarom is het belangrijk om de materialentest opnieuw uit te voeren, met de juiste controles, eventueel gebruik makend van gelabelde bacteriën.

Inhoud

Samenvatting	1	
Inhoud	3	
1	Introductie	5
1.1	Aanleiding	5
1.2	Micro-organismen in drinkwaterbiofilms en water	5
1.3	Doel van de studie	7
2	Materiaal en methoden	8
2.1	Materialentest	8
2.2	Leidinguitname Bloemendalerpolder	9
2.3	Biofilmbemonstering	10
2.4	Analyses	11
3	Materialentest resultaten	13
3.1	ATP	13
3.2	KG 25	15
3.3	Deel 3	17
3.4	Relatie tussen ATP en KG25	18
3.5	<i>Legionella</i> spp.	19
3.6	<i>Mycobacterium</i> spp.	21
3.7	<i>Pseudomonas</i> spp.	23
3.8	<i>Aeromonas</i> spp.	25
3.9	Schimmel totaal	27
3.10	<i>Aspergillus fumigatus</i>	29
3.11	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	30
3.12	NGS	32
4	Praktijkmonsters resultaten	42
4.1	Bloemendalerpolder	42
4.2	Watermonsters	42
4.3	Biofilmmonsters	47
4.4	qPCR	47
4.5	NGS	49
5	Discussie	52
5.1	Materialentest	52
5.2	Praktijkmonsters Bloemendalerpolder	60
6	Conclusies en aanbevelingen	62
6.1	Conclusies	62
6.2	Aanbevelingen	63
7	Referenties	64

Bijlage I Leidinguitname protocol

67

1 Introductie

1.1 Aanleiding

De microbiologische waterkwaliteit aan de tap wordt onder andere beïnvloed door de mate van nagroei in het drinkwaterdistributiesysteem. De nagroei in het drinkwaterdistributiesysteem vindt voornamelijk plaats in biofilms die zich ontwikkelen op het sediment en de buiswand. Door uitwisseling van micro-organismen tussen biofilm en de waterfase beïnvloedt biofilmvorming in het distributiesysteem ook de drinkwaterkwaliteit aan de tap van de consument. Het is echter onduidelijk wat de mate van uitwisseling is van micro-organismen tussen de waterfase en de biofilm en wat het effect van leidingmaterialen hierop is.

In het verleden is aangenomen dat de uitwisseling van bacteriën tussen biofilm en waterfase dusdanig groot is, dat de microbiële populatie in het drinkwater aan de tap grotendeels bestaan uit bacteriën uit de biofilm. Recent onderzoek bij een groot aantal productielocaties in Nederland heeft echter aangetoond dat de samenstelling van de dominante bacteriepopulatie in het drinkwater aan de tap niet substantieel verschilt van de samenstelling van de bacteriepopulatie af pompstation (Roeselers et al., 2015). Door deze waarneming is de vraag “in hoeverre heeft biofilmvorming in het distributiesysteem een negatieve invloed op de microbiologische waterkwaliteit aan de tap?” relevant geworden. Dergelijke informatie is van belang voor drinkwaterbedrijven omdat deze uitwisseling, voor een deel, bepaalt of bijvoorbeeld opportunistische pathogenen (bv *Legionella pneumophila*) en wettelijke parameters voor nagroei (KG22, *Aeromonas* en *Legionella*) in het drinkwater voorkomen, aangezien deze organismen vaak hun niche hebben in de biofilm op sediment of de buiswand. Informatie over uitwisseling van micro-organismen tussen biofilm en water kan ook bruikbaar zijn om aan te geven in hoeverre microbiologische waterkwaliteitsparameters gemeten aan de tap afhankelijk zijn van de biofilmconcentratie en – samenstelling in het distributiesysteem (en de binnenhuisinstallatie). Zo wordt het bijvoorbeeld mogelijk om op een gerichtere manier te proberen om de microbiologische waterkwaliteit op probleemlocaties te verbeteren, doordat duidelijk wordt of beheersmaatregelen zich op de waterfase, de biofilmfase of beide moet richten.

1.2 Micro-organismen in drinkwaterbiofilms en water

Onderzoek in het verleden heeft laten zien dat verschillende groepen van micro-organismen meer dominant aanwezig zijn in biofilms, drinkwater of beide niches (van der Wielen & van der Kooij, 2009, Liu et al., 2014, van der Wielen & Lut, 2016, lopend BTO-onderzoek). Deze groepen worden hieronder kort besproken.

1.2.1 *Legionella* spp.

Bacteriën die behoren tot het genus *Legionella* zijn staafvormig van 0,3-0,9 x 2-20 µm of groter. Er worden geen endosporen of microcysts gevormd en ze zijn niet ingekapseld. Ze bewegen zich voort met één, twee of meer rechte of gebogen flagellen. Stammen die zich niet kunnen voortbewegen, worden af en toe waargenomen. Ze zijn aeroob en chemo-organotroof, en maken gebruik van aminozuren als koolstof en energiebron. Sommige soorten, waarbij *Legionella pneumophila* de gevaarlijkste is, zijn pathogeen voor mensen en veroorzaken een levensbedreigende longontsteking (Legionellose) (Bergey, 2000). Een aantal legionellasoorten, waaronder *L. pneumophila*, is alleen in staat zich te vermeerderen in protozoa in het drinkwaterdistributiesysteem (Kuiper et al., 2006?).

1.2.2 *Mycobacterium* spp.

De mycobacteriën behorend tot het genus *Mycobacterium* zijn rechte of licht gebogen staven van 0,2-0,7 x 1-10 µm, ze kunnen vertakkingen hebben. Ze zijn niet mobiel, vormen geen sporen en zijn onder te verdelen in twee groepen; snelgroeiend en langzaam groeiend (Madigan et al., 1997). Ze zijn aeroob en chemoorganotroof (Bergey, 2000). Ze hebben een hydrofobe, waxachtige en ondoordringbare celwand (Selvaraju et al., 2005). Doordat ze een hoog lipide gehalte in de celwand hebben, zijn ze hydrofoob en dit zorgt er voor dat ze makkelijk aan hydrofobe oppervlaktes blijven plakken. Mycobacteriën zijn, naast normale replicatie, ook in staat om zich te vermeerderen in vrij-levende amoëbe (Torvinen et al., 2007).

1.2.3 *Pseudomonas* spp.

Bacteriën behorend tot het geslacht *Pseudomonas* zijn recht of licht gebogen staven, maar ze hebben niet de vorm van een helix, van 0,5-1 x 1,5-5 µm. Vrijwel alle *Pseudomonas*-soorten bewegen zich voort door één of diverse polaire flagella. Ze zijn aeroob en chemoorganotroof, sommige soorten zijn facultatief lithotroof (ze kunnen H₂ of CO gebruiken als energiebron). Sommige soorten zijn (opportunistisch) pathogeen voor mensen, dieren of planten (Bergey, 2000; Madigan et al., 1997). Het bekendste voorbeeld van een humaanpathogene *Pseudomonas*-soort die ook in drinkwater aanwezig kan zijn is *P. aeruginosa* (van der Wielen & van der Kooij, 2009).

1.2.4 *Aeromonas* spp.

Bacteriën behorend tot het geslacht *Aeromonas* zijn recht staven van 0,3-1 x 1-3,5 µm. De meeste soorten bewegen zich voort met een enkele polaire flagella. Ze zijn chemoorganotroof. Er is aangetoond dat *Aeromonas* spp. wondinfecties kan veroorzaken, maar de incidentie daarvan is laag in Nederland. Drinkwater lijkt geen rol te spelen in de epidemiologie van ziekteverwekkende *Aeromonas*-stammen (Havelaar et al., 1992). *Aeromonas* spp. is in staat te groeien in drinkwater en wordt regelmatig aangetroffen in het Nederlands drinkwater. Groei van *Aeromonas* spp. lijkt voornamelijk voor te komen op oppervlaktes met biofilms, detritus en/of sediment (van der Wielen et al., 2009). *Aeromonas* spp. is een wettelijke paramater die in het drinkwaterbesluit is opgenomen, de wettelijke eis is <1000 KVE 100 ml⁻¹.

1.2.5 Schimmel totaal

Schimmels bevatten celwanden (in tegenstelling tot protozoa) en produceren sporen. De habitats van schimmels zijn zeer divers. Sommige schimmels zijn aquatisch, en kunnen in zoetwater leven. De meeste schimmels, echter, komen op land voor. Ze leven in de grond of dood plant materiaal en spelen een cruciale rol in de mineralisatie van koolstof (Madigan et al., 1997).

Enkele schimmelsoorten veroorzaken in Nederland infecties en kunnen groeien in (drink) water gerelateerde milieus (voornamelijk *Aspergillus fumigatus*, zie paragraaf 1.2.6) (van der Wielen & van der Kooij, 2011). Schimmels zijn in Nederlands drinkwater aangetroffen (van der Wielen & van der Kooij, 2009).

1.2.6 *Aspergillus fumigatus*

Diverse studies hebben humaanpathogene schimmelsoorten geïdentificeerd in drinkwatersystemen, waarbij *A. fumigatus* de meest belangrijke lijkt te zijn (Anaissie & Costa, 2001). *A. fumigatus* werd in 1985 al aangetoond in waterdistributiesystemen (Warris et al., 2003). *A. fumigatus* is een opportunistische pathogeen, en verantwoordelijk voor

bijvoorbeeld longziekte in mensen met een verzwakt immuunsysteem (Aspergillosis). *A. fumigatus* vormt veel sporen, het organisme wordt gekarakteriseerd door groene conidiën bedekt met stekels, is 2,5-3 µm in diameter (Latge, 1999). *A. fumigatus* tolereert hogere temperaturen dan andere schimmelsoorten, de optimum groeitemperatuur is 37°C, maar *A. fumigatus* kan ook overleven bij temperaturen van 50°C (Samson et al. 2014).

1.2.7 Vermamoeba (voorheen Hartmanella) vermiformis

Vermamoeba vermiformis (4-33 µm afhankelijk van de levensvorm) is een vrijlevende protozo en behoort tot de amoeben. *V. vermiformis* kan zich voortbewegen met een schijnvoetje over de biofilm, met dit schijnvoetje kan *V. vermiformis* zich ook voeden. Hierdoor is *V. vermiformis* voornamelijk geassocieerd met biofilm. *V. vermiformis* kan dienen als gastheer voor *Legionella pneumophila*. Protozoa zijn eencellige dierlijke organismen, zonder celwand, die binnen het domein van de eukaryoten vallen. Ze zijn over het algemeen kleurloos en beweeglijk. Eukaryoten, zoals protozoa, schimmels en planten, hebben het genomisch DNA opgeslagen in een celkern. Dit in tegenstelling tot de bacteriën, waarbij het genomisch DNA los in de cel ligt opgeslagen (Madigan et al. , 1997).

1.3 Doel van de studie

Het doel van deze studie is om het effect van leidingmaterialen op de uitwisseling van micro-organismen tussen waterfase en biofilm te bepalen.

2 Materiaal en methoden

2.1 Materialentest

Voor de bepaling van de biomassaproductie (BPP) van materialen heeft KWR een werkwijze gestandaardiseerd, die ook Europees is overgenomen (NEN-EN 16421). Binnen het in dit rapport beschreven project zijn vijf materialen (koper, PE-Xb, PE-Xc, PVC-C en PE-100), een negatieve controle (glas) en een positieve controle (PVC-P) volgens dit protocol getest (zie tabel 1 voor een overzicht van de materialen). Volgens dit protocol zijn de materialen in stukken met de juiste oppervlakte (25 cm²) gesneden en zes stukken (totaal oppervlakte 150 cm²) toegevoegd aan flessen met 900 ml drinkwater (Figuur 1). Het drinkwater is getapt bij Wetsus in Leeuwarden, dat drinkwater ontvangt van productielocaties Spannenburg en Noordbergum. De flessen zijn vervolgens geïncubeerd bij 25°C en wekelijks ververs met drinkwater van Wetsus. Na 1, 2, 4, 8, 12 en 16 weken zijn vervolgens materiaalstukjes en water onderzocht op ATP, KG25 en gefiltreerd voor DNA-analyses. De biomassaproductiepotentie (BPP) van de materialen is berekend zoals beschreven in NEN-EN 16421.

TABEL 1. OVERZICHT VAN DE ONDERZOCHE MATERIELEN.

Test materiaal	Gebruik
Glas	Negatieve controle
PVC-P	Positieve controle
Koper	Binnenhuisinstallatie
PE-Xb	Binnenhuisinstallatie
PE-Xc	Binnenhuisinstallatie
PVC-C	Distributiesysteem
PE-100	Distributiesysteem



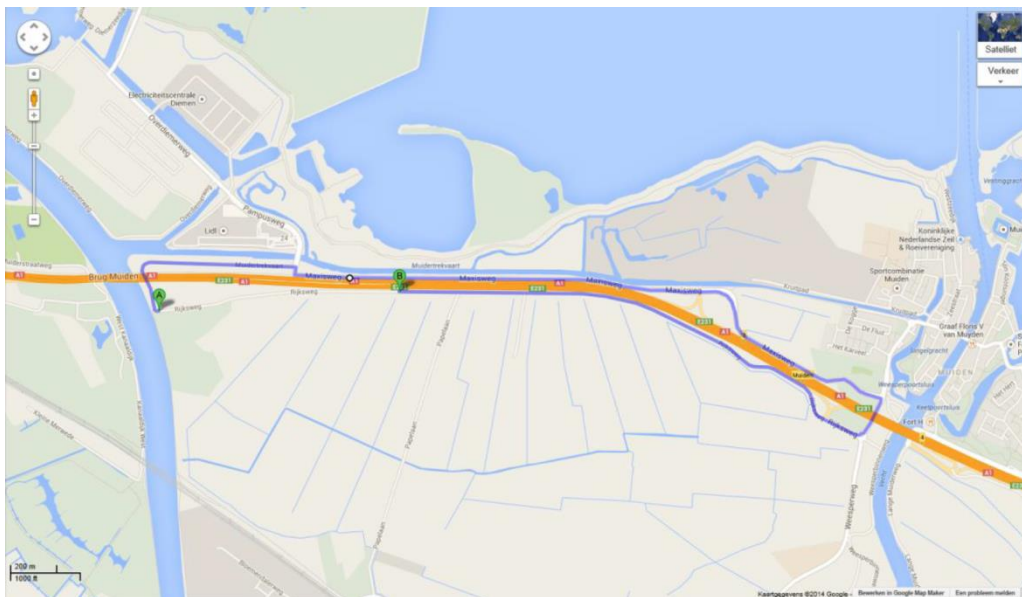
Figuur 1. Voorbeeld van fles met materiaal.

In totaal zijn op drie verschillende momenten materialentesten uitgevoerd. De eerste test bestond uit alle zeven materialen en deze test werd uitgevoerd van 28 mei – 10 september 2015 (wordt deel 1 genoemd in rest van het document). De tweede test bestond uit een fles met alleen water (dus zonder materiaal) dat ook wekelijks werd ververst én nogmaals de negatieve controle glas (wordt deel 2 genoemd in rest van het document). Deze tweede materialentest liep van 2 oktober 2015 – 15 januari 2016. De derde test bestond alleen uit een fles met water waarvan op dag 0 en 7 het water werd bemonsterd. Deze derde test werd uitgevoerd op 15/22 april en 13/20 mei 2016 (wordt deel 3 genoemd in de rest van het document).

2.2 Leidinguitname Bloemendalerpolder

Het drinkwaterbedrijf Waternet heeft vanwege een grootschalige verbouwing van de rijksweg A1 tussen Diemen en Muiderberg tijdelijk een 200 mm PE-leiding aangelegd (lengte 1520 m), in april 2014, zie Figuur 2. Na de voltooiing van de werkzaamheden in juli 2016 is het hele tracé, met het oog op toekomstige uitbreiding, vervangen door een 400 mm nodulair gietijzeren leiding en een boring van 500 mm PE/SLA. De leiding wordt gevoed met drinkwater van productielocatie Weesperkarspel en levert water aan Muiden en Muiderberg, waar in de zomer hoge aantallen *Aeromonas* voorkomen.

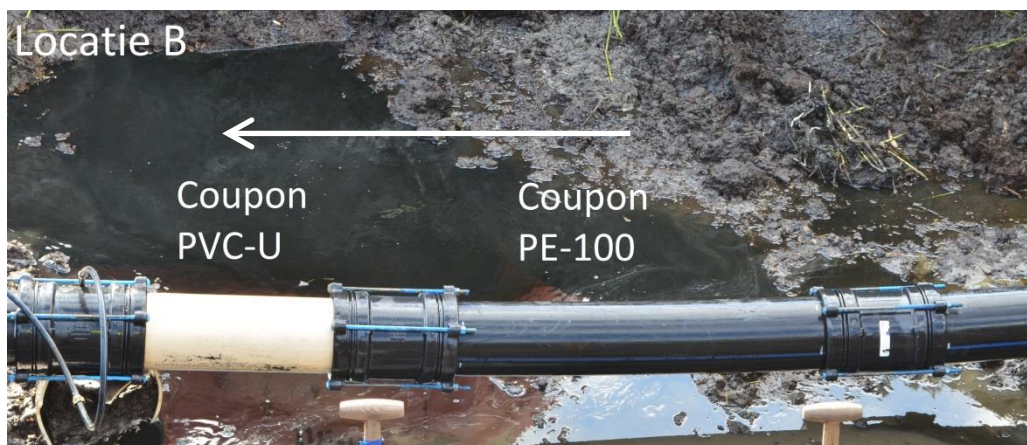
Bij het begin en einde van de 200 mm PE-leiding zijn coupons van PE en PVC-U geplaatst. Deze coupons of leidingstukken zijn op 12 juli 2016 uitgenomen. Voorafgaand aan de leidinguitname zijn vanaf 23 maart – 15 juni 2016 elke twee weken watermonsters genomen van het begin-, en eindpunt m.b.v. monsterkasten die daar zijn geplaatst. Deze watermonsters zijn geanalyseerd op *Aeromonas* bij 30°C (HWL, laatste watermonster door KWR) en op ATP, het koloniegetal bepaald bij 25°C (KG25) (KWR) en ook is DNA geïsoleerd voor qPCR-analyses en microbial profiling (KWR).



Figuur 2. Google maps van de monsterlocaties begin (A, links) en eind (B, rechts) van de leiding. Stroomrichting van A naar B.



Figuur 3. Locatie A, influent, stroomrichting aangegeven met pijl.



Figuur 4. Locatie B, effluent, stroomrichting aangegeven met pijl.

De leidinguitnames zijn volgens een uitgebreid protocol uitgevoerd, welke is te vinden in bijlage I. Kort samengevat wordt de leiding uitgegraven en rondom vrijgemaakt van de bodem (Figuur 3 en 4). Er wordt een ontwateringspomp gebruikt om de gegraven put vrij te houden van water. De leiding wordt ontwaterd door eerst een klein sleufje te zagen. Vervolgens wordt met twee zaagsneden het stuk leiding uitgezaagd. Deze wordt vervolgens verpakt in steriele zakken en koel (4°C) vervoerd.

2.3 Biofilmbemonstering

De uitgenomen leidingen werden op vier plekken (2 cm van de rand) bemonsterd: de onderkant, beide zijkanten en de bovenkant. De bemonstering werd gedaan door de biofilm van een bepaald oppervlakte (~10 cm²) met een steriel wattenstaafje af te nemen (swabben), waarna het wattenstaafje in 10 ml steriel leidingwater werd gedaan. Vervolgens werd het behandeld met vier keer 2 minuten Low Energy Sonification (LES), waarbij na elke LES behandeling 10 ml steriel drinkwater aan de swab werd toegevoegd. Na alle LES-

behandelingen werd het volume van de vier geswabte zijden (40 ml suspensie per swab) gepoold, zodat een totaal volume van 160 ml werd verkregen.

2.4 Analyses

De verkregen biofilm en watermonsters van de materialenproef en de uitgenomen leidingen werden geanalyseerd op een groot aantal parameters, die hieronder worden beschreven.

2.4.1 ATP

Adenosinetriphosfaat (ATP) is aanwezig in alle levende organismen en wordt in de cel gevormd bij de oxidatie van energiebronnen en vervolgens gebruikt bij de synthese van nieuw celmateriaal. De ATP bepaling berust op de luciferine-luciferase reactie, waarbij ATP onder vorming van licht (een foton per molecuul ATP) overgaat in adenosinedifosfaat (ADP). Met behulp van lichtgevoelige apparatuur kan de lichtproductie nauwkeurig worden gemeten. De werkwijze levert binnen enkele minuten een resultaat op. De detectiegrens van de bepaling bij direct onderzoek van drinkwater bedraagt ca. 1 ng ATP l⁻¹. Op basis van gemiddelde waarden voor het ATP-gehalte per bacteriecel kan met het ATP-gehalte een schatting worden gemaakt voor de concentratie actieve biomassa. De ATP-bepaling wordt daarom gebruikt voor de bepaling van de biomassaconcentratie in leidingwater en in biofilms en in testen voor de bepaling van de biologische (in)stabiliteit van water en de groeibevorderende eigenschappen van materialen in contact met leidingwater. De ATP-analyse is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-002.

2.4.2 Koloniegetal bij 25°C (KG25)

De parameter KG25 is een maat voor het aantal heterotrofe bacteriën dat in staat is te groeien op R2A medium, geïncubeerd voor 10 dagen bij 25°C. Het R2A medium bevat een lage concentratie voedingsstoffen en benadert daardoor goed de voedselarme conditie van drinkwater. De KG25-analyse is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-014 die conform NEN 6276 is. Bij deze analyse wordt het aantal heterotrofe bacteriën geteld dat kolonies vormt op een arm voedingsmedium (R2A) na 10 dagen incuberen bij 25°C. Omdat R2A een voedselarm medium is en langer wordt geïncubeerd bij een hogere temperatuur, is het aantal KVE ml⁻¹ vrijwel altijd minimaal een factor tien hoger dan KG22.

2.4.3 *Aeromonas* bij 30°C

Analyse van *Aeromonas*-bacteriën met behulp van de kweekmethode is uitgevoerd volgens KWR-huisvoorschrift LMB-022, die conform NEN 6263 is. De bepalingsgrens van de methode komt overeen met 1 kolonievormende eenheid per 100 ml (1 kve 100 ml⁻¹). Er wordt gebruik gemaakt van Ampicilline Dextrine Agar (ADA) medium en deze wordt vervolgens 24 uur geïncubeerd bij 30°C. Kolonies met een kenmerkende morfologie (geel) worden geteld. De watermonsters van 23-3-2016 t/m 15-6-2016, van de monsterkasten in de Bloemendalerpolder, zijn door HWL geanalyseerd. De watermonsters en biofilmmonsters van 12-7-2016 zijn door KWR geanalyseerd.

2.4.4 DNA

Elk water- en biofilmmonster werd gefiltreerd gebruik makend van een 0,22µm filter, waarna de filters met DNA van een interne controle werden opgeslagen bij -20°C. Later werd DNA uit deze filters geïsoleerd met de PowerBiofilm™ DNA Isolation kit (MoBio Laboratories Inc.) volgens KWR-huisvoorschrift LMB-069.

2.4.5 qPCR

Het aantal genkopieën van *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Legionella* spp., *Aeromonas* spp., schimmels, *A. fumigatus* en *V. vermiformis* is bepaald volgens

verschillende KWR huisvoorschriften, die zijn gebaseerd op methoden beschreven in de internationale literatuur (zie tabel 2 voor het overzicht).

V. vermiformis wordt gekwantificeerd als aantal cellen per liter (N/l) en daarom wordt gebruik gemaakt van een celijklijn. In iedere cel van *V. vermiformis* zijn ongeveer 1300 kopieën van het 18S rRNA gen aanwezig. Daarom wordt er voor de kwantificatie van *V. vermiformis* een nauwkeurig gekwantificeerde celsuspensie van *V. vermiformis* gebruikt.

TABEL 2. LIJST VAN QPCR'S GEBRUIKT IN DIT ONDERZOEK OM DE VERSCHILLENDE ORGANISMEN TE KWANTIFICEREN IN BIOFILM EN WATER

	Doelgen	KWR-huisvoorschrift	Bron
<i>Mycobacterium</i> spp.	16S rRNA	LMB-065, bijlage 20	(van der Wielen et al., 2014)
<i>Pseudomonas</i> spp.	16S rRNA	LMB-065, bijlage 30	(Wullings, 2015)
<i>Legionella</i> spp.	16S rRNA	LMB-068, bijlage 01	(Heijnen et al., 2002)
<i>Aeromonas</i> spp.	16S rRNA	LMB-068, bijlage 04	(van der Wielen et al., 2013)
Schimmels	18S rRNA	LMB-065, bijlage 29	(Van der Kooij et al., 2006; Wullings et al., 2005)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	28S rRNA	LMB-065, bijlage 06	(van der Wielen, Italiaander, et al., 2011)
<i>Vermamoeba vermiformis</i>	18S rRNA	LMB-061	(Kuiper et al., 2006)

2.4.6 NGS

Gebarcodeerde fragmenten van het 16S rRNA gen (~300bp), gericht op het V4 hypervariabele regio, werden geamplificeerd van het geïsoleerde DNA, gebruik makend van de primers 515F en 806R. Negatieve controles (blanco tijdens filtratie en blanco PCR) zijn meegenomen. De DNA-sequentie is bepaald van de gezuiverde PCR producten met de Illumina MiSeq sequencer bij KWR. Deze DNA-sequenties zijn vervolgens geanalyseerd met behulp van het specialistische computerprogramma Mothur.

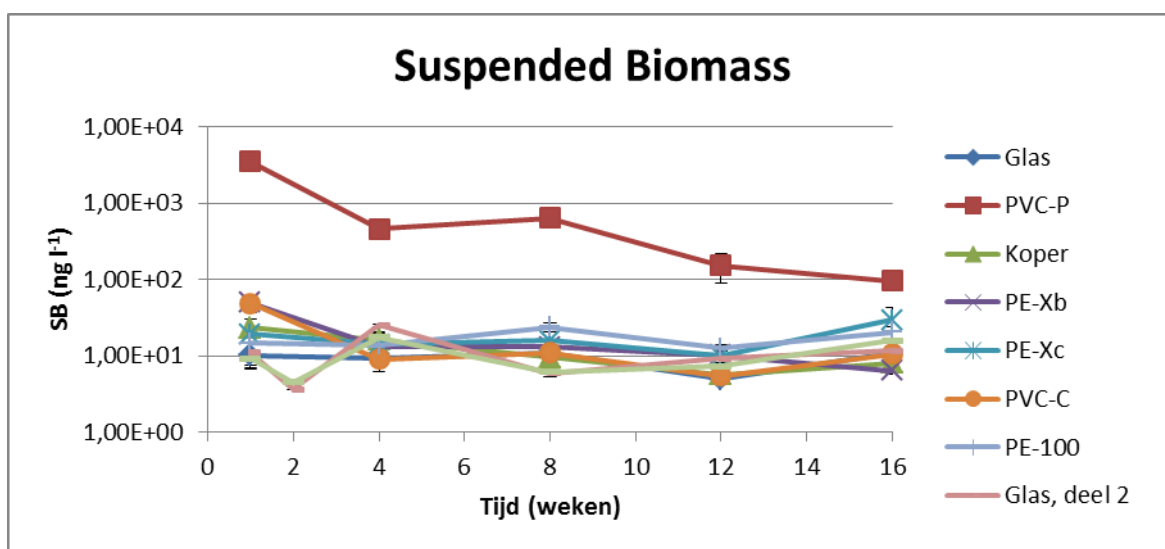
Elk monsters heeft een forward en reverse read, de eerste stap is om deze twee reads te combineren, zodat er 1 consensus sequentie overblijft. Omdat er waarschijnlijk veel identieke sequenties zijn, worden deze in een volgende stap samengevoegd. Vervolgens worden sequenties die maar 1 nucleotide per 100 basenparen van elkaar verschillen bij elkaar gevoegd. Daarna worden de chimera's verwijderd, chimera zijn twee of meer fragmenten van het 16S rRNA gen van verschillende bacteriesoorten die tijdens de PCR aan elkaar zijn gaan zitten en dus geen echte 16S rRNA gensequenties zijn. De sequenties worden in de volgende stap geïdentificeerd. Dan worden de sequenties in operational taxonomic units (OTU's) ingedeeld. De data is nu klaar om verder geanalyseerd te worden, of verder met Mothur, of R (Statistisch programma), Excel en een webbased tool Microbiome Analyst" (Dhariwal et al. 2017) op de website: <http://www.microbiomeanalyst.ca>.

3 Materialentest resultaten

3.1 ATP

3.1.1 Biomassa in water

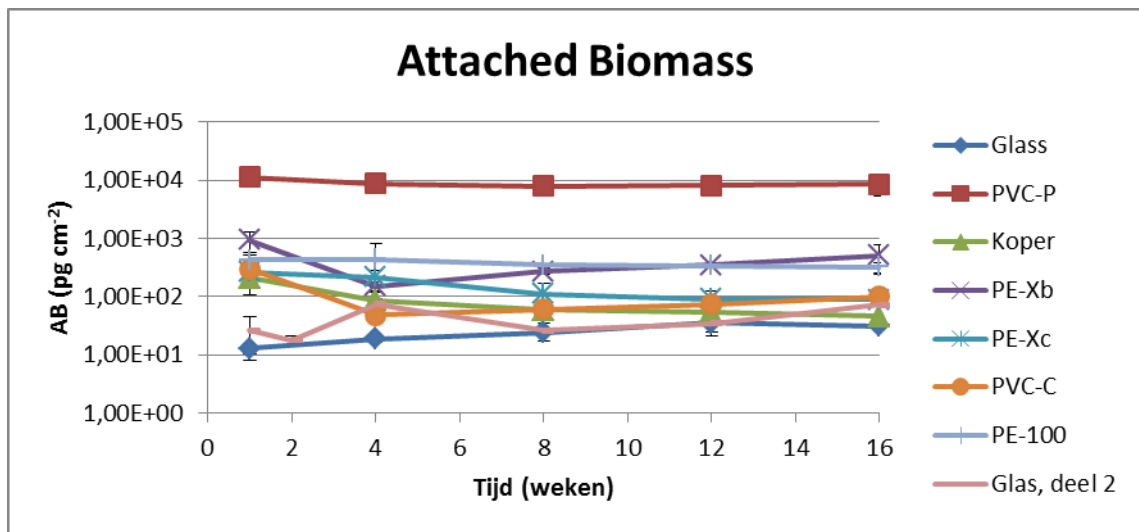
De ATP concentraties die zijn gemeten in het water van de verschillende materialen gedurende 16 weken, zijn weergegeven in Figuur 5. De ATP concentraties in het water van de negatieve controle glas is rond de 9 ng l⁻¹ in deel 1, in deel 2 is het gemiddelde rond de 11 ng l⁻¹. De ATP concentratie in het water in de fles zonder materiaalstukjes ligt hier precies tussen. De ATP concentratie in het water van de materialen koper, PE-Xb, PE-Xc, PVC-C en PE-100 liggen dicht bij elkaar (12 - 18 ng l⁻¹). De positieve controle (PVC-P) heeft de hoogste gemiddelde ATP-concentratie van rond de 970 ng l⁻¹.



Figuur 5. ATP concentratie gemeten in het water (gesuspendeerde biomassa, SB) van de BPP-test met verschillende materialen.

3.1.2 Biomassa in biofilm

De ATP concentraties van de biofilm op glas zijn het laagst, in deel 1 fluctueert deze ATP concentratie rond de 20 pg cm⁻² en in deel 2 rond de 40 pg cm⁻² (Figuur 6). De ATP concentratie van de biofilm op koper is licht hoger en fluctueert rond de 90 pg cm⁻². De ATP concentraties van de biofilms op de materialen PVC-C en PE-Xc zitten daar net boven (110 en 150 pg cm⁻², respectievelijk). De ATP concentraties van de biofilms op materialen PE-100 en PE-Xb waren duidelijk hoger en fluctueren rond de 370 en 440 pg cm⁻², respectievelijk. De positieve controle (PVC-P) heeft veruit de hoogste gemiddelde ATP-concentratie in de biofilm van rond de 9.000 pg cm⁻².



Figuur 6. ATP concentraties van de biofilm (attached biomass, AB) op de verschillende materialen gemeten tijdens de materiaaltest.

De resultaten van de BPP-waarden van de verschillende geteste materialen zijn weergegeven in Tabel 2. De biomassaproductie (BP) van week 8, 12 en 16 wordt berekend door de som te nemen van de ATP concentratie van de biofilm (is aangehechte biomassa, AB) en de ATP concentratie van de gesuspendeerde biomassa in water (SB). De BPP waarde wordt vervolgens berekend door het gemiddelde van de drie BP waardes te berekenen.

De negatieve controle glas en koper hebben een BPP waarde lager dan 100 pg ATP cm⁻². De BPP waardes van PVC-C en PE-Xc zijn iets hoger en liggen dicht bij elkaar ($132 \pm 28,4$ en $210,8 \pm 58,6$ pg ATP cm⁻² respectievelijk). Op de positieve controle (PVC-P) na hebben de materialen PE-Xb en PE-100 de hoogste BPP concentraties van de onderzochte materialen ($434,1 \pm 99,8$ en $442,4 \pm 34,3$ pg ATP cm⁻² respectievelijk). PVC-P (positieve controle) heeft een BPP waarde van 9.834 ± 1.392 pg ATP cm⁻². De BPP-waarden van alle materialen, behalve PVC-P liggen onder het onlangs geïntroduceerde wettelijke beoordelingscriterium van 1000 pg ATP cm⁻² (Anoniem, 2017).

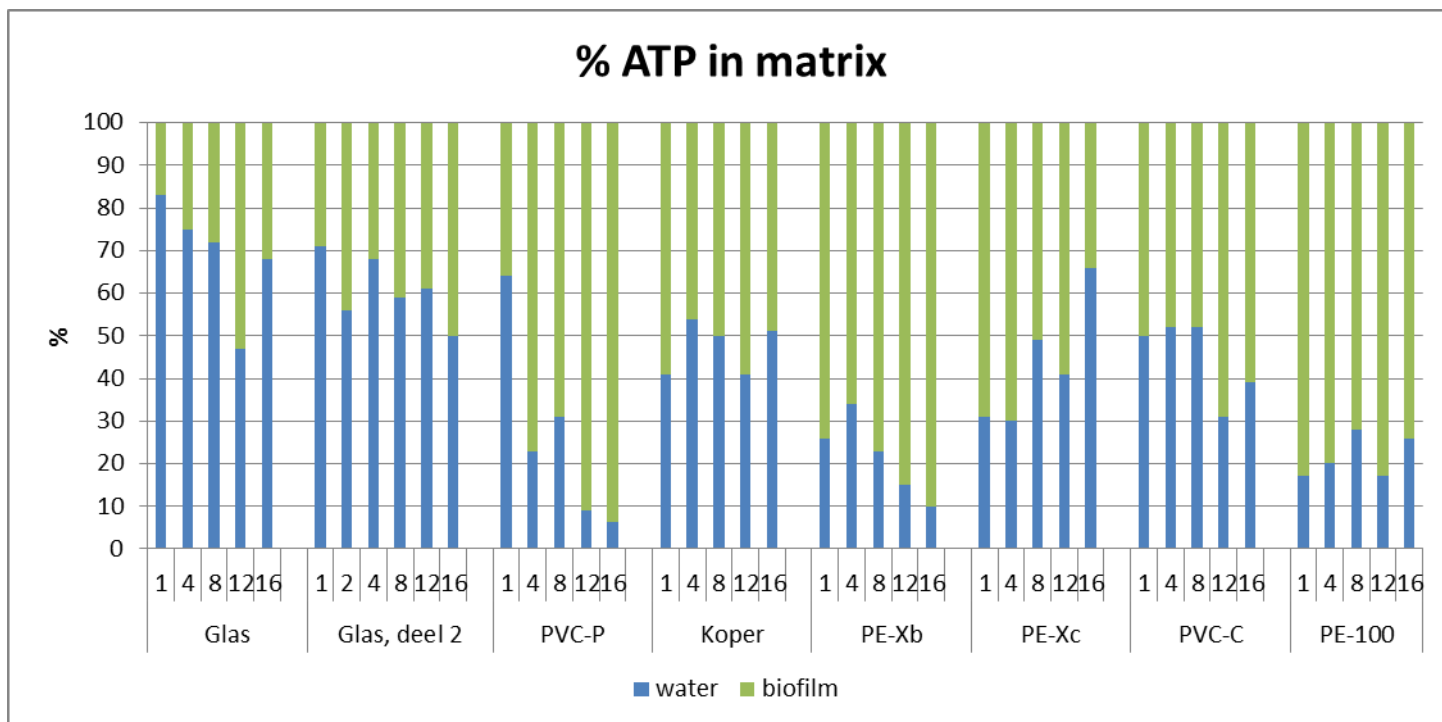
TABEL 3. OVERZICHT VAN DE GEMIDDELDE BPP WAARDE ± STANDAARDDEVIATIE VOOR DE VERSCHILLENDE ONDERZOCHE LEIDINGMATERIALEN MET DE BPP-TEST.

Test materiaal	BPP ± SD (pg ATP cm ⁻²)
Glas	83,9 ± 16,6
Glas, deel 2	99 ± 41,2
PVC-P	9.834 ± 1.392
Koper	99,4 ± 14,1
PE-Xb	434,1 ± 99,8
PE-Xc	210,8 ± 58,6
PVC-C	132 ± 28,4
PE-100	442,4 ± 34,3

3.1.3 Percentuele biomassaverdeling tussen biofilm en water

De percentuele verdeling van ATP is bepaald over de twee verschillende matrices water en biofilm (Figuur 7). Om de ATP-concentratie in water te kunnen vergelijken met biofilm zijn de ATP-concentraties voor water omgerekend naar ATP-concentraties per cm² materiaal. Dezelfde omrekening is ook uitgevoerd voor de andere microbiologische parameters die

later worden besproken. Voor glas neemt het aandeel biomassa in de biofilm, ten opzichte van het aandeel biomassa in het water, gedurende de 16 weken incubatie in de BPP-test toe van 18% naar 32%. Voor PVC-P neemt het aandeel biomassa in de biofilm, ten opzichte van water, ook in de tijd toe, maar deze toename was hoger (van 36% naar 94%) dan voor glas. Ook voor PE-Xb en PVC-C wordt een toename van biofilmbiomassa, ten opzichte van biomassa in water, waargenomen in de tijd (van ongeveer 70 naar 90% voor PE-Xb en van ongeveer 50% naar 65% voor PVC-C). De biomassaverdeling over biofilm en water voor de materialen koper en PE-100 blijven in de tijd gelijk, gemiddeld is de biofilmbiomassa rond de 50% (koper) en 80% (PE-100) van de totale biomassa. Bij PE-Xc, tenslotte, wordt juist een afname van de biofilmbiomassa ten opzichte van biomassa in het water waargenomen in de tijd (van 70 naar 35%). Wanneer de biofilm is gestabiliseerd (na 12 tot 16 weken) wordt bij de materialen PVC-P, PE-Xb en PE-100 percentueel gezien veel meer biomassa in de biofilm waargenomen dan in het water, terwijl voor glas het omgekeerde geldt. De andere materialen (koper, PE-Xc en PVC-C) hebben een meer evenredige verdeling van de biomassa over biofilm en water. Blijkbaar verschillen de materialen in de mate waarin biomassa in de biofilm of in het water worden gevormd.

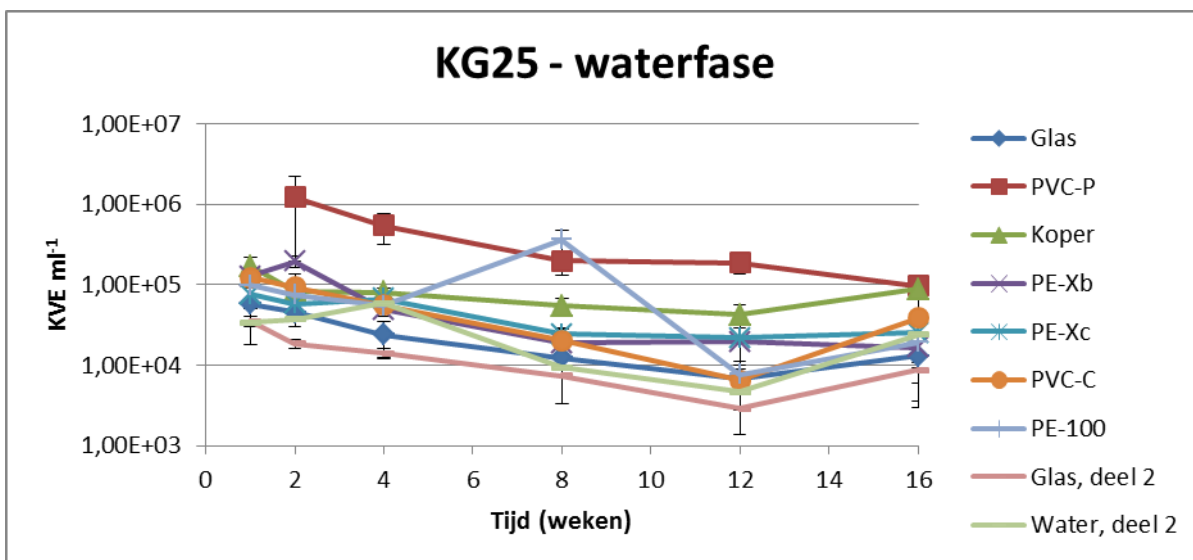


Figuur 7. Percentage van biomassa in water of biofilm per materiaal, voor de weken 1, 4, 8, 12 en 16 achtereenvolgens. Glas deel 2 heeft daarbovenop een extra meetpunt na 2 weken.

3.2 KG 25

3.2.1 KG25-aantallen in water

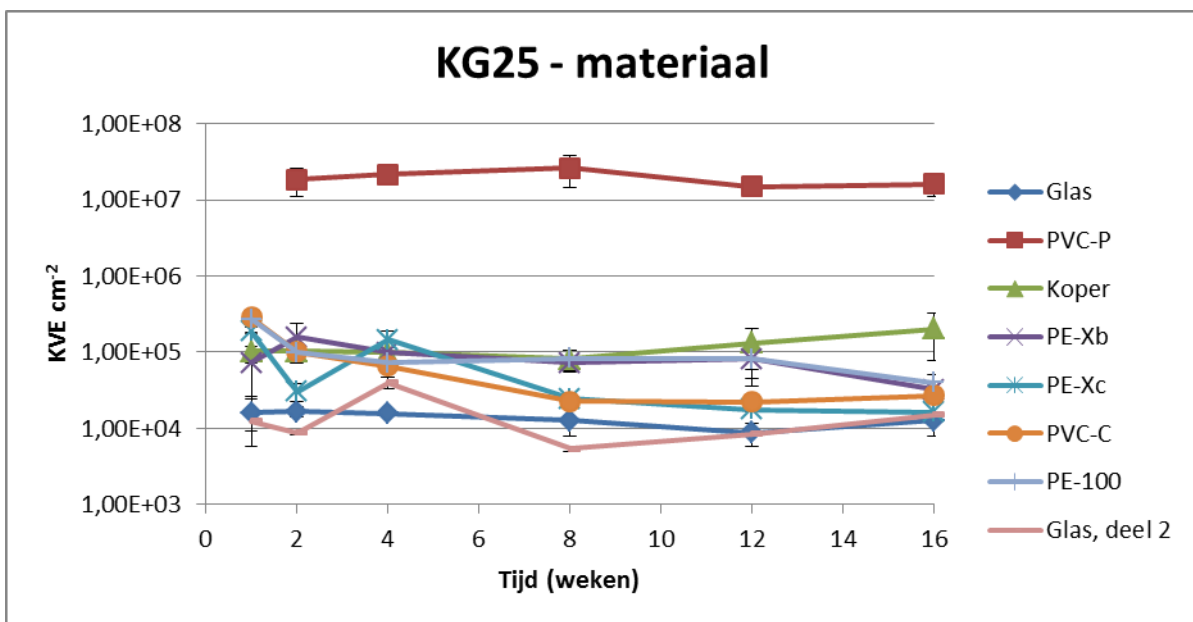
De aantallen heterotrofe bacteriën gegroeid bij 25°C (KG25) en die zijn gemeten in het water, zijn weergegeven in Figuur 8. De KG25-aantallen gevonden in het water met de verschillende leidingmaterialen variëren voor de meeste materialen tussen 1×10^4 en 1×10^5 KVE ml⁻¹ en verschillen niet veel van elkaar. Te zien is dat de negatieve controles glas en water (wat niet in contact is geweest met materiaalstukjes) de laagste KG25 hebben, rond 2×10^4 KVE ml⁻¹. De positieve controle PVC-P daarentegen heeft de hoogste waarde, namelijk rond 5×10^5 KVE ml⁻¹.



Figuur 8. De KG25 aantallen (KVE ml⁻¹) in het water van de BPP-test met verschillende materialen.

3.2.2 KG25-aantallen in biofilm

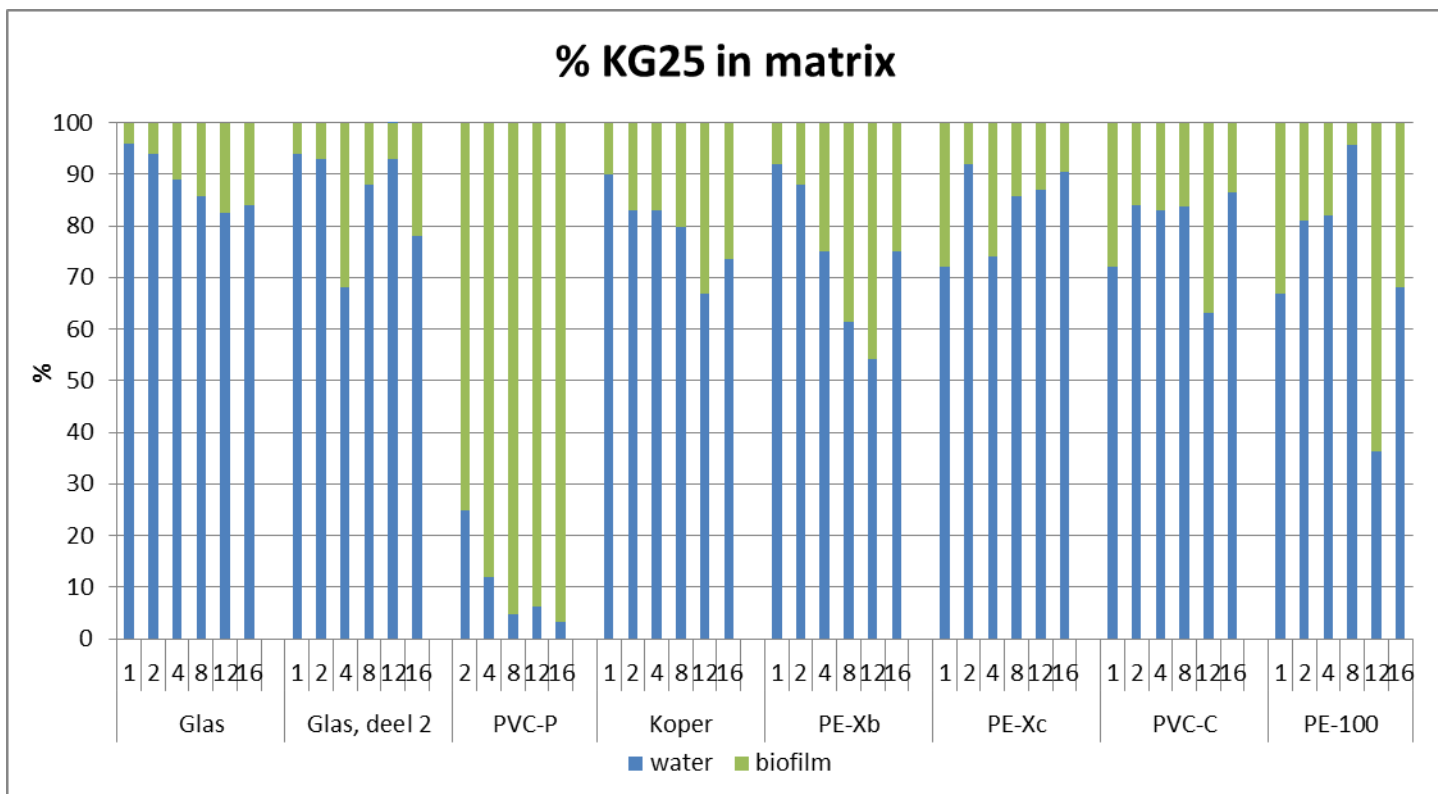
De KG25-aantallen in de biofilm op de verschillende materialen tijdens de BPP test zijn weergegeven in Figuur 9. De KG25-aantallen in de biofilm verschillen tussen de verschillende materialen. De aantallen in de biofilm op de negatieve controle glas zijn het laagst, rond de 1×10^4 KVE cm⁻². De aantallen gevonden in de biofilm van PE-Xc, PE-Xb en PVC-C zijn iets hoger, met een gemiddelde rond de $7-8 \times 10^4$ KVE cm⁻². De KG25-aantallen in de biofilm op de materialen PE-100 en koper zijn nog iets hoger, namelijk rond de 1×10^5 KVE cm⁻². De positieve controle PVC-P heeft de hoogste KG25-aantallen in de biofilm (2×10^7 KVE cm⁻²).



Figuur 9. De KG25-aantallen van de biofilm (in KVE cm⁻²) op de verschillende materialen gemeten tijdens de BPP-test.

3.2.3 Percentuele verdeling KG25 over biofilm en water

De percentuele verdeling van de KG25-aantallen is bepaald over de twee verschillende matrices water en biofilm (Figuur 10). Voor alle materialen, behalve PVC-P, bevinden de meeste KG25-aantallen zich percentueel gezien in de waterfase (meestal meer dan 60%). Voor PVC-P bevindt zich echter minder dan 20% (week 2) of 10% (week 4 t/m 16) van de KG25-aantallen in de waterfase. Voor de materialen glas, PVC-P, koper en PE-Xb worden er in de loop van de tijd percentueel gezien meer KG25-aantallen gevonden in de biofilm, maar deze verschillen in de tijd zijn klein. In tegenstelling hiermee, wordt voor PE-Xc een kleine afname van het aantal heterotrofe bacteriën in de biofilm waargenomen in de tijd, terwijl voor PVC-C en PE-100 geen duidelijke trend in de tijd werd waargenomen.



Figuur 10. Percentage van KG25 aantallen in water of biofilm per materiaal, voor de weken 1, 2, 4, 8, 12 en 16 achtereenvolgens (behalve voor PVC-P die week 1 mist).

3.3 Deel 3

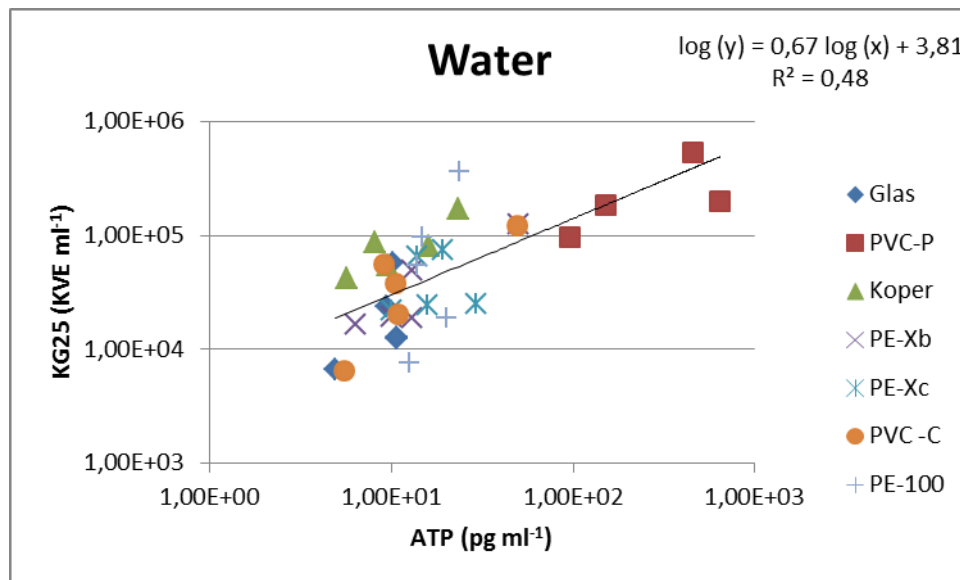
Deel 3 bestond alleen uit een fles met water waarvan op dag 0 en 7 het water werd bemonsterd. Deze derde test werd uitgevoerd op 15/22 april en 13/20 mei 2016 (zie tabel 4). De ATP-concentratie verdubbelt in zeven dagen en de KG25-aantallen worden 1000x zo hoog in zeven dagen.

TABEL 4. ATP CONCENTRATIE EN KG25 AANTALLEN OP DAG 0 EN DAG 7 IN WATER (DEEL 3).

	ATP		KG25	
	gem	stdev	gem	stdev
dag 0	3,1	1,3	$2,3 \times 10^1$	6,8
dag 7	7,5	0,7	$4,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$

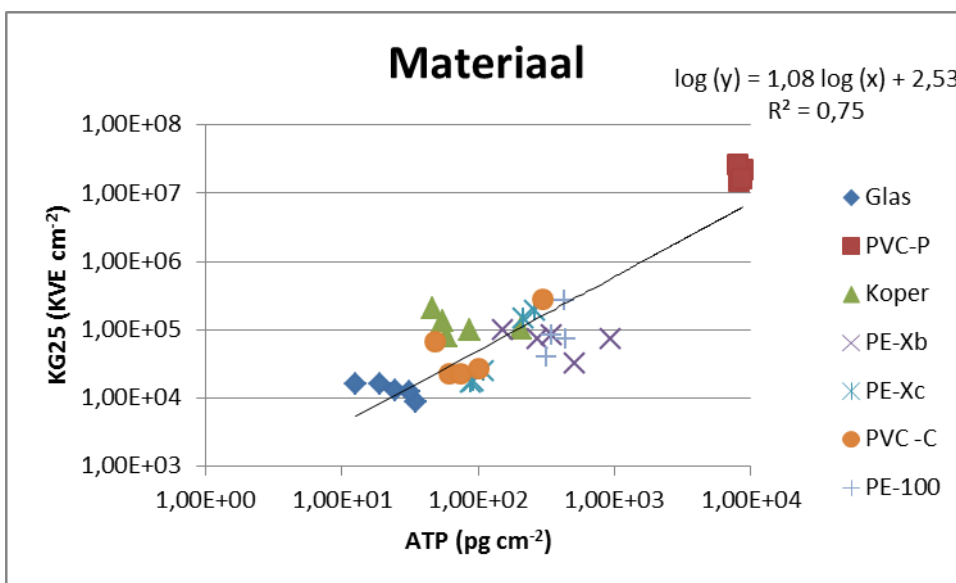
3.4 Relatie tussen ATP en KG25

De relaties tussen alle gemeten ATP-concentraties en KG25-aantallen in water en biofilm zijn tegen elkaar uitgezet (Figuur 11). Deze correlatie is relatief zwak met een R^2 van 0,48. Toenemende biomassaconcentratie in het water wordt dus niet altijd gereflecteerd in hogere KG25-aantallen, wat betekent dat niet altijd hetzelfde deel van de bacteriën kweekbaar is met KG25.



Figuur 11. Verhouding aantallen KG25 en ATP biomassa concentraties.

De relatie tussen alle ATP-concentraties en KG25-aantallen van de biofilm gemeten met de BPP-testen van deel 1 zijn ook tegen elkaar uitgezet (Figuur 12). Het verband tussen ATP en KG25 in de biofilm was duidelijk sterker (R^2 van 0,75) dan voor water. Maar als het materiaal PVC-P uit de relatie wordt gehaald, daalt de R^2 naar 0,32. Dit geeft aan dat er dus geen sterk verband is tussen ATP en KG25 in de biofilm en dat de correlatie in Figuur 12 vooral wordt bepaald door de waarden die zijn verkregen voor PVC-P.

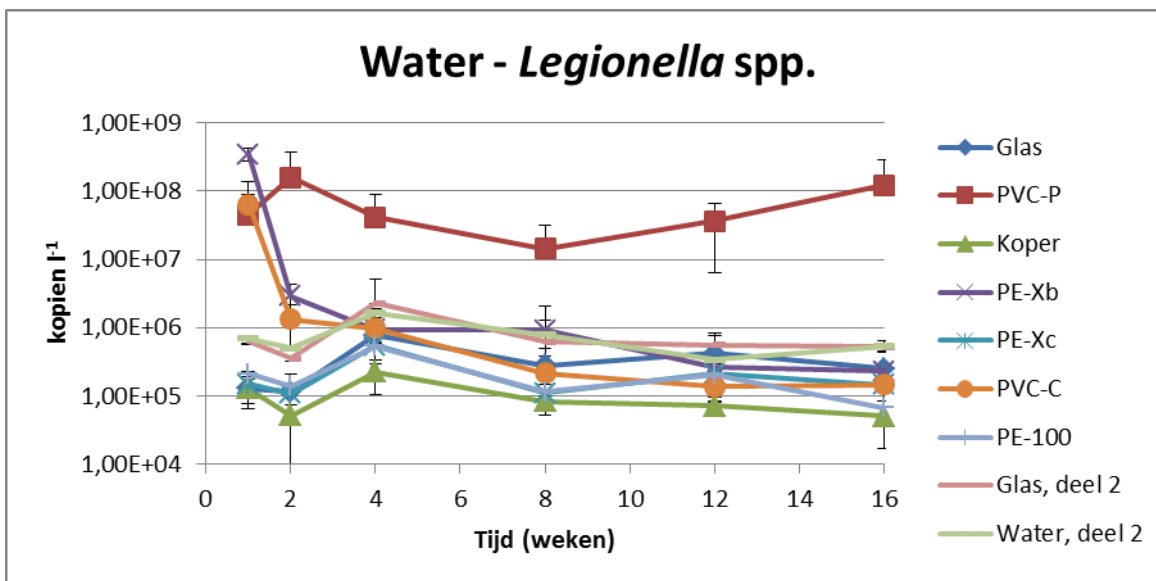


Figuur 12. Verhouding aantallen KG25 en ATP biofilm concentraties.

3.5 Legionella spp.

3.5.1 Legionella spp. in water

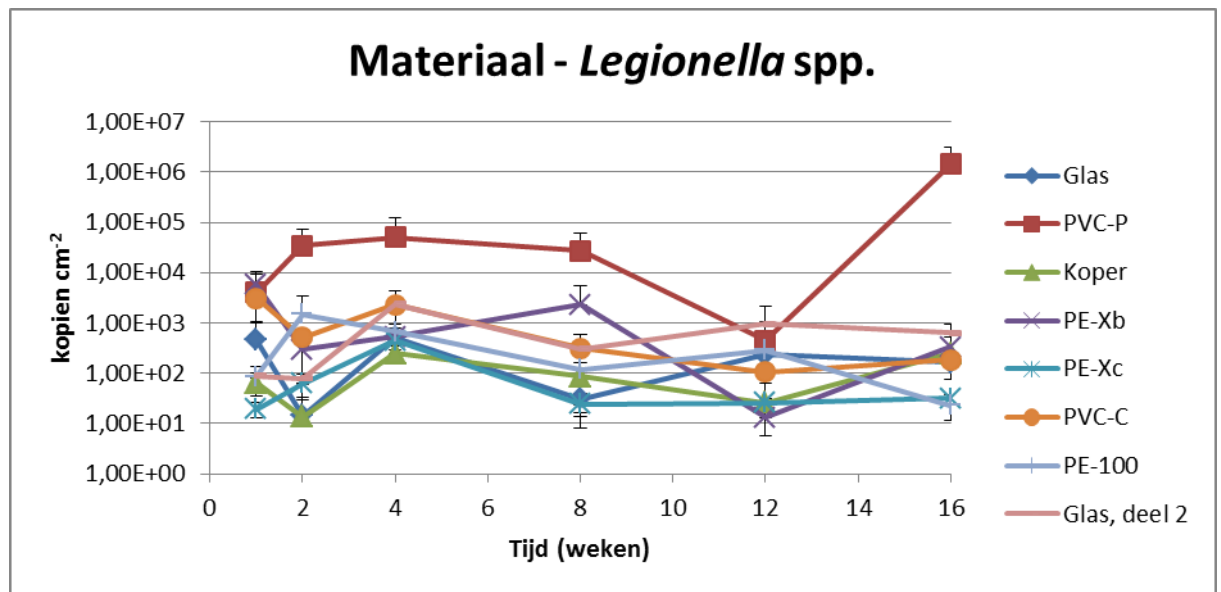
In alle watermonsters werden 16S rRNA genkopieën van *Legionella* spp. waargenomen (Figuur 13). De aantallen gevonden in het water van de positieve controle PVC-P liggen gemiddeld 2 logeenheden hoger dan de rest. De aantallen gevonden in het water van de materialen PE-Xb, PVC-C en PVC-P zijn in week 1 (10^7 genkopieën (gk) l⁻¹) hoger dan de rest (10^5 l⁻¹). De aantallen gevonden in het water van de meeste materialen liggen dicht bij elkaar ($10^4 - 10^5$ gk l⁻¹), in het water van koper worden de laagste aantallen gevonden en na PVC-P worden de hoogste aantallen gevonden in het water van PE-Xb en PE-Xc. Vanaf week 2 veranderen de aantallen in het water met de verschillende materialen nauwelijks.



Figuur 13. De 16S rRNA genkopieën van *Legionella* spp. in de tijd in het water van de BPP test met verschillende materialen.

3.5.2 *Legionella* spp. in biofilm

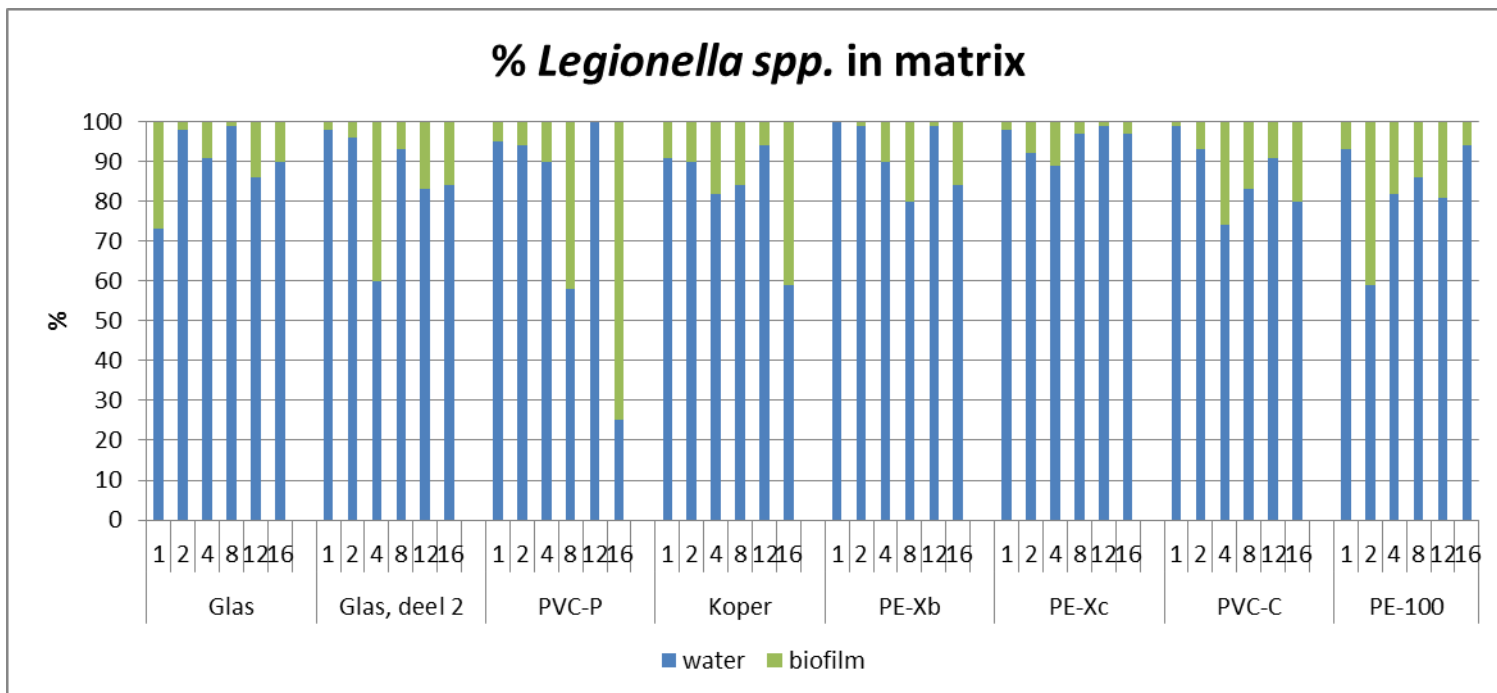
In alle biofilmmonsters werden 16S rRNA genkopieën van *Legionella* spp. waargenomen (Figuur 14). De aantallen gevonden in de biofilm van de verschillende materialen (behalve PVC-P) zijn niet goed van elkaar te onderscheiden (gemiddelde $10^2 - 10^3$ gk cm^{-2}). De legionella-aantallen in de biofilm van koper zijn ook hier weer het laagst, maar ook de aantallen in de biofilm van glas zijn laag. De legionella-aantallen gevonden in de biofilm van de positieve controle PVC-P zijn wel duidelijk te onderscheiden en ook hoger (gemiddeld rond de 10^5 gk cm^{-2}).



Figuur 14. De 16S rRNA genkopieën van *Legionella* spp. in de tijd op de verschillende materialen gemeten tijdens de BPP-test.

3.5.3 Percentuele verdeling *Legionella* spp. over water en biofilm

De percentuele verdeling van het aantal *Legionella* spp. 16S rRNA genkopieën (per cm^2) over de twee verschillende matrices water en biofilm is weergegeven in Figuur 15. De meeste *Legionella* spp. bevinden zich bij alle materialen in de waterfase. Bij PVC-P vindt vanaf week 8 wel een verschuiving plaats naar de biofilm, week 12 is hierop een uitzondering.

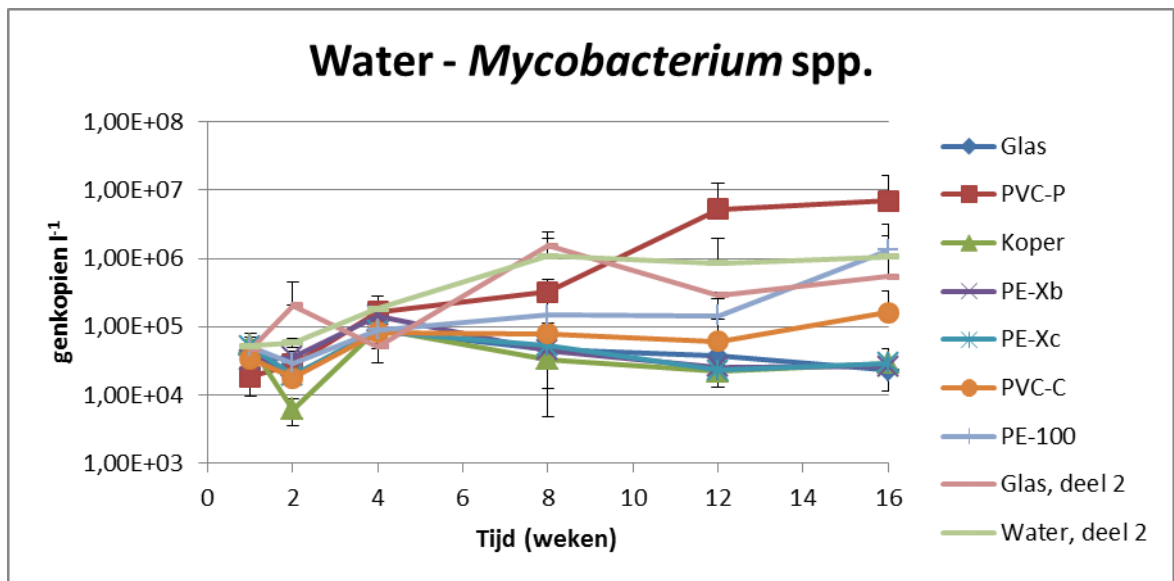


Figuur 15. Percentage van *Legionella* spp. aantallen in water of biofilm per materiaal, voor de weken 1, 2, 4, 8, 12 en 16 achtereenvolgens.

3.6 *Mycobacterium* spp.

3.6.1 *Mycobacterium* spp. in water

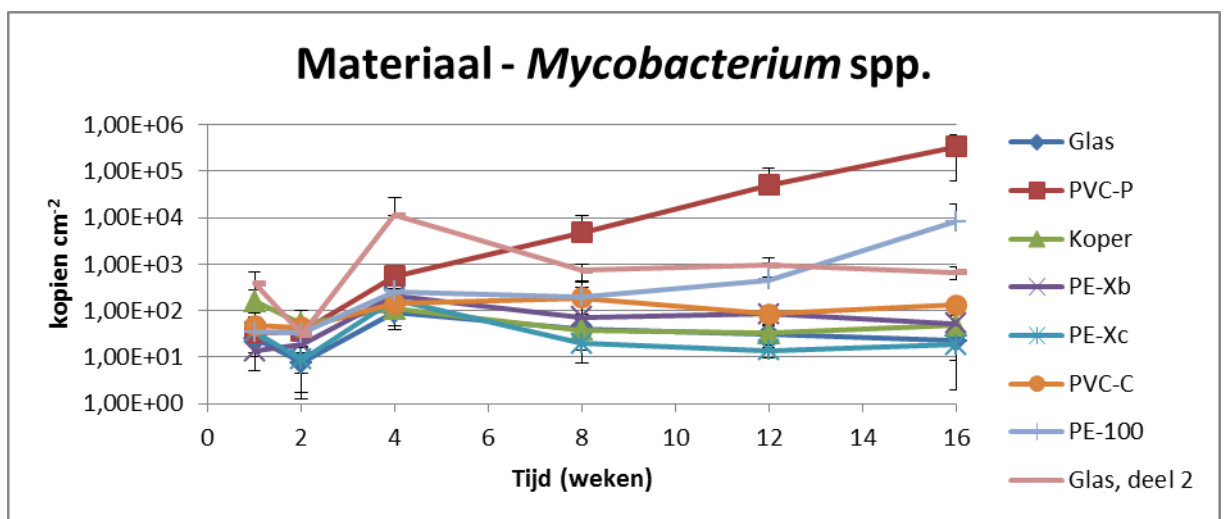
In alle watermonsters werden 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium* spp. waargenomen (Figuur 16). Het aantal 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium* spp. in het water met de negatieve controle glas, koper, PE-Xc, PE-Xb, PVC-C blijven in de tijd nagenoeg gelijk en liggen gemiddeld rond de $4-7 \times 10^4$ gk l⁻¹. Het aantal 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium* spp. in het water met de materialen PE-100 is hoger, met een gemiddelde van $3-5 \times 10^5$ gk l⁻¹. Het aantal genkopieën in het water van PE-100 neemt ook toe in de tijd. De hoogste aantallen genkopieën van *Mycobacterium* spp. werden gevonden in het water met de positieve controle PVC-P, namelijk 2×10^6 gk l⁻¹, en ook deze namen toe in de tijd. De 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium* spp. in het water met glas van deel 2 en in het water zonder materiaalstukjes deel 2 waren hoger dan in het water met glas van deel 1.



Figuur 16. De 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium spp.* aantallen in het water van de BPP-test met verschillende materialen.

3.6.2 *Mycobacterium spp.* in biofilm

In alle biofilmmonsters werden 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium spp.* waargenomen (Figuur 17). Het aantal genkopieën gevonden in de biofilm van de materialen vertonen dezelfde trend als die gevonden voor het water met de verschillende materialen (Figuur 16). Het aantal genkopieën in de biofilm van glas, PVC-C, koper, PE-Xc en PE-Xb varieert tussen 1×10^1 en 1×10^2 gk cm⁻². Voor PE-100 waren deze aantallen hoger (tussen 1×10^2 en 1×10^4 gk cm⁻²), maar de hoogste aantallen werden waargenomen voor PVC-P (tussen 1×10^2 en 5×10^5 gk cm⁻²). Alleen Bij PVC-P nam het aantal 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium spp.* ook duidelijk toe in de tijd. De aantallen in de biofilm op glas bepaald tijdens deel 2 was duidelijk hoger dan in de biofilm op glas bepaald tijdens deel 1.

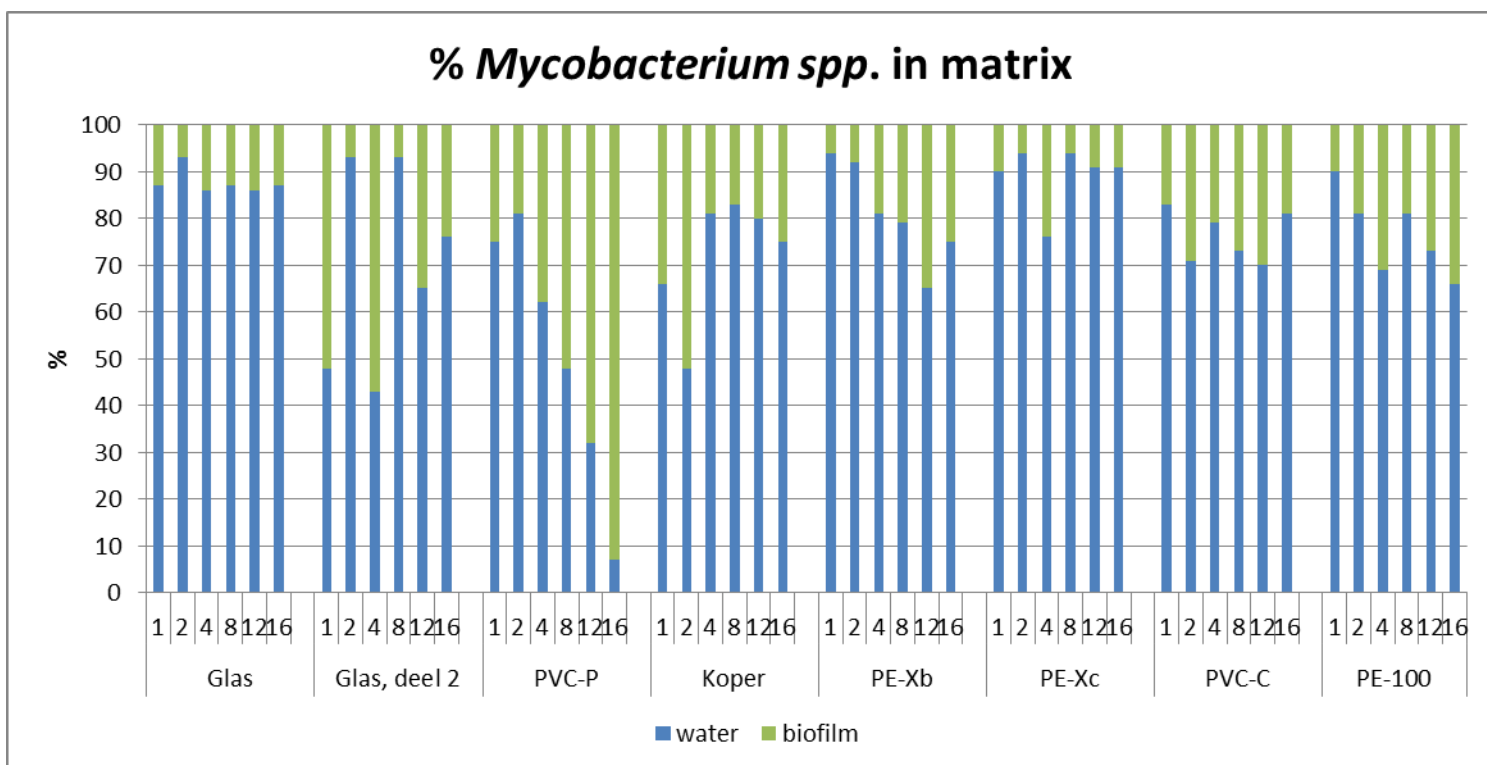


Figuur 17. De 16S rRNA genkopieën van *Mycobacterium spp.* aantallen van de biofilm op de verschillende materialen gemeten tijdens de BPP-test.

3.6.3 Percentuele verdeling *Mycobacterium spp.* over water en biofilm

De percentuele verdeling van het aantal *Mycobacterium spp.* 16S rRNA genkopieën over de twee verschillende matrices water en biofilm is weergegeven in Figuur 18. Voor de meeste

materialen, met uitzondering van PVC-P, bevinden de meeste *Mycobacterium* spp. zich in de waterfase. Voor glas deel 1 en PE-Xc bevindt zich 80 tot 90% van de mycobacteria in het water, voor koper, PVC-C, PE-Xb en PE-100 is dit over het algemeen tussen de 70 en 80%, terwijl bij PVC-P na 16 weken minder dan 10% in de waterfase aanwezig is. Bij PE-Xb, PE-100 en PVC-P neemt het percentuele aandeel van *Mycobacterium* spp. in het water af gedurende de looptijd van de BPP-test, maar bij PE-Xb en PE-100 is deze afname beperkt. Bij PVC-P wordt percentueel gezien wel een forse afname van mycobacteria in water, ten opzichte van toename in biofilm, waargenomen (van > 70% na 1 tot weken tot < 10% na 16 weken). Bij glas, PE-Xc en PVC-C blijven de percentages mycobacteria in water en biofilm vergelijkbaar gedurende de looptijd van de BPP-test. Bij koper lijken het deel van de mycobacteria dat zich in water bevindt toe te nemen in de tijd.

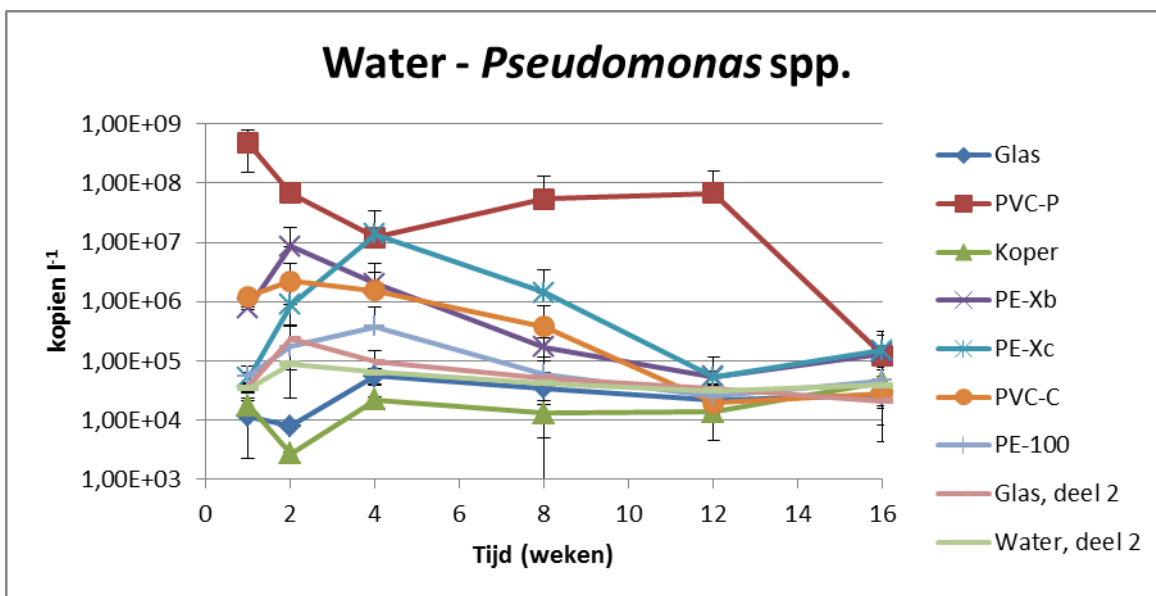


Figuur 18. Percentage van *Mycobacterium* spp. aantallen in water of biofilm per materiaal, voor de weken 1, 2, 4, 8, 12 en 16 achtereenvolgens.

3.7 *Pseudomonas* spp.

3.7.1 *Pseudomonas* spp. in water

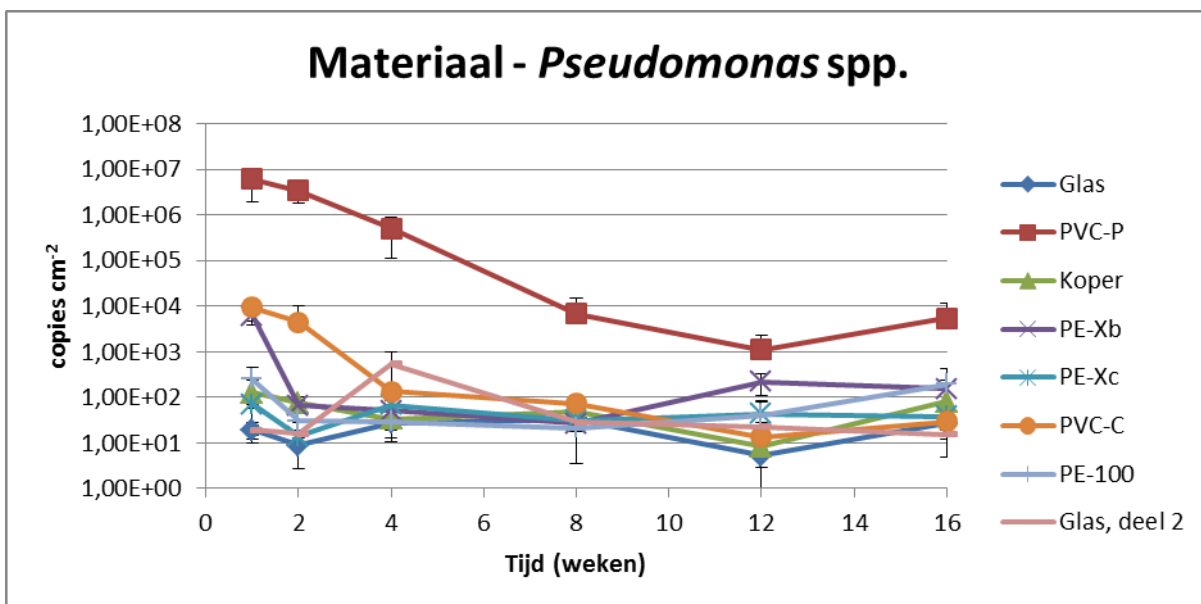
In alle watermonsters werden 16S rRNA genkopieën van *Pseudomonas* spp. waargenomen (Figuur 19). In het begin liggen de gevonden aantal genkopieën in het water van PVC-P, PE-Xb en PVC-C hoger ($10^6 - 10^8$ gk l⁻¹) dan aan het einde ($10^4 - 10^5$ gk l⁻¹), waar de concentraties van de verschillende materialen bij elkaar komen. De aantallen in het water van PVC-P zijn wel duidelijk hoger (10^8 gk l⁻¹) dan in het water van de andere materialen (10^6 gk l⁻¹). Het aantal genkopieën in het water van de materialen PE en PVC-C zijn tot week 8 hoger dan in het water van glas en koper, daarna zijn er relatief weinig verschillen tussen de aantallen in het water van deze materialen. In het water van PE-Xc is er één piek, die even hoog is als PVC-P (week 4), waarna de aantallen afnemen. De aantallen in het water van overige materialen blijven in de tijd gelijk.



Figuur 19. De 16S rRNA genkopieën van *Pseudomonas* spp. in de tijd in de waterfase van de BPP-test met verschillende materialen.

3.7.2 *Pseudomonas* spp. in biofilm

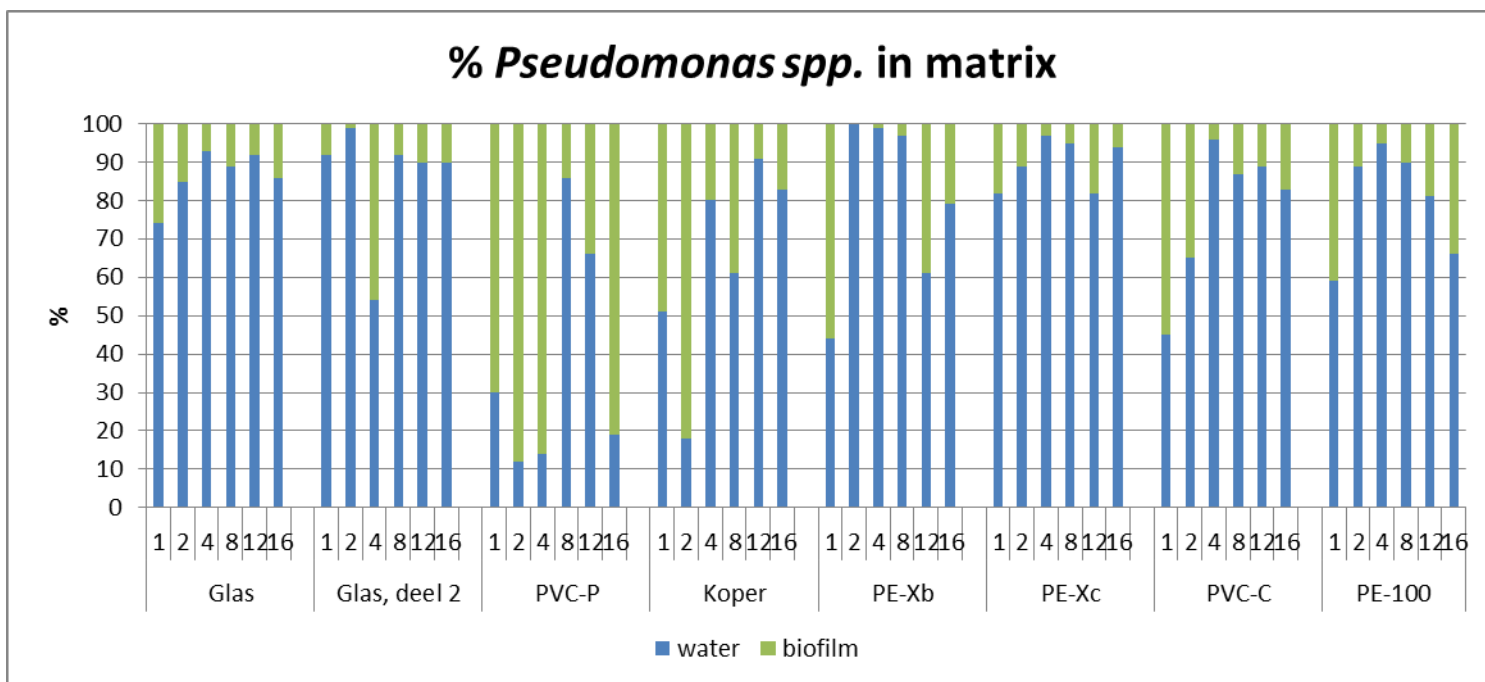
In alle biofilmmonsters werden 16S rRNA genkopieën van *Pseudomonas* spp. waargenomen (Figuur 20). De aantallen genkopieën gevonden in de biofilm van de verschillende materialen (behalve PVC-P) liggen op de meeste meetmomenten dicht bij elkaar ($10^2 - 10^3$ gk cm⁻²), alleen in week 1 en 12 kunnen de verschillende materialen beter van elkaar worden onderscheiden. De aantallen gevonden in de biofilm van de positieve controle PVC-P (gemiddeld $1,7 \times 10^6$ gk cm⁻²) zijn duidelijk hoger dan de aantallen in de biofilm van de andere materialen, maar de aantallen in de biofilm van PVC-P nemen in de verloop van de tijd af naar $5,4 \times 10^3$ gk cm⁻².



Figuur 20. De 16S rRNA genkopieën van *Pseudomonas* spp. in de tijd op de verschillende materialen gemeten tijdens de BPP-test.

3.7.3 Percentuele verdeling *Pseudomonas* spp. over water en biofilm

De percentuele verdeling van het aantal *Pseudomonas* spp. 16S rRNA genkopieën (per cm²) over de twee verschillende matrices water en biofilm is weergegeven in Figuur 21. Voor de meeste materialen, met uitzondering van PVC-P, bevinden de meeste *Pseudomonas* spp. zich in de waterfase. Voor glas deel 1 en 2, PE-Xb, PE-Xc, PVC-C en PE-100 bevindt zich 80 tot 90% van de *Pseudomonas* spp. in het water, voor koper ligt dit gemiddeld rond de 60%. Bij PVC-P bevindt zich gemiddeld rond de 40% van de *Pseudomonas* spp. in het water, behalve in week 8 en 12 dan bevindt zich 86 en 66%, respectievelijk, in het water. Bij PVC-C en PE-100 neemt vanaf week 4 het percentuele aandeel van *Pseudomonas* spp. in het water af gedurende de looptijd van de BPP-test, maar bij PVC-C is deze afname beperkt.

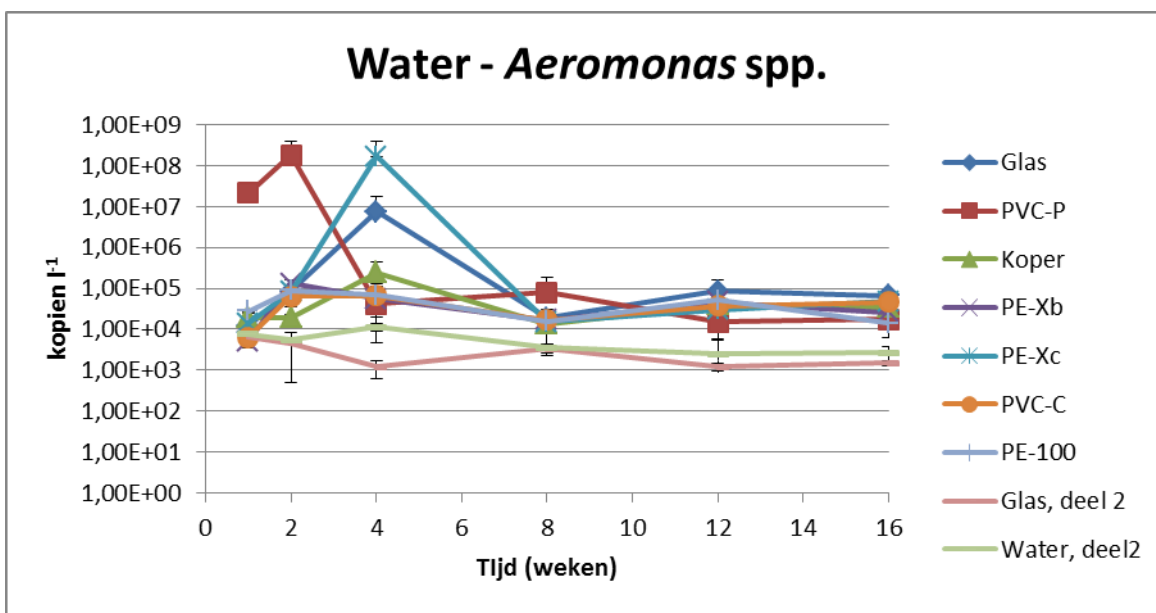


Figuur 21. Percentage van *Pseudomonas* spp. aantallen in water of biofilm per materiaal, voor de weken 1, 2, 4, 8, 12 en 16 achtereenvolgens.

3.8 *Aeromonas* spp.

3.8.1 *Aeromonas* spp. in water

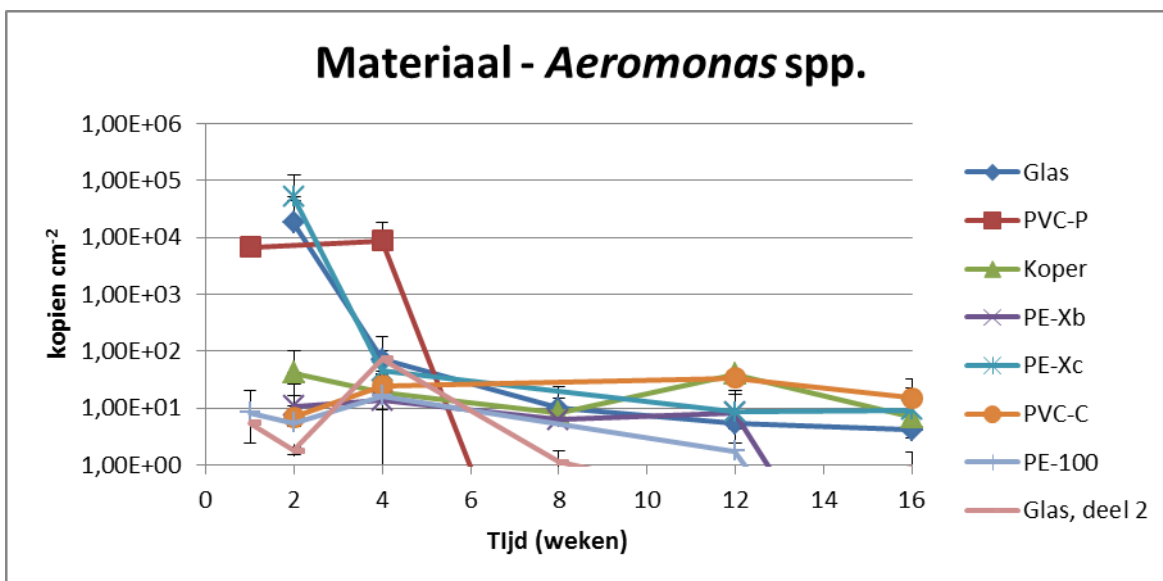
In alle watermonsters werden 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas* spp. waargenomen (Figuur 22). In het begin (t/m week 4) variëren het aantal genkopieën in het water met de verschillende materialen, maar vanaf week 8 zijn het aantal genkopieën gestabiliseerd waarbij geen verschil kan worden waargenomen tussen de materialen van deel 1. De gemiddeldes liggen rond de 10^4 gk l⁻¹. Het glas van deel 2 wijkt hier van af, de aantallen zijn een log lager, met een gemiddelde van $1,5 \times 10^3$ gk l⁻¹.



Figuur 22. De 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas spp.* in de tijd in het water van de BPP-test met verschillende materialen.

3.8.2 *Aeromonas spp.* in biofilm

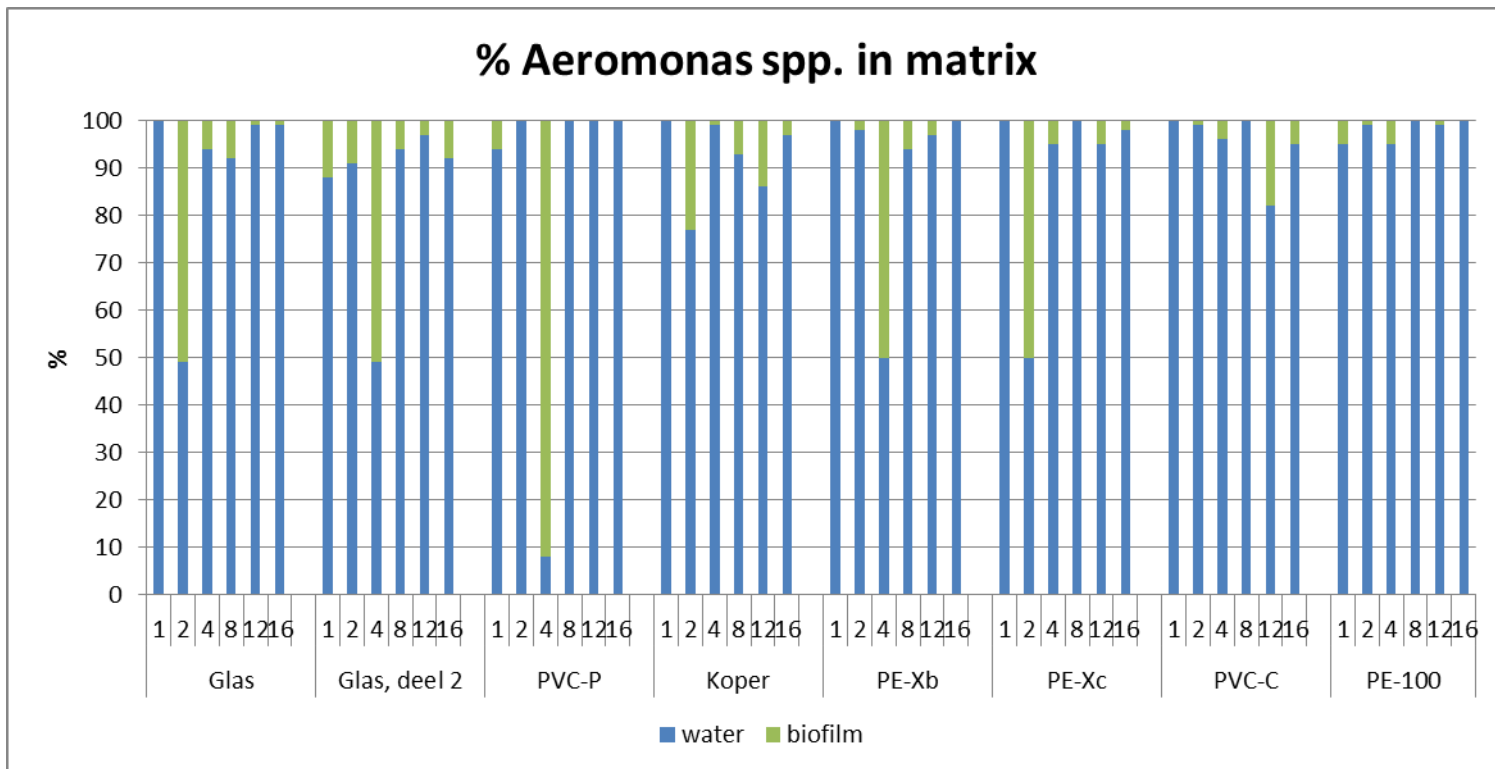
Niet in alle biofilmmonsters werden genkopieën van 16S rRNA van *Aeromonas spp.* waargenomen (Figuur 23). De *Aeromonas spp.* aantallen in de biofilm zijn erg laag, zeker in vergelijking met water. In de eerste week werd alleen in de biofilm van de materialen PVC-P, PE-100 en glas deel 2 genkopieën van *Aeromonas spp.* aangetroffen. In week 8 werden geen *Aeromonas spp.* genkopieën aangetroffen in de biofilm van de materialen PVC-P, PE-Xc, PVC-C en PE-100. In week 12 en 16 werd *Aeromonas* ook niet in de biofilm van PVC-P aangetroffen en in week 16 werd *Aeromonas* ook niet aangetroffen in de biofilm van PE-Xb en PE-100. De gemiddelde aantallen zijn tussen de 8 en 23 genkopieën per cm², als de hoge waarden niet worden meegenomen.



Figuur 23. De 16S rRNA genkopieën van *Aeromonas spp.* in de tijd in de biofilm op de verschillende materialen gemeten tijdens de BPP-test.

3.8.3 Percentuele verdeling *Aeromonas* spp. over water en biofilm

De percentuele verdeling van het aantal *Aeromonas* spp. 16S rRNA genkopieën (per cm²) over de twee verschillende matrices water en biofilm is weergegeven in Figuur 24. De meeste *Aeromonas* spp. bevinden zich in de waterfase en over het algemeen is dit percentage hoger dan 90%, zeker wanneer de aantallen zijn gestabiliseerd na 8 weken incubatie.

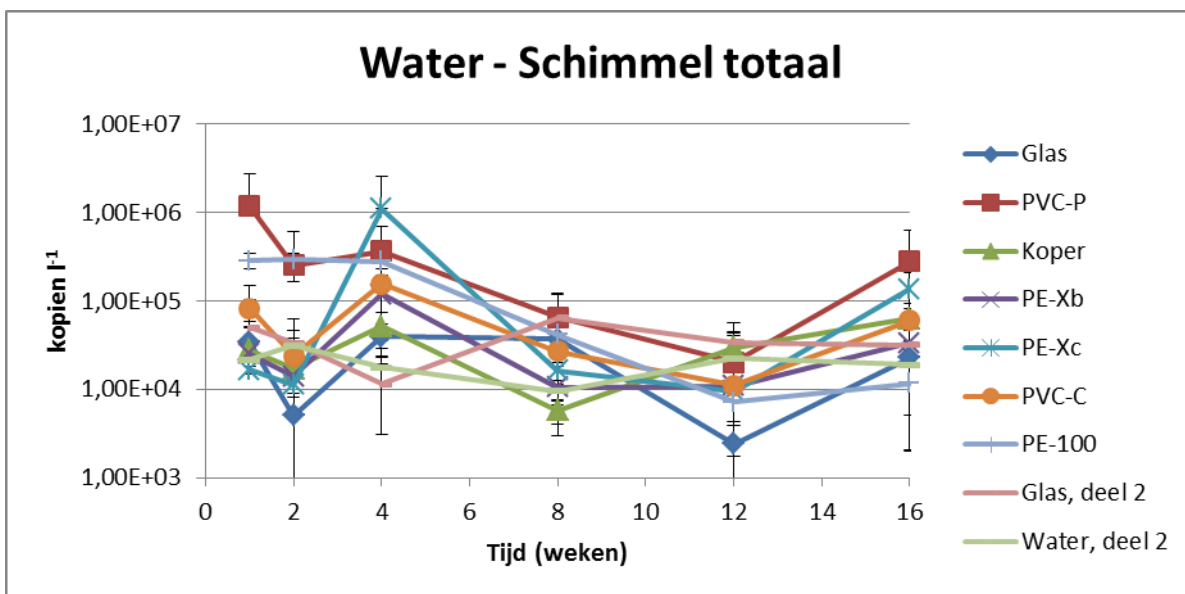


Figuur 24. Percentage van *Aeromonas* spp. aantallen in water of biofilm per materiaal, voor de weken 1, 2, 4, 8, 12 en 16 achtereenvolgens.

3.9 Schimmel totaal

3.9.1 Schimmel in water

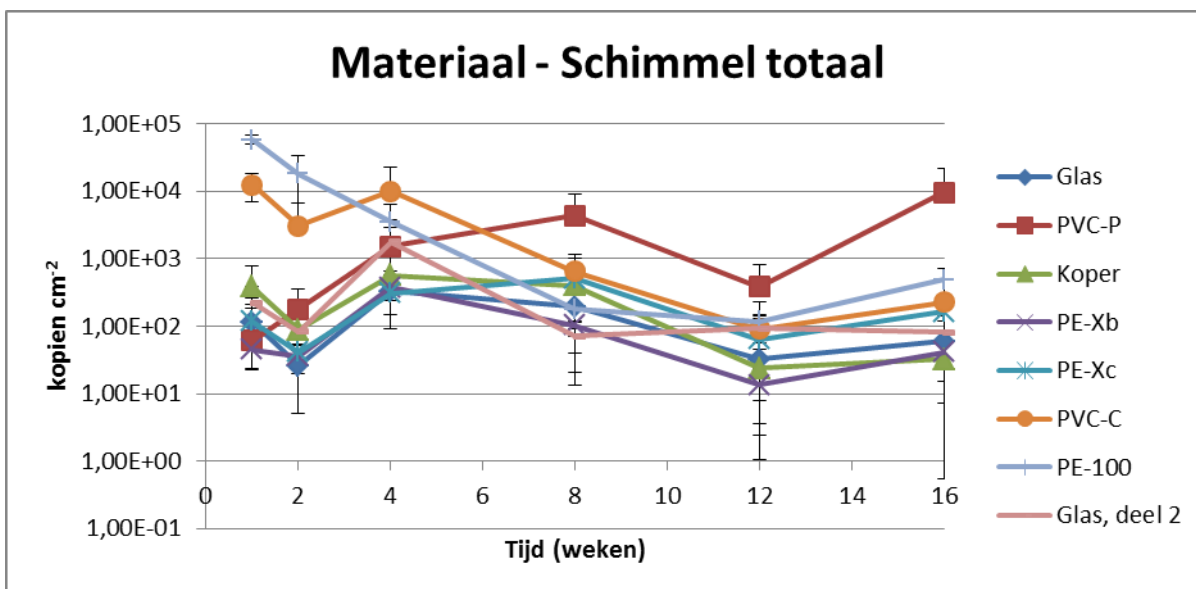
In alle watermonsters werden 18S rRNA genkopieën van schimmels waargenomen (Figuur 25). Het aantal genkopieën in het water van de positieve controle PVC-P is een log hoger ($3,6 \times 10^5$ gk l⁻¹) dan bij de negatieve controle glas ($2,3 \times 10^4$ gk l⁻¹). De overige materialen variëren in de tijd tussen deze twee uitersten, waarbij het verschil tussen geteste leidingmaterialen klein blijft. Over het algemeen lijken het aantal genkopieën te pieken na vier weken en na acht weken blijven de genkopieën grotendeels gelijk.



Figuur 25. De 18S rRNA genkopieën van Schimmel totaal in de tijd in het water van de BPP-test met verschillende materialen.

3.9.2 Schimmel in biofilm

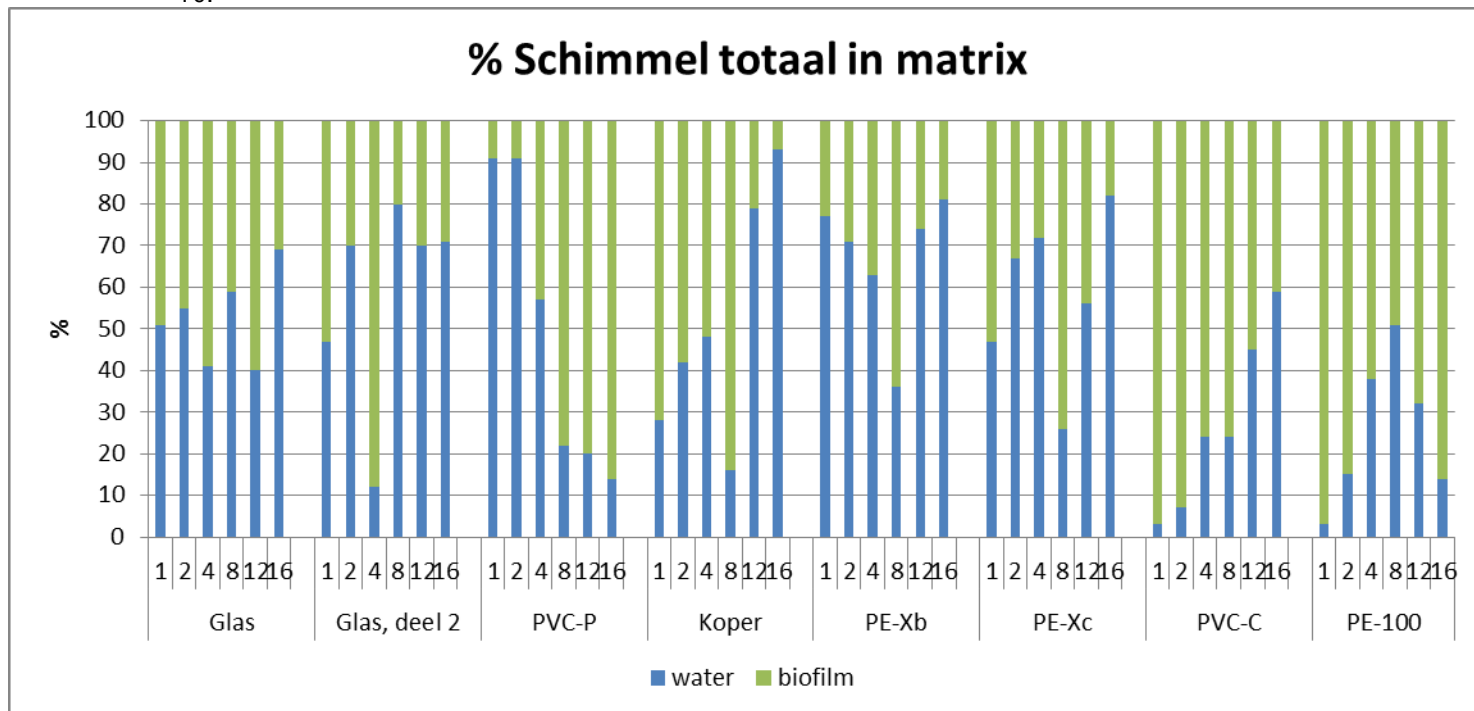
In alle biofilmmonsters werden 18S rRNA genkopieën van schimmels waargenomen (Figuur 26). Het aantal genkopieën van schimmel in de biofilm van PVC-P is duidelijk hoger ($2,7 \times 10^3$ gk cm²) dan het aantal genkopieën in de biofilm van de overige materialen. Het aantal genkopieën in de biofilm van glas, koper en PE-Xb zijn vergelijkbaar (gemiddeld $1,6 \times 10^2$ gk cm²). De genkopieën in de biofilm van de materialen PE-Xc, PVC-C en PE-100 liggen hier weer boven (gemiddeld $6,0 \times 10^3$ gk cm²). Daarnaast is te zien dat het aantal genkopieën in de biofilm van PVC-C en PE-100 afnemen gedurende de eerste 8 tot 12 weken, waarna ze stabiliseren. Terwijl de aantallen in de biofilm van PVC-P langzaam toenemen in de tijd. De andere materialen lijken weer een piek te geven na vier weken, maar deze is minder duidelijk dan voor water. De gemiddelde aantallen variëren van 1×10^2 tot 4×10^3 gk cm².



Figuur 26. De 18S rRNA genkopieën van Schimmel totaal in de tijd in de biofilm op de verschillende materialen gemeten tijdens de BPP-test.

3.9.3 Percentuele verdeling Schimmel over water en biofilm

De percentuele verdeling van het aantal schimmel 18S rRNA kopieën over de twee verschillende matrices water of biofilm is weergegeven in Figuur 27. De meeste schimmels bevinden zich percentueel gezien in de biofilm, hoewel voor de materialen glas, PE-Xb en PE-Xc een meer gelijke verdeling is waargenomen. Voor de materialen PVC-C en koper bevinden zich in de loop van de tijd steeds meer schimmels in de waterfase, van 3% en 28% (respectievelijk) in week 1 naar 59% en 93% respectievelijk in week 16. Voor PVC-P neemt juist in de tijd het aantal schimmels in water af, van 90% in week 1 en 2, naar 15% in week 16.



Figuur 27. Percentage van Schimmel totaal aantallen in water of biofilm per materiaal, voor de weken 1, 2, 4, 8, 12 en 16 achtereenvolgens.

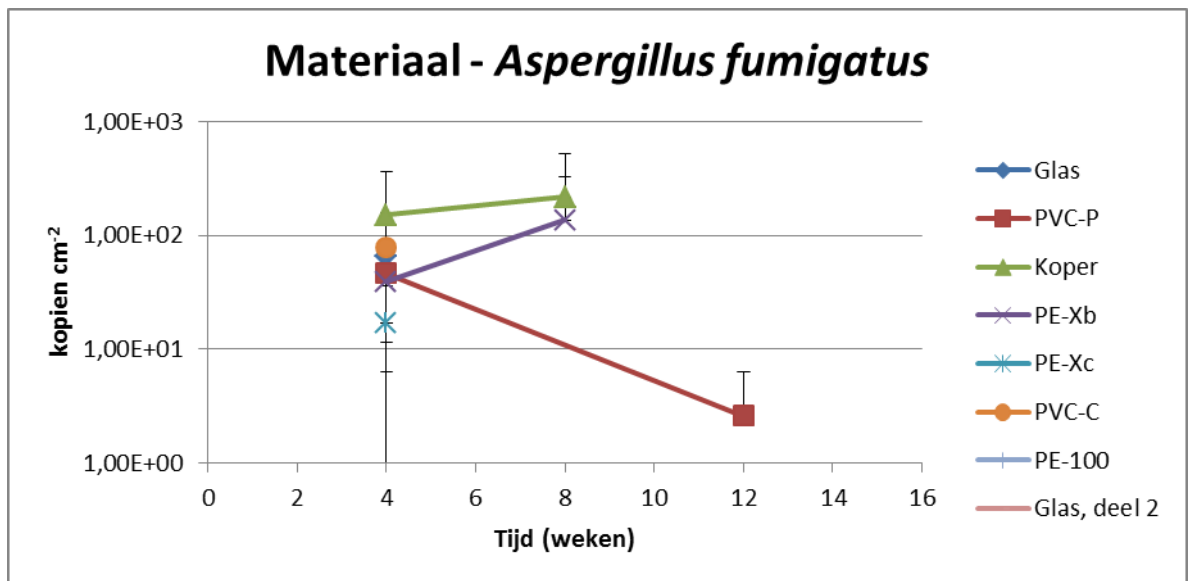
3.10 *Aspergillus fumigatus*

3.10.1 *Aspergillus fumigatus* in water

Alleen in week 4 werden 28S rRNA genkopieën van *Aspergillus fumigatus* gevonden in de watermonsters, behalve van glas en glas, deel 2. De concentraties variëren van 2×10^3 gk l⁻¹ tot 2×10^4 gk l⁻¹. Op de andere momenten lagen de aantallen onder de detectiegrens, waardoor geen betrouwbare uitspraken over invloed van materiaal en incubatietijd BPP test op *A. fumigatus* kan worden gedaan.

3.10.2 *Aspergillus fumigatus* in biofilm

In week 4 werden ook 28S rRNA genkopieën van *A. fumigatus* gevonden in de biofilm van alle materialen, behalve PE-100 en glas deel 2, zie Figuur 28. In week 8 werden alleen genkopieën van *A. fumigatus* gevonden in de biofilm van koper en PE-Xb. Op de andere momenten lagen de aantallen onder de detectiegrens.

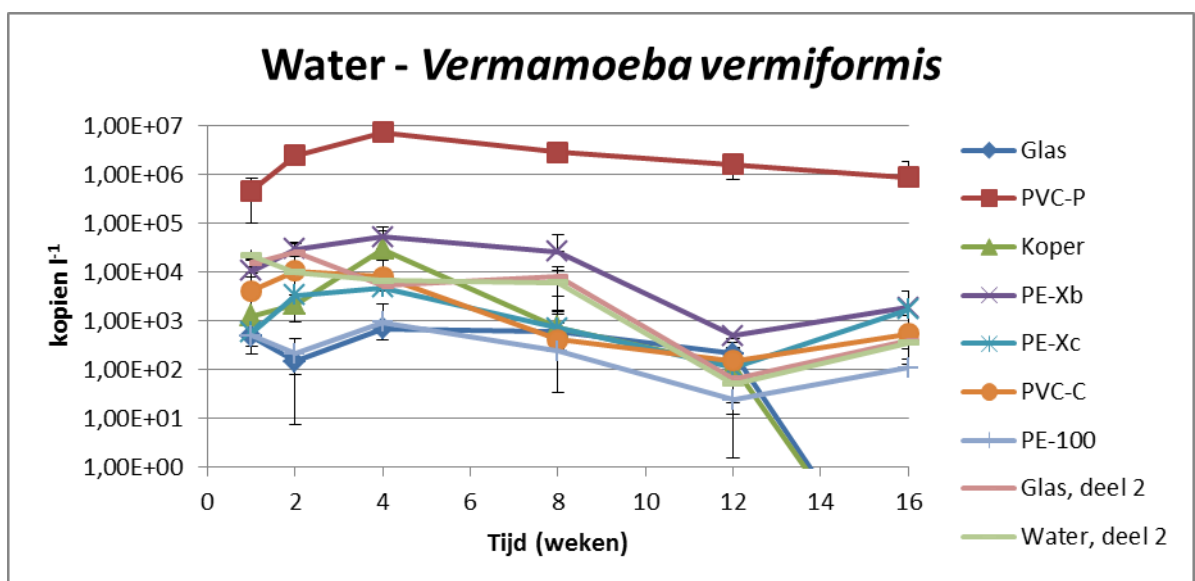


Figuur 28. De 28S rRNA genkopieën van *Aspergillus fumigatus* in de tijd in de biofilm op de verschillende materialen gemeten tijdens de BPP-test.

3.11 *Vermamoeba vermiformis*

3.11.1 *Vermamoeba vermiformis* in water

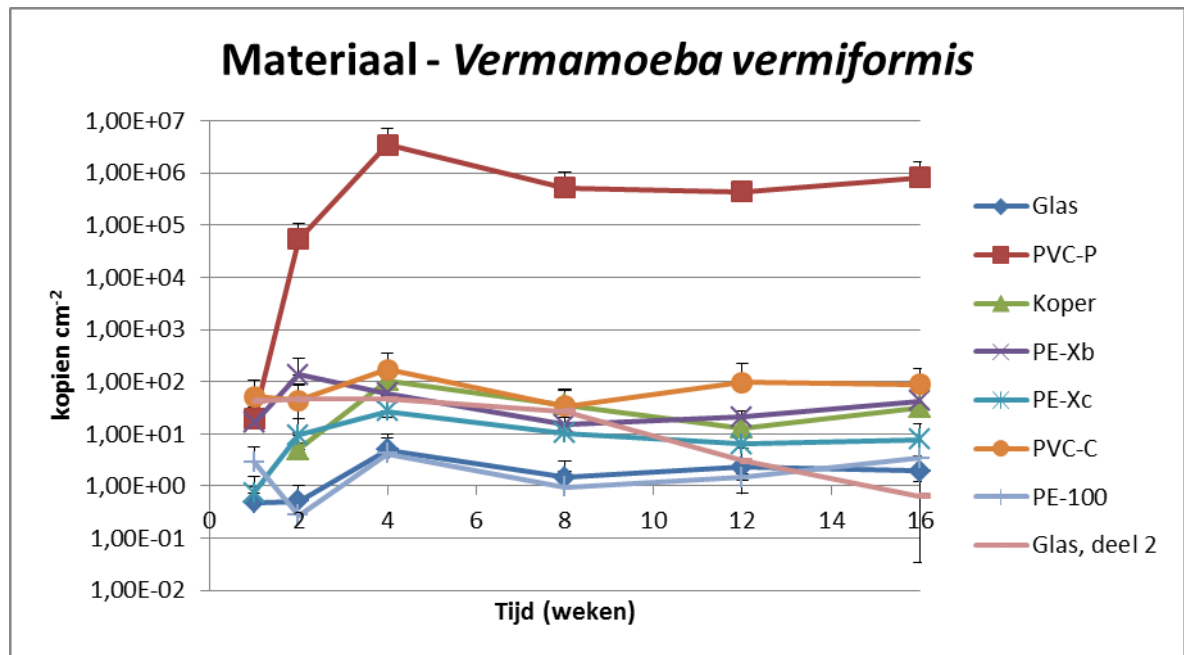
In alle watermonsters werden 18S rRNA genkopieën van *Vermamoeba vermiformis* (voorheen *Hartmanella vermiformis*) waargenomen (Figuur 29). De gemiddelde aantallen *V. vermiformis* liggen tussen de 3×10^2 gk l⁻¹ en 3×10^6 gk l⁻¹. Het aantal genkopieën in het water van PVC-P (gemiddeld $2,6 \times 10^6$ gk l⁻¹) zijn duidelijk hoger dan het aantal genkopieën in aanwezigheid van de andere materialen (gemiddeld $5,7 \times 10^3$ gk l⁻¹). De aantallen in het water van PE-Xb, PE-Xc en koper zijn hoger dan glas en PE-100. PVC-C zit hiertussen in met in het begin hoge waarden, maar lagere waarden vanaf week 8.



Figuur 29. De 18S rRNA genkopieën van *Vermamoeba vermiformis* in de tijd in het water van de BPP-test met verschillende materialen.

3.11.2 *Vermamoeba vermiformis* in biofilm

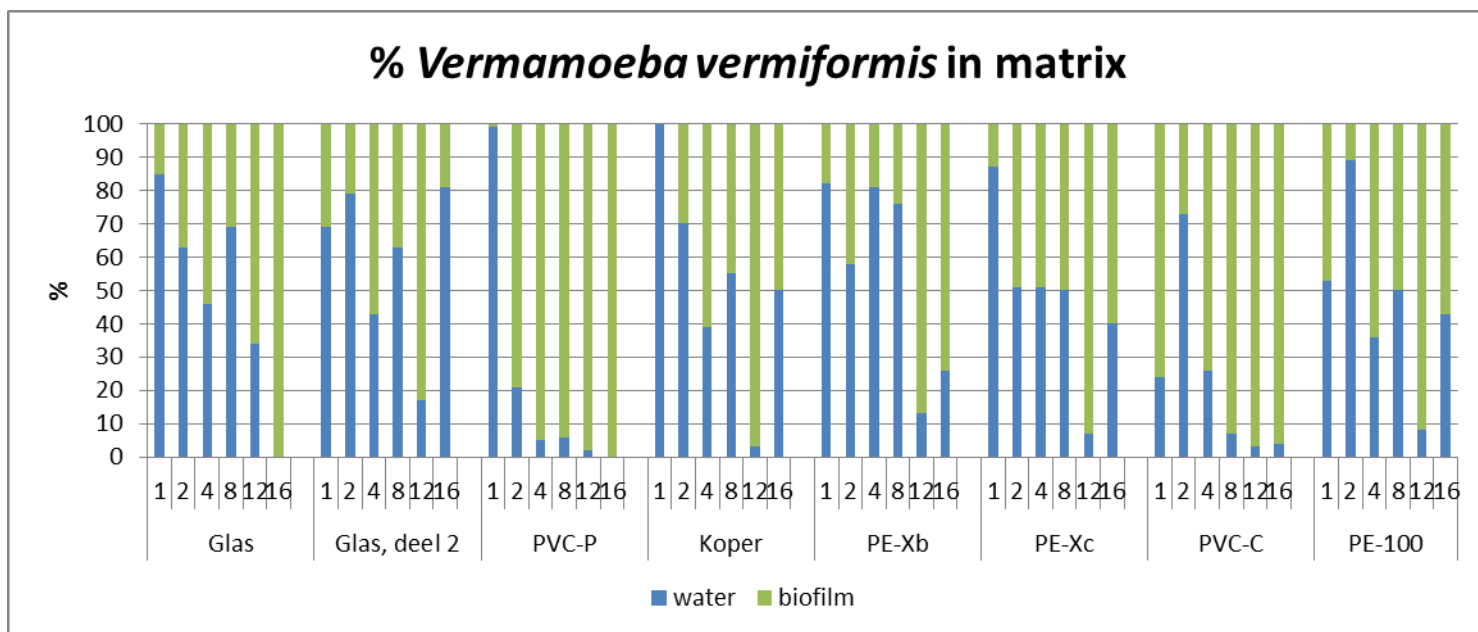
In alle biofilmmonsters werden 18S rRNA genkopieën van *V. vermiformis* waargenomen (Figuur 30). De verschillende materialen, behalve PVC-P hebben gemiddeld 10^1 gk cm⁻². Het aantal genkopieën in de biofilm van PVC-P liggen, na week 1, gemiddeld rond de 8×10^5 gk cm⁻² en zijn dus duidelijk hoger dan bij de overige materialen. In de eerste vier weken nemen het aantal genkopieën in de biofilm van PVC-P toe, waarna de aantallen stabiliseren. Het aantal genkopieën in de biofilm van de andere materialen zijn stabiel vanaf het begin, waarbij opvalt dat de aantallen in de biofilm van glas en PE-100 lager zijn dan de rest van de materialen.



Figuur 30. De 18S rRNA genkopieën van *Vermamoeba vermiformis* in de tijd in de biofilm op de verschillende materialen gemeten tijdens de BPP-test.

3.11.3 Percentuele verdeling *Vermamoeba vermiformis* over water en biofilm

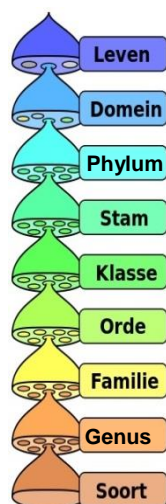
De percentuele verdeling van het aantal *Vermamoeba vermiformis* 18S rRNA genkopieën over de twee verschillende matrices water en biofilm is weergegeven in Figuur 31. Bij de meeste materialen is de trend dat de meeste *V. vermiformis* in de loop van de tijd meer in de biofilm wordt aangetroffen. In week 16 zit meer dan 50% van *V. vermiformis* in de biofilm van alle materialen. Voor PVC-C en PVC-P is dit percentages zelfs hoger dan 95%, terwijl bij PE-100 (waar de minste groei is waargenomen) de verdeling meer fifty-fifty is.



Figuur 31. Percentage van *Vermamoeba vermiformis* aantallen in water of biofilm per materiaal, voor de weken 1, 2, 4, 8, 12 en 16 achtereenvolgens.

3.12 NGS

De NGS analyses in dit onderzoek hebben geresulteerd in gemiddeld 164.884 DNA-sequenties per monster van hoge kwaliteit met een spreiding van 50.784, een maximum aantal van 309.016 sequenties per monster en een minimum aantal van 21.192 sequenties per monster.



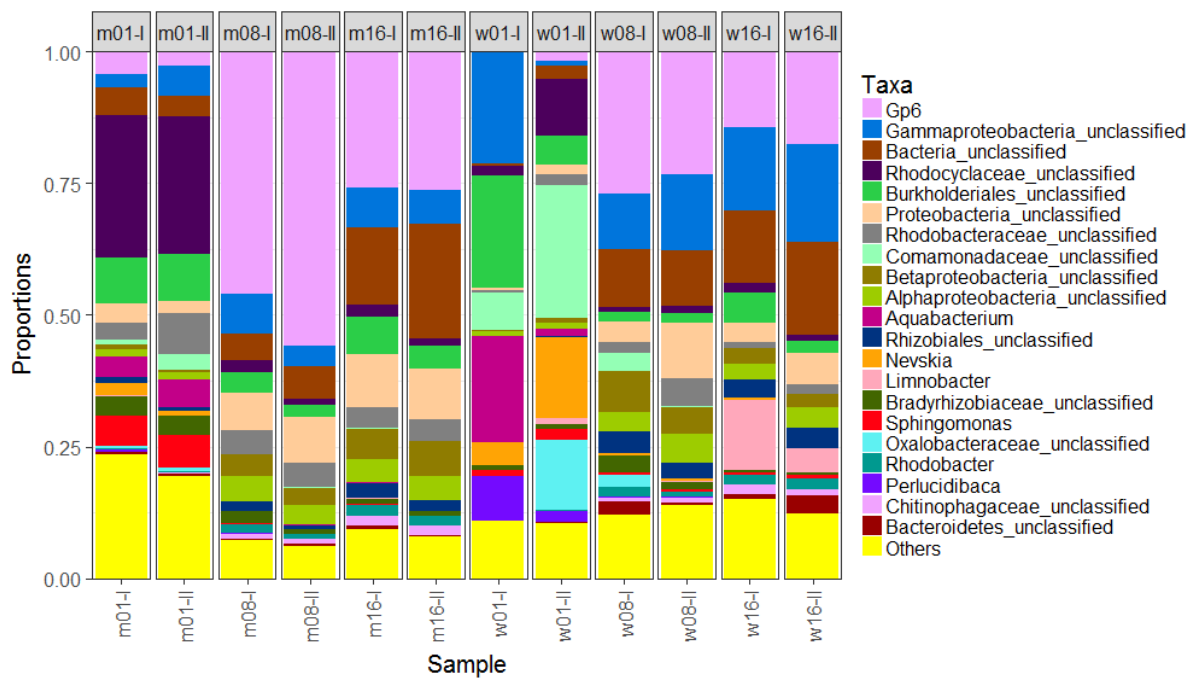
rarchie van de acht belangrijkste taxonomische rangen. Tussenliggende rangen zijn niet afgebeeld.

De NGS analyses geven een uitgebreid beeld van de samenstelling van de bacteriepopulatie die in een monster aanwezig is. Om te bepalen welke bacteriële groepen in de monsters aanwezig zijn, is gebruik gemaakt van het programma MOTHUR (Schloss et al. 2009). Dit programma zorgt voor verbetering van de sequentiedata door eerst een aantal stappen uit te voeren waarin eventuele fouten uit de sequentiedata worden verwijderd, vervolgens wordt een programma toegepast waarmee chimere sequenties (artefacten die t.g.v. de PCR-reacties kunnen ontstaan) worden verwijderd. Na deze verbeteringsstappen worden sequenties ingedeeld in "Operational Taxonomic Units" (OTU's) waarbij alle 16S rRNA gensequenties met een sequentieovereenkomst van minimaal 97% ingedeeld worden binnen één OTU. Ten

slotte gaat het programma in een database op zoek naar 16S rRNA gensequenties van geïdentificeerde bacteriën die overeenkomen met de sequenties van de OTU's uit de dataset en gebruikt deze vergelijking voor taxonomische identificatie van de 16S rRNA gensequenties (Figuur 32). Bij fylogtypering wordt elke sequentie vergeleken met een referentiesequentiedatabase die internationaal beschikbaar is en vervolgens ingedeeld of op naam gebracht op basis van de gelijkenis met de referentiesequentie. Het taxonomisch niveau waarop de sequentie op naam kan worden gebracht hangt af van de aanwezigheid van overeenkomende sequenties in de referentiedatabase. Indien op bijvoorbeeld genusniveau een overeenkomende referentiesequentie ontbreekt, maar op familieniveau wel een overeenkomende referentiesequentie aanwezig is, dan zal de sequentie op genusniveau als "onbekend/unclassified" worden getypeerd, maar op familieniveau wel tot een familienaam kunnen worden benoemd. De betrouwbaarheid en volledigheid van fylogtypering hangt af van de beschikbare referentiedatabase. Voor het geanalyseerde 16S rRNA genfragment is de referentiedatabase goed en is de identificatie van de sequenties betrouwbaar. Identificatie tot genusniveau is vaak niet mogelijk door het (nog) ontbreken van overeenkomende soorten in de database. Daarnaast is het geanalyseerde stuk 16S rRNA gen te kort om de sequenties tot soortniveau in te kunnen delen. Er zijn totaal 535 unieke OTU's in de monsters van de materialentest aangetroffen.

3.12.1 Glas

Figuur 33 laat de top 21 zien van meest dominante bacteriegroepen (tot waar mogelijk op genusniveau) aanwezig in de kolven I en II, gedurende weken 1, 8 en 16 in de biofilm (m) of in het water (w). Iedere kleur staat voor een andere bacteriegroep. De overige bacteriegroepen, die niet tot de top 21 horen, worden in de groep 'others' samengevoegd. Er zijn geen bacteriegroepen uniek voor het materiaal glas, want de bacteriën die voorkomen in het water of biofilm van glas worden ook teruggevonden bij de andere materialen. De bacteriesamenstelling van de biofilm op glas verandert in de tijd. De samenstelling na week 1 is anders dan na week 8 en na week 16 is dit weer anders, maar de veranderingen tussen week 1 en 8 zijn groter dan tussen week 8 en 16. De bacteriegroepen Rhodocyclaceae, *Aquabacterium* en *Sphingomonas* zijn redelijk dominant na week 1, maar vrijwel niet meer aanwezig na week 8 en week 16. Na week 8 is Acidobacteria GP6 erg dominant, maar deze is weer lager na week 16 waar unclassified Bacteria dominant is. De waterduplo's na week 1 zijn behoorlijk verschillend, met Gammaproteobacteria, Burkholderiales en *Aquabacterium* dominant in kolf I en Rhodocyclaceae, Comamonadaceae, *Nevskia* en Oxalobacteraceae in kolf 2. Na 8 en 16 weken zijn de populaties wel weer vergelijkbaar in het water. Na 8 en 16 weken is te zien dat Acidobacteria GP6, Gammaproteobacteria_unclassified en Bacteria_unclassified dominant zijn geworden. Daarnaast zie je na week 1 weinig overeenkomsten in de bacteriegroepsamenstelling tussen water en biofilm, terwijl dit na 8 en 16 weken wel meer te zien is.

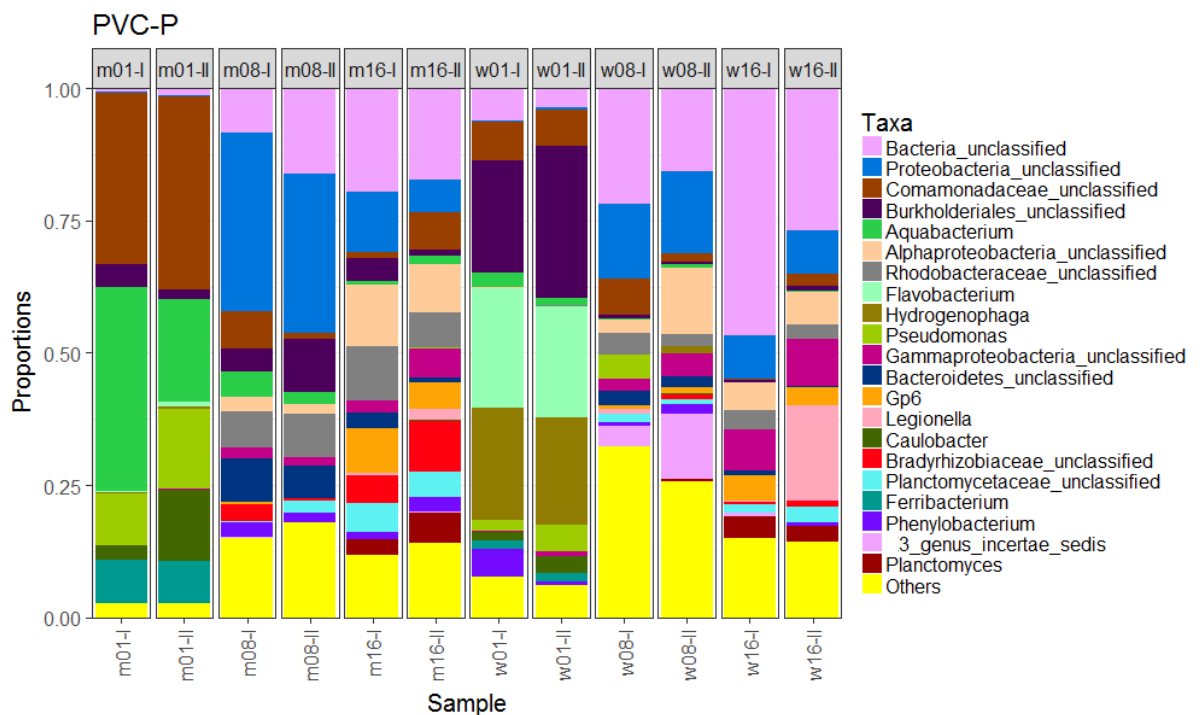


Figuur 33. Top 21 van de aanwezige bacteriegroepen in kolven I en II, gedurende weken 1, 8 en 16 in de biofilm (m) of in het water (w) met glas als materiaal.

3.12.2 PVC-P

De volgende bacteriën zijn uniek voor het materiaal PVC-P: *Pseudomonas*, *Legionella*, Planctomycetaceae_unclassified (tot family geclassificeerd), *Phenylbacterium*, Subdivision 3_genus_incertae_sedis (van phylum Verrucomicrobia) en *Planctomyces*.

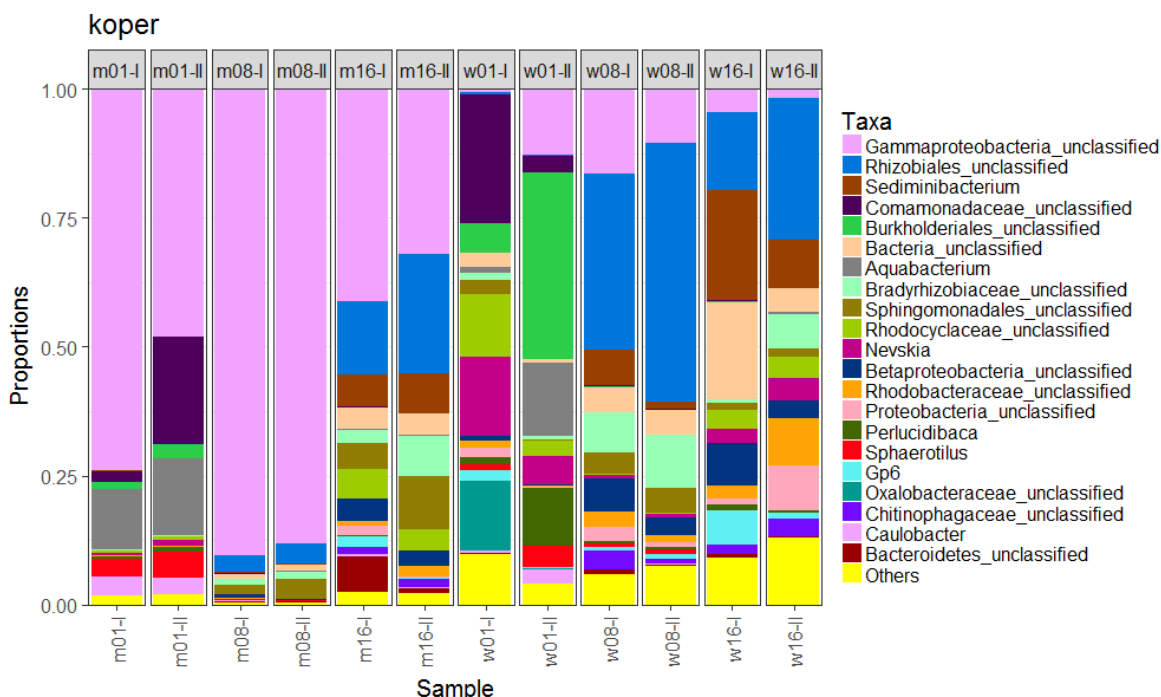
De bacteriesamenstelling van de biofilm op PVC-P verandert in de tijd, zie Figuur 34. De samenstelling van de bacteriegroepen na week 1 is anders dan na week 8 en na week 16 is dit weer anders, maar de veranderingen tussen week 1 en 8 zijn groter dan tussen week 8 en 16. De bacteriegroepen *Aquabacterium*, *Pseudomonas* en *Caulobacter* zijn redelijk dominant na week 1, maar vrijwel niet meer aanwezig na week 8 en week 16. Na week 8 is Proteobacteria_unclassified dominant, maar deze is weer lager na week 16 waar Alphaproteobacteria_unclassified dominant is. In het water na week 1 zijn de bacteriegroepen *Flavobacterium* en *Hydrogenophaga* dominant. Na week 8 en 16 zijn Proteobacteria_unclassified en Bacteria_unclassified dominant. De bacteriegroepen *Caulobacter* en *Ferribacterium* komen alleen in week 1 voor, zowel in water als in biofilm. *Phenylbacterium* komt in week 1 niet in de biofilm voor, maar wel in het water. In de andere weken komt *Phenylbacterium* wel voor in de biofilm en meer dan in het water. *Planctomyces* komt alleen in week 16 voor.



Figuur 34. Top 21 van de aanwezige bacteriegroepen in kolven I en II, gedurende weken 1, 8 en 16 in de biofilm (m) of in het water (w) met PVC-P als materiaal.

3.12.3 Koper

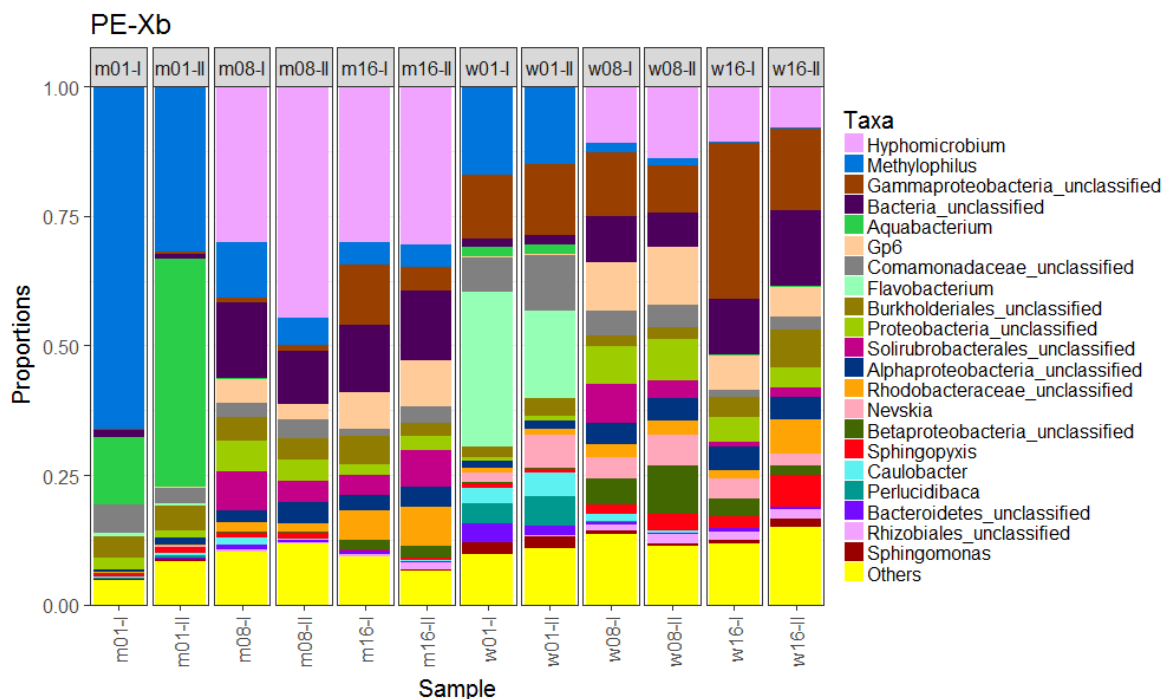
De volgende bacteriën zijn uniek voor het materiaal koper: *Sediminibacterium* en Sphingomonadales_unclassified (tot order geassocieerd). Relatief veel Gammaproteobacteria_unclassified worden er aangetroffen, vooral in de biofilm. De bacteriesamenstelling van de biofilm op koper verandert in de tijd, zie Figuur 35. De samenstelling na week 1 is anders dan na week 8 en na week 16 is dit weer anders, maar de veranderingen tussen week 1 en 8 zijn groter dan tussen week 8 en 16. De bacteriegroepen Gammabacteria_unclassified, Comamonadaceae en *Aquabacterium* zijn redelijk dominant na week 1, maar vrijwel niet meer aanwezig na week 8 en week 16 op Gammabacteria_unclassified na. Na week 8 is Gammabacteria_unclassified erg dominant, maar deze is weer lager na week 16 waar Rhizobiales_unclassified dominant is. In het water na week 1 zijn de bacteriegroepen Burkholderiales_unclassified en *Nevskia* dominant. De waterduplo's na week 1 zijn behoorlijk verschillend, met Comamonadaceae, Rhodocyclaceae, *Nevskia* en Oxalobacteraceae dominant in kolf I en Burkholderiales, *Aquabacterium* en *Perluclidibaca* dominant in kolf 2. Na week 8 en 16 zijn Rhizobiales_unclassified en *Sediminibacterium* dominant. De diversiteit lijkt lager te zijn, veel Gammaproteobacteria_unclassified in de biofilm. Ook zijn de bacteriegroepen die in het water worden aangetroffen een minder goede afspiegeling van de biofilm. Dit zou kunnen duiden dat op koper minder uitwisseling optreedt tussen bacteriën van de biofilm en water.



Figuur 35. Top 21 van de aanwezige bacteriegroepen in kolven I en II, gedurende weken 1, 8 en 16 in de biofilm (m) of in het water (w) met koper als materiaal.

3.12.4 PE-Xb

De volgende bacteriegroep is uniek voor het materiaal PE-Xb: *Methylophilus*. De bacteriesamenstelling van de biofilm op PE-Xb verandert in de tijd, zie Figuur 36. De samenstelling na week 1 is anders dan na week 8 en na week 16 is dit weer anders, maar de veranderingen tussen week 1 en 8 zijn groter dan tussen week 8 en 16. De bacteriegroepen *Methylophilus* en *Aquabacterium* zijn dominant na week 1, na week 8 en 16 komt *Methylophilus* nog voor in de top 21, maar *Aquabacterium* niet. In het water na week 1 is de bacteriegroep *Flavobacterium* dominant, maar wordt niet meer aangetroffen na week 8 en 16. *Methylophilus* komt in alle monsters voor op alle tijdstippen, maar neemt af in de tijd. *Sphingopyxis* komt meer in water voor, en neemt toe in de tijd. *Perlucidibaca* komt alleen na week 1 in het water. *Sphingomonas* wordt het meeste gevonden in het water.

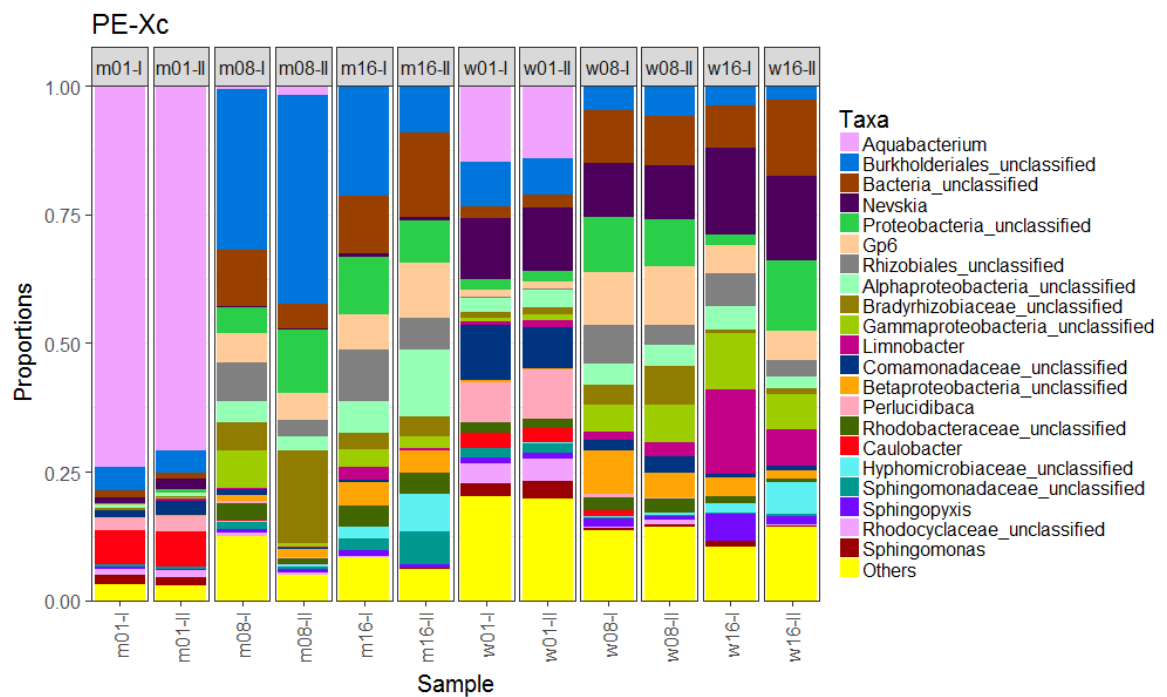


Figuur 36. Top 21 van de aanwezige bacteriegroepen in kolven I en II, gedurende weken 1, 8 en 16 in de biofilm (m) of in het water (w) met PE-Xb als materiaal.

3.12.5 PE-Xc

De volgende bacteriegroep is uniek voor het materiaal PE-Xc:

Sphingomonadaceae_unclassified (tot family geassocieerd). De biofilm op PE-Xc na 1 week incubatie in de BPP-test had een bacteriesamenstelling die in beide kolven werd gedomineerd door *Aquabacterium* en in mindere mate *Caulobacter* en *Burkholderiales*, zie Figuur 37. Na 8 en 16 weken was de bacteriesamenstelling van de biofilm echter danig veranderd en waren *Aquabacterium* en *Caulobacter* vrijwel niet meer aanwezig in de biofilm. *Burkholderiales*, *Bacteria_unclassified*, *Proteobacteria_unclassified*, *GP6*, *Rhizobiales_unclassified* en *Gammaproteobacteria_unclassified* waren op dat moment de dominante bacteriegroepen in de biofilm. De bacteriegroepen in het drinkwater waren na 1 week duidelijk van andere samenstelling dan die in de biofilm, terwijl op week 8 en 16 de samenstelling van de bacteriegroepen wel meer vergelijkbaar was tussen biofilm en water.

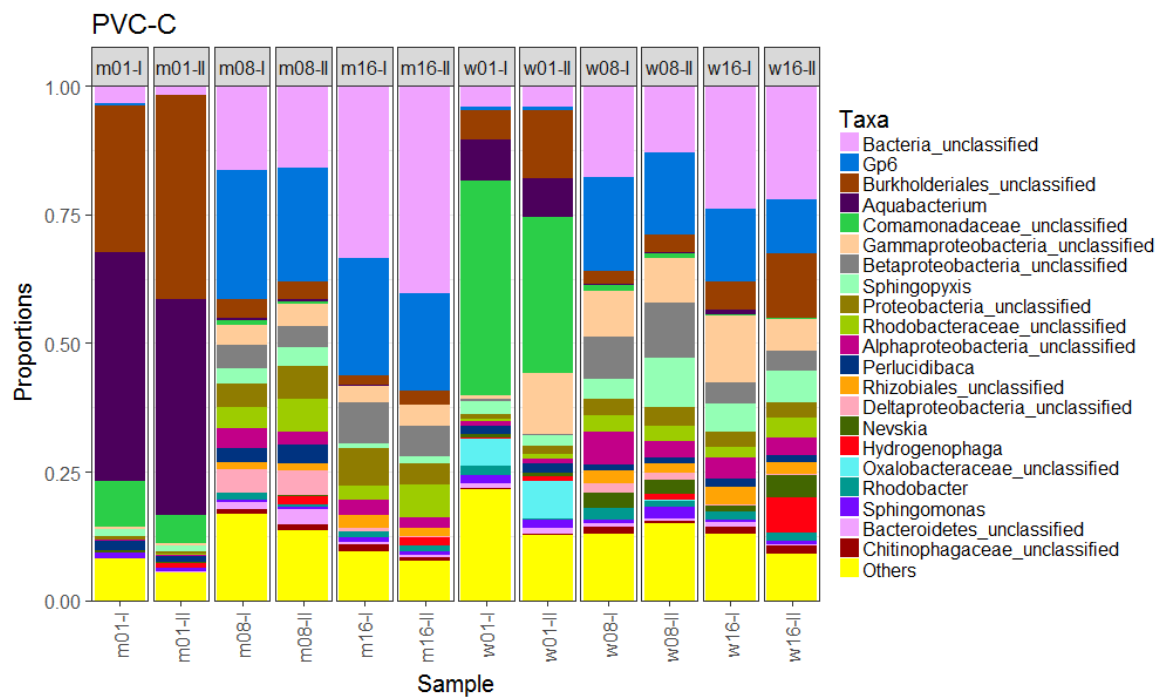


Figuur 37. Top 21 van de aanwezige bacteriegroepen in kolven I en II, gedurende weken 1, 8 en 16 in de biofilm (m) of in het water (w) met PE-Xc als materiaal.

3.12.6 PVC-C

De volgende bacteriegroep is uniek voor het materiaal PVC-C:

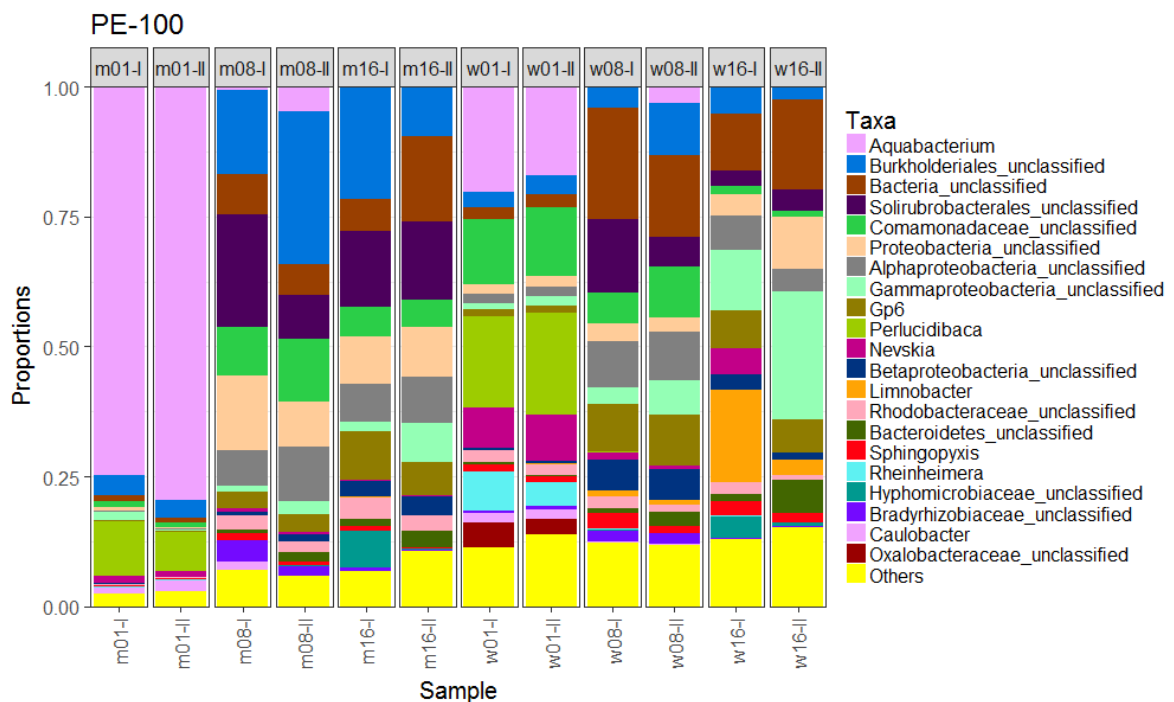
Deltaproteobacteria_unclassified (tot klasse geclassificeerd). De biofilm op PVC-C werd na 1 week gedomineerd door Burkholderiales_unclassified en *Aquabacterium*, zie Figuur 38. Na 8 en 16 weken was de bacteriesamenstelling veranderd en werd *Aquabacterium* nauwelijks teruggevonden. Na 8 en 16 weken waren er meer Bacteria_unclassified.



Figuur 38. Top 21 van de aanwezige bacteriegroepen in kolven I en II, gedurende weken 1, 8 en 16 in de biofilm (m) of in het water (w) met PVC-C als materiaal.

3.12.7 PE-100

De volgende bacteriegroep is uniek voor het materiaal PE-100: *Rheinheimera*. De bacteriesamenstelling van de biofilm op het materiaal verandert in de tijd, zie Figuur 39. De samenstelling na week 1 is anders dan na week 8 en na week 16 is dit weer anders, maar de veranderingen tussen week 1 en 8 zijn groter dan tussen week 8 en 16. Na week 1 zijn *Aquabacterium* en *Perlucidibaca* dominant in de biofilm, maar deze groepen worden na week 8 en 16 amper teruggevonden. In het water zijn *Perlucidibaca* en *Rheinheimera* dominant na week 1 en worden na week 8 en 16 amper teruggevonden. Daarnaast zie je na week 1 weinig overeenkomsten tussen water en biofilm, terwijl dit na 8 en 16 weken wel meer te zien is.

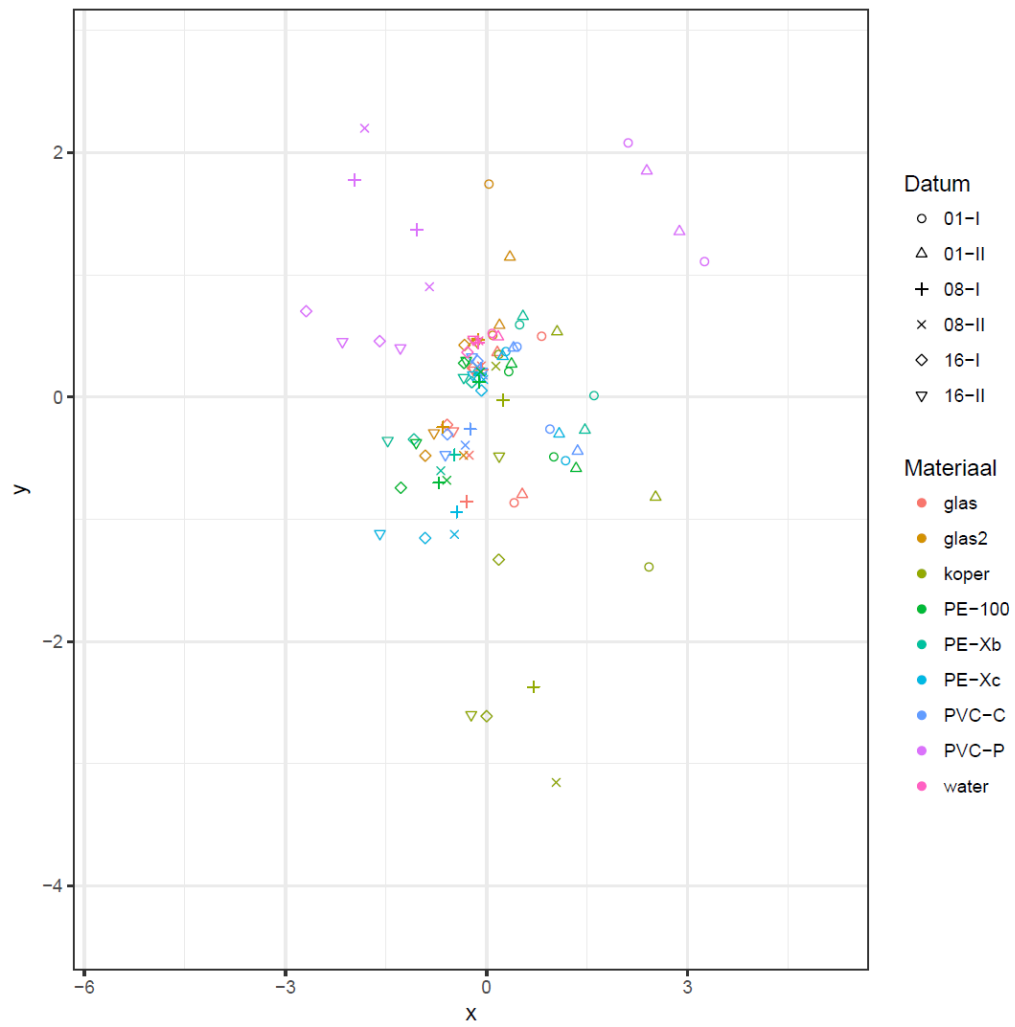


Figuur 39. Top 21 van de aanwezige bacteriegroepen in kolven I en II, gedurende weken 1, 8 en 16 in de biofilm (m) of in het water (w) met PE-100 als materiaal.

De meeste materialen laten dus dezelfde trend zien: na week 1 is de samenstelling van de bacteriegroepen in biofilm of in water op genusniveau anders dan na week 8 en week 16 in biofilm of water. Ook tussen week 8 en 16 zijn verschillen, maar die zijn beduidend kleiner dan verschil tussen week 1 en week 8. Daarnaast is na week 1 de samenstelling van de bacteriegroepen op genusniveau ook anders tussen water en biofilm, terwijl na week 8 en week 16 de samenstelling tussen water en biofilm veel meer op elkaar lijkt. Dit laat dus zien dat in het begin de bacteriepopulaties in de biofilm en water nog weinig stabiel zijn en dat in de tijd deze bacteriepopulaties stabiel worden. Dit kan bijvoorbeeld komen doordat in de eerste periode gemakkelijk afbreekbare stoffen die op de materialen aanwezig zijn worden afgebroken en dat na 8 tot 16 weken dergelijke stoffen door bacteriën zijn omgezet en de bacteriën groeien op de moeilijker afbreekbare verbindingen die uit het materiaal komen. Dat is ook wat eerder is waargenomen op basis van ATP (hogere ATP-concentraties na 1 week dan na 8 tot 16 weken).

3.12.8 Alle monsters

De bacteriesamenstelling tussen de verschillende monsters (materialen, biofilm/water en de verschillende meetmomenten) is ook op OTU niveau bepaald en is weergegeven in een Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot van alle OTU's (Figuur 40). NMDS is een manier om het niveau van gelijkheid van individuele monsters te visualiseren in een dataset (des te dichter monsterpunten bij elkaar liggen, des te meer de bacteriesamenstelling vergelijkbaar zijn). Uit Figuur 40 volgt dat de bacteriesamenstelling van de een deel van de kopermonsters en de PVC-P monsters afwijken van de andere materialen, de monsters van de overige materialen clusteren meer samen en hebben dus bacteriesamenstellingen die meer op elkaar lijken. Binnen dit cluster wordt wel gezien dat de monsters in twee subclusters uiteenvallen. Een subcluster waarin de meeste water- en biofilmmonsters van week 1 vallen en een subcluster waarin de meeste water- en biofilmmonsters van week 8 en 16 vallen. Dit betekent dat de bacteriesamenstelling van week 1 van de meeste materialen onderling meer op elkaar lijken dan de bacteriesamenstelling van week 8 of 16 op een bepaald materiaal.



Figuur 40. NMDS van alle OTU's van alle weken (verschillende symbolen) en materialen (verschillende kleuren).

4 Praktijkmonsters resultaten

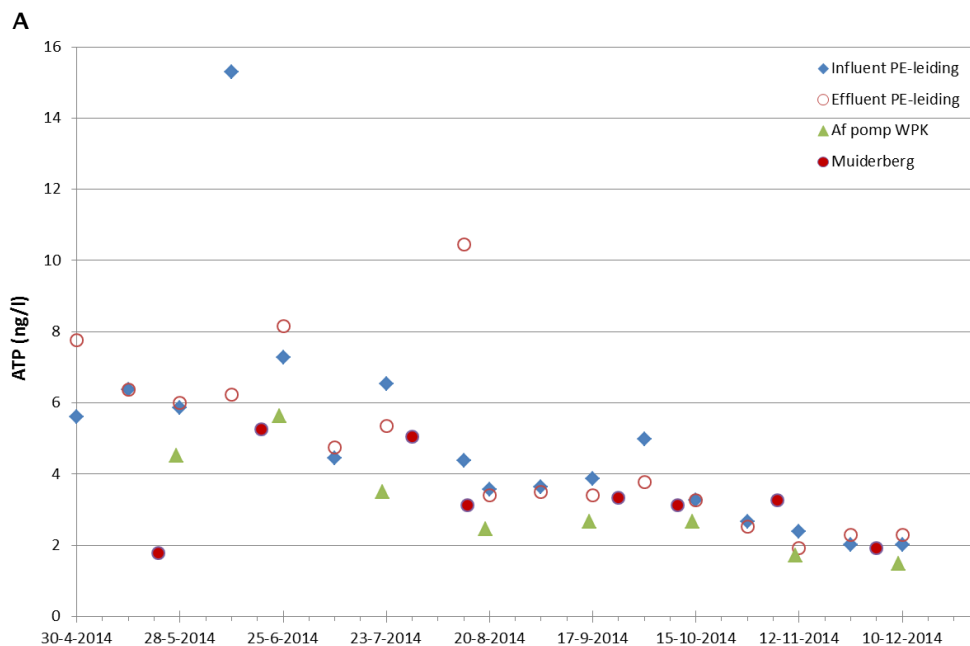
4.1 Bloemendalerpolder

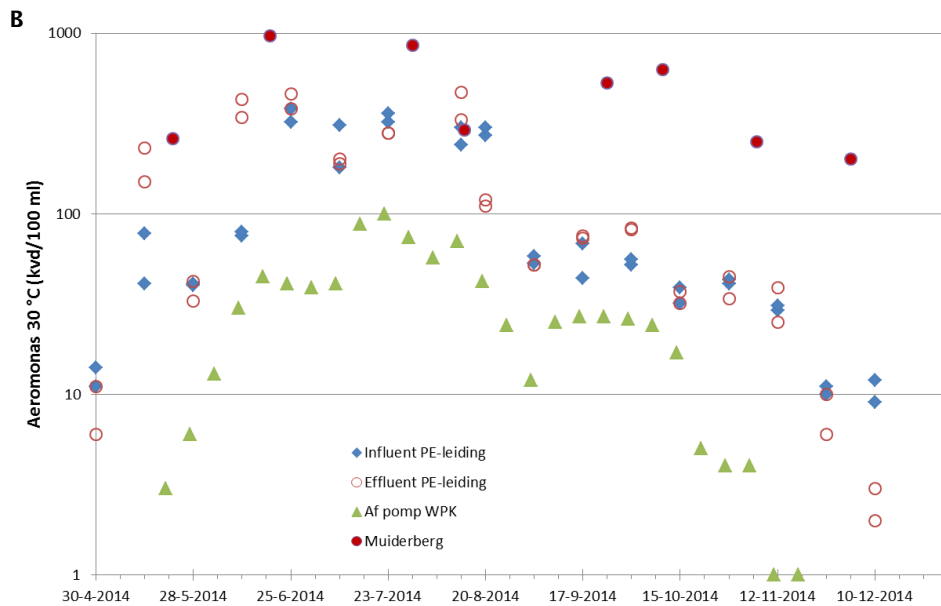
Van april 2016 tot juli 2016 is er tijdelijk een 200 mm PE-leiding aangelegd, waar bij het begin en einde coupons van PE en PVC-U zijn geplaatst, voor verdere informatie zie paragraaf 2.2

4.2 Watermonsters

4.2.1 2014

In 2014 zijn er watermonsters genomen van het begin-, en eindpunt m.b.v. monsterkasten die daar zijn geplaatst. Deze watermonsters zijn geanalyseerd op *Aeromonas* en op ATP (HWL) (Figuur 41). Te zien is dat de ATP concentratie vanaf 30 april 2014 afloopt in de tijd tot 10 december 2014. Over het algemeen zijn de ATP concentraties in het influent en effluent vergelijkbaar met elkaar, met een paar keer een uitschieter. De *Aeromonas* aantallen laten in mei een toename zien en deze *Aeromonas* aantallen dalen weer in oktober en november. Een seizoensinvloed is dus zichtbaar voor *Aeromonas* concentraties.



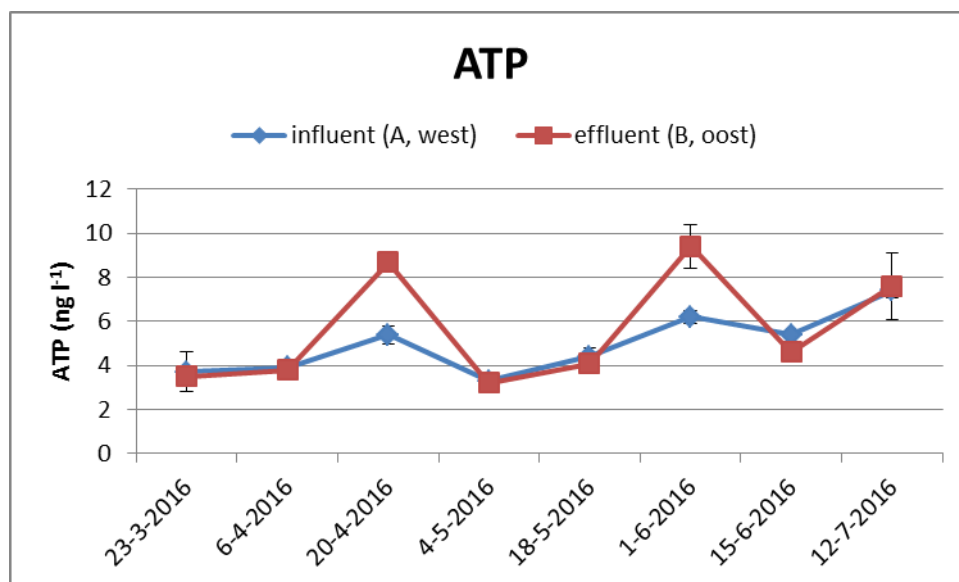


Figuur 41. ATP concentratie (A) en *Aeromonas* aantallen (B) van de watermonsters aan het begin (influent), het eind (effluent) van de tijdelijke leiding, reinwater van Weesperkarspel (Af pomp WPK) en in voorzieningsgebied Muiderberg.

4.2.2 2016

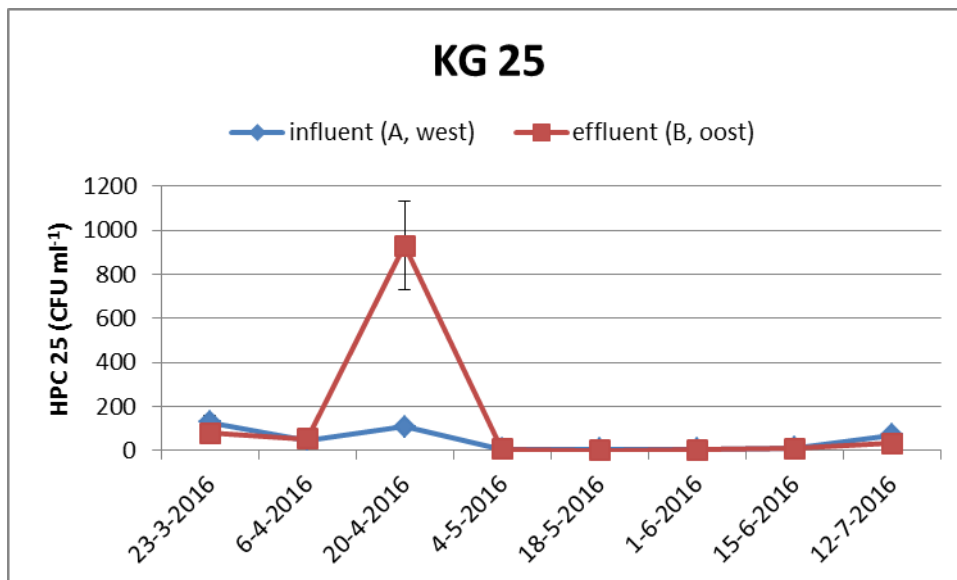
ATP

De ATP-concentratie van het influent van de tijdelijke leiding was relatief constant van maart t/m mei 2016 en daarna nam de concentratie toe tot juli 2016 (einde van de metingen) (Figuur 42). De ATP-concentratie van het effluent volgt ook dit patroon, maar op 20-4-2016 en 1-6-2016 piekte de ATP-concentratie en was op die momenten 3 tot 3,5 ng ATP l⁻¹ hoger dan de ATP-concentratie van het influent.



Figuur 42. ATP concentratie van de watermonsters aan het begin (A) en het eind (B) van de tijdelijke leiding.

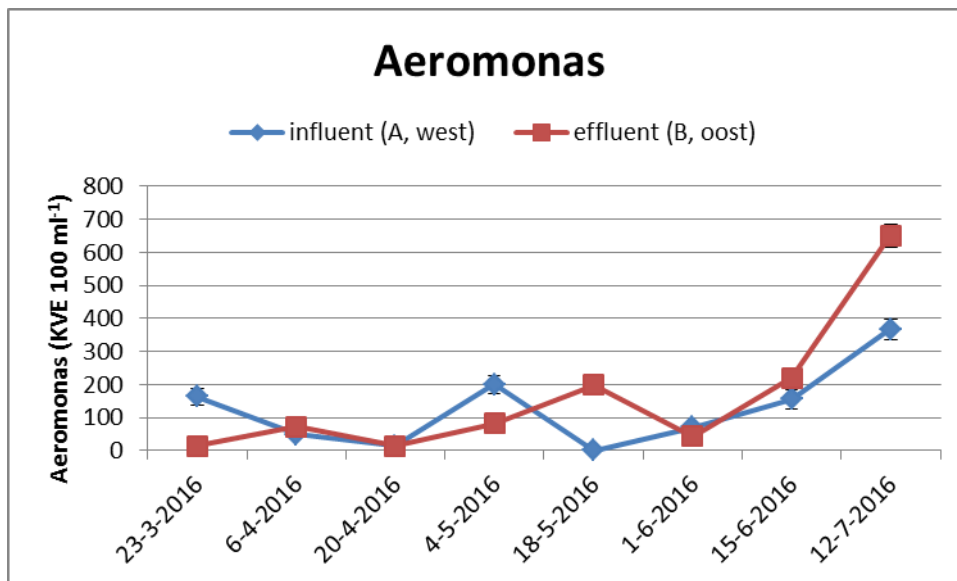
De KG25 aantallen in het influent en effluent waren gedurende maart – juli 2016 relatief constant met aantallen die varieerde tussen de 1,7 en 130 kve/ml (Figuur 43). De aantallen in het effluent waren daarnaast niet hoger dan van het influent, behalve op 20-4-2016 dan wordt er bij het effluent een waarde van 930 kve ml⁻¹ gemeten, dit is ongeveer 30 keer hoger dan bij de rest van de monsters is gemeten. Bij het influent is op dezelfde datum ook een piek zichtbaar van 110 kve ml⁻¹. Daarnaast is op deze datum ook een piek waargenomen met de ATP-concentratie, maar de tweede ATP piek (1-6-2016) resulteerde niet in een KG25 piek.



Figuur 43. KG25 aantallen van de watermonsters aan het begin (A) en het eind (B) van de tijdelijke leiding.

Aeromonas 30°C

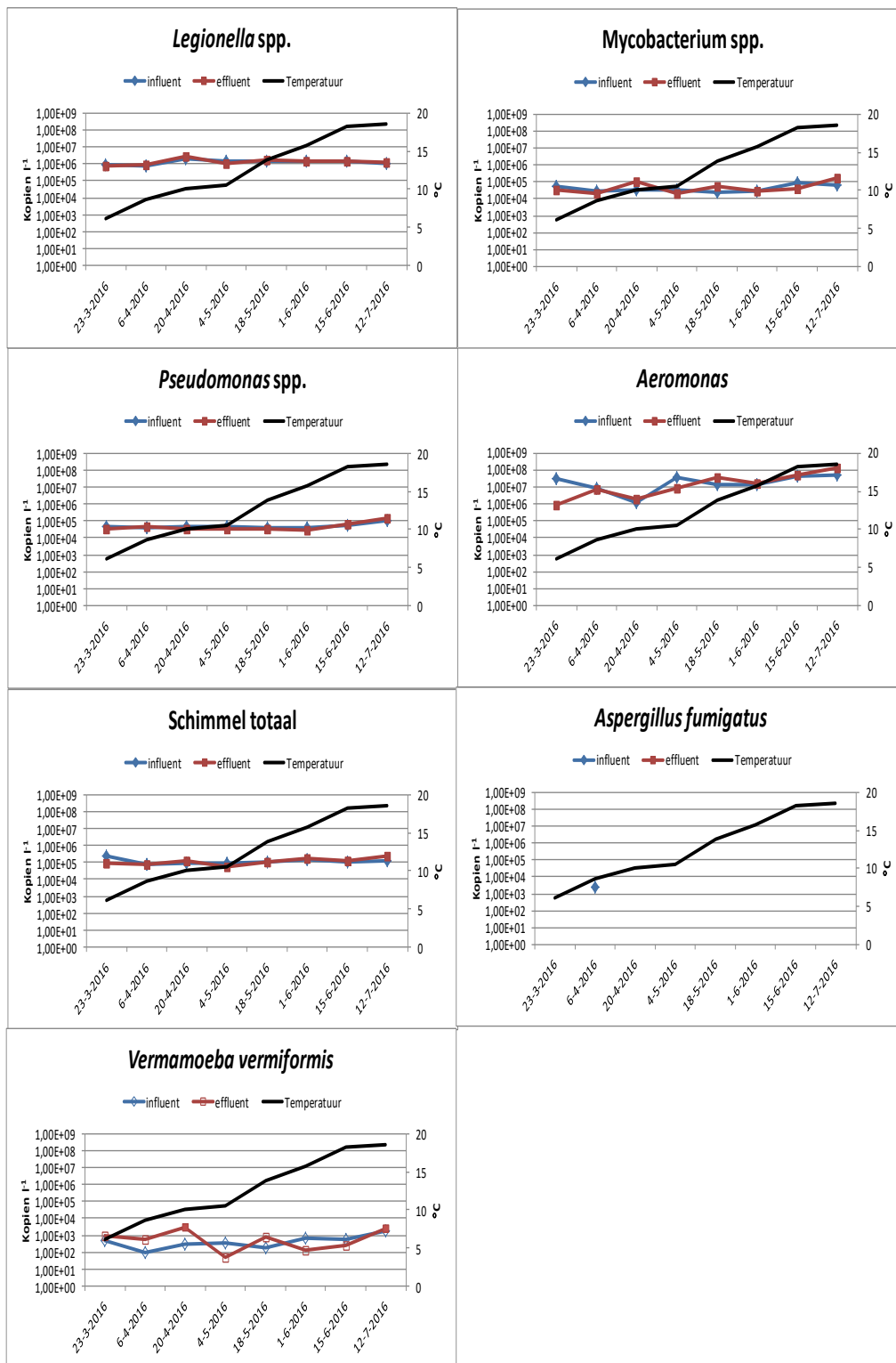
Van maart tot juni zijn de aantallen *Aeromonas* relatief stabiel, de aantallen variëren tussen < 1 en 197 kve/100 ml, maar vanaf juni nemen de aantallen toe tot 650 kve per 100 ml in het effluent op 12-7-2016. Op 18-5-2016 werden er geen *Aeromonas* aantallen in het influent gevonden. Terwijl in het effluent 197 kve 100 ml⁻¹ werd gevonden. Vanaf 1-6-2016 stijgen de *Aeromonas* aantallen in het leidingwater tot 366 kve 100 ml⁻¹ (influent) en 650 kve 100 ml⁻¹ (effluent) op 12-7-2016. De *Aeromonas* aantallen tussen het influent en effluent vertonen niet veel variatie, dit werd ook waargenomen in de data van 2014 (Figuur 44). Vanaf 1-6-2016 is er een stijgende trend op beide locaties waargenomen. Ter informatie; op 12-7-2016 zijn de watermonsters door KWR geanalyseerd terwijl de monsters van 23-3-2016 t/m 15-6-2016 zijn geanalyseerd door HWL.



Figuur 44. *Aeromonas* concentratie van de watermonsters aan het begin (A) en het eind (B) van de tijdelijke leiding.

4.2.3 qPCR

Figuur 45 laat de qPCR resultaten zien voor de watermonsters. Het aantal genkopieën van *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp. *Pseudomonas* spp. en schimmels blijft stabiel gedurende de periode van maart t/m juli 2016 en er is per microbiologische parameter geen verschil te zien tussen aantallen in het influent en effluent. Het aantal genkopieën *Aeromonas* laat iets meer variatie zien tussen influent- en effluentmonsters van de tijdelijke leiding. *A. fumigatus* wordt tijdens de meeperiode in 2016 één keer waargenomen in het influent (6-4-2016). Het aantal genkopieën van *V. vermiformis* komt in het effluent twee keer boven de detectielimiet van de qPCR. Daarnaast is voor geen enkel organisme een invloed van de watertemperatuur op de aantallen waargenomen.



Figuur 45. qPCR resultaten van de watermonsters van locatie influent (blauw) en effluent (rood), per micro-organisme. De temperatuur (zwart) is ook weergegeven op een aparte as. De open symbolen van *Vermamoeba vermiformis* geven detectielimiet aan.

4.3 Biofilmmonsters

4.3.1 ATP, KG25 en *Aeromonas*

Op 12-7-2016 zijn in totaal vier leidingstukken uitgenomen. Als eerste zijn op locatie B leidingstukken uitgenomen waarbij de volgorde van uitname was: PE-100, PVC-U. Daarna zijn bij locatie A leidingstukken uitgenomen met als volgorde: PE-100 en daarna PVC-U. Het leidingstuk PE-100 voor en na het swabben is weergegeven in Figuur 46. De resultaten van de diverse analyses zijn te vinden in Tabel 5. Op locatie A werd geen verschil waargenomen in ATP-concentraties tussen PE-100 en PVC-U. Op locatie B werd wel een verschil waargenomen: de ATP concentratie van PVC-U was vergelijkbaar met die van locatie A (~ 90 ATP/cm²), terwijl PE-100 duidelijk een hogere ATP-concentratie had (220 pg ATP/cm²). Op locatie A werd ook voor KG25 vergelijkbare aantallen aangetroffen voor PVC-U en PE-100, terwijl op locatie B PE-100 duidelijk hogere KG25 aantallen (270 kve/cm²) had dan PVC-U (22 kve/cm², dat vergelijkbaar was met de materialen uitgenomen op locatie A). De standaarddeviaties van de KG25 resultaten zijn echter wel hoog. De *Aeromonas* aantallen die werden gevonden waren voor drie van de vier materialen beneden de detectielimiet, alleen in de biofilm van de PE-100 leiding van locatie B werd *Aeromonas* wel aangetroffen in lage aantallen (12 kve/cm²).



Figuur 46. PE-100 leiding, \varnothing 200 mm. Het plaatje links is voor het swabben, het plaatje rechts is na het swabben.

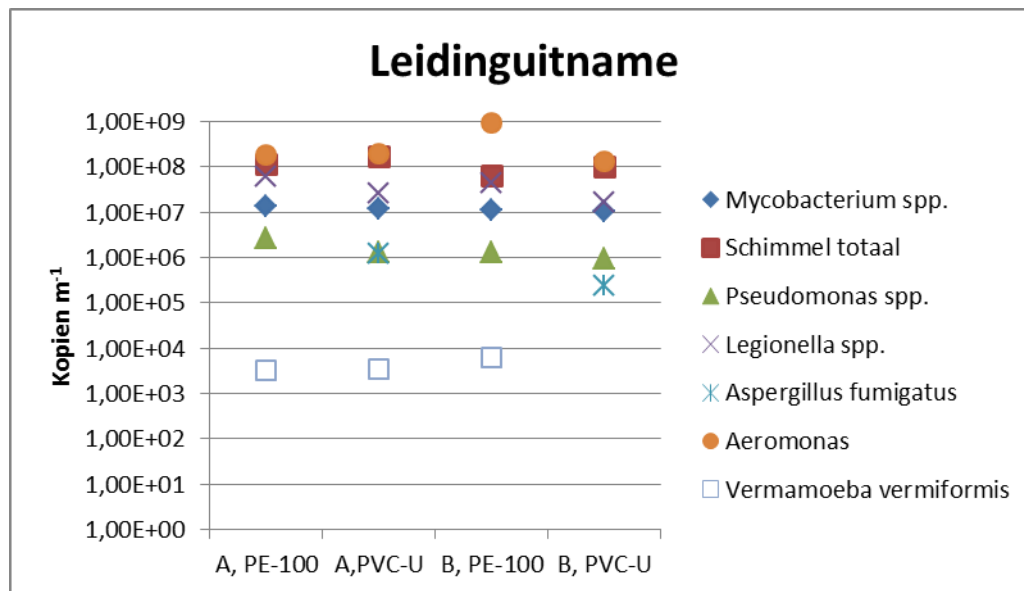
TABEL 5. RESULTATEN ATP, KG25 EN AEROMONAS VAN DE BIOFILM MONSTERS, IN VOLGORDE VAN STROOMRICHTING.

	A, influent		B, effluent	
	PE-100	PVC-U	PE-100	PVC-U
ATP (pg cm ⁻²)	84 ± 2,4	96 ± 8,9	220 ± 4	91 ± 0
KG25 (KVE cm ⁻²)	43 ± 77	63 ± 0	270 ± 115	22 ± 40
<i>Aeromonas</i> (KVE cm ⁻²)	<0,11	<0,11	12 ± 0,90	<0,11

4.4 qPCR

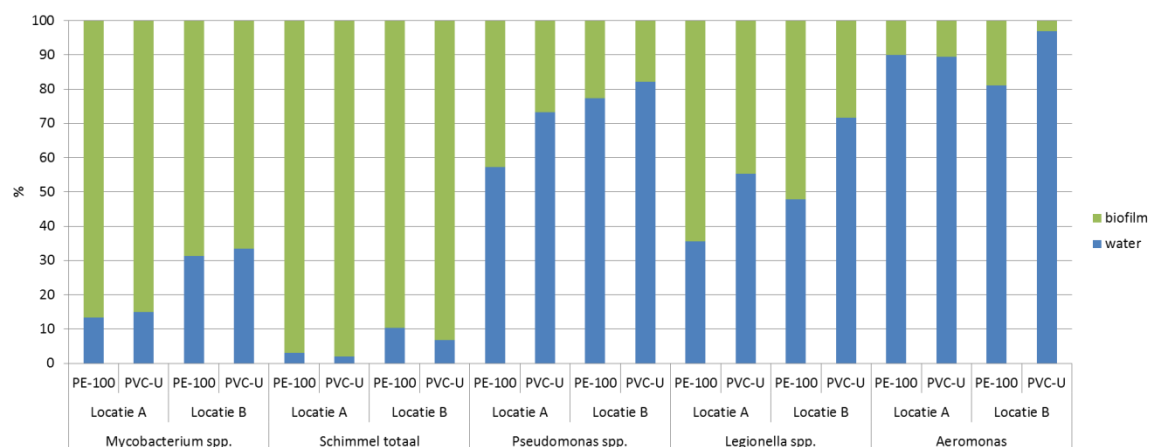
De qPCR resultaten van de verschillende micro-organismen op de verschillende uitgenomen leidingen laten zien dat de aantallen genkopieën van de verschillende organismen redelijk gelijk zijn voor de geanalyseerde monsters (Figuur 47). De uitzondering hierop waren de licht verhoogde *Aeromonas*-aantallen in de biofilm van PE-100 op locatie B vergeleken met de andere biofilmmonsters en de licht verhoogde *Pseudomonas*-aantallen op PE-100 op locatie A vergeleken met de andere biofilmmonsters. Opvallend is dat *A. fumigatus* wordt waargenomen in de biofilm op PVC-U, maar niet in de biofilm op de PE-materialen.

Met qPCR worden veel meer (>6 tot 7 log) *Aeromonas* waargenomen in de biofilm dan met kweek. In eerder onderzoek is deze verhouding nader bekeken en werd vastgesteld hoeveel keer genkopieën hoger zijn dan kweek. De resultaten van die studie lieten zien dat genkopieën van *Aeromonas* 30 keer hoger zijn de kweekaantallen (BTO 2013.228), dat is minder dan de 6 tot 7 log die in onze studie is waargenomen. Mogelijk dat de qPCR *Aeromonas*-stammen detecteert die niet kweekbaar zijn op het selectieve medium dat is gebruikt.



Figuur 47. qPCR resultaten van de biofilm monsters van de uitgenomen leidingmaterialen op 12-7-2016.

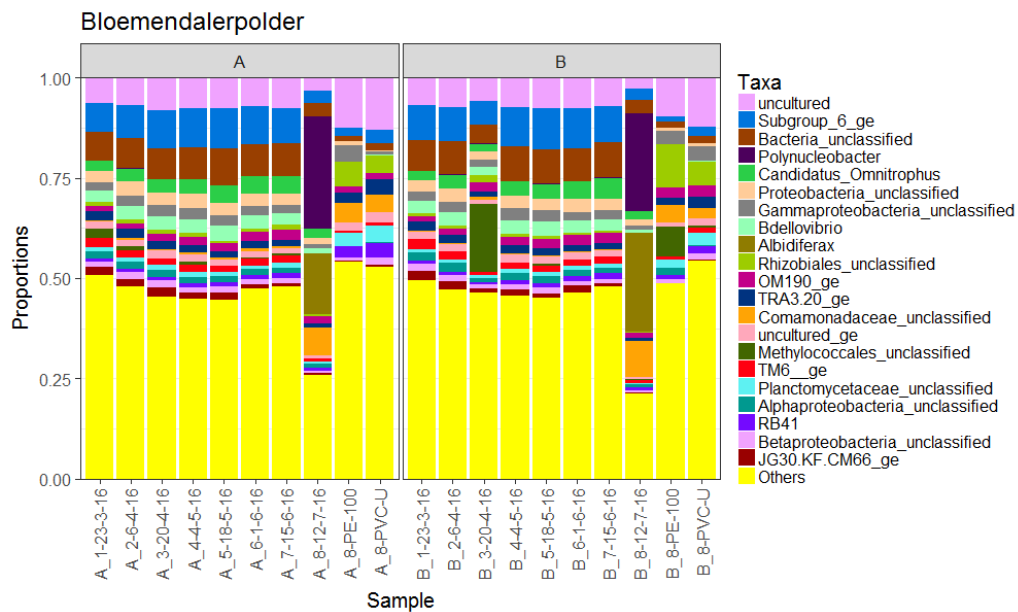
De verschillende micro-organismen worden gevonden in verschillende niches (biofilm versus water). *Mycobacterium* spp. en schimmels worden voornamelijk aangetroffen in de biofilm (meer dan 60% en 90%, respectievelijk), terwijl *Pseudomonas* spp. en *Aeromonas* spp. vooral worden aangetroffen in het water (meer dan 50% en 80%, respectievelijk) (Figuur 48). Voor *Legionella* spp. is de verdeling over water en biofilm ongeveer 50% (Figuur 48). Voor *Mycobacterium* spp. geldt dat de percentages in het water van bij locatie B hoger zijn in vergelijking met locatie A. Deze verhoging bij locatie B t.o.v. locatie A geldt in mindere mate ook voor schimmels, *Pseudomonas* spp. en *Legionella* spp.



Figuur 48. Percentages van *Mycobacterium* spp., schimmels, *Pseudomonas* spp., *Legionella* spp. en *Aeromonas* spp. in water of biofilm per locatie van monsters genomen op 12-7-2016.

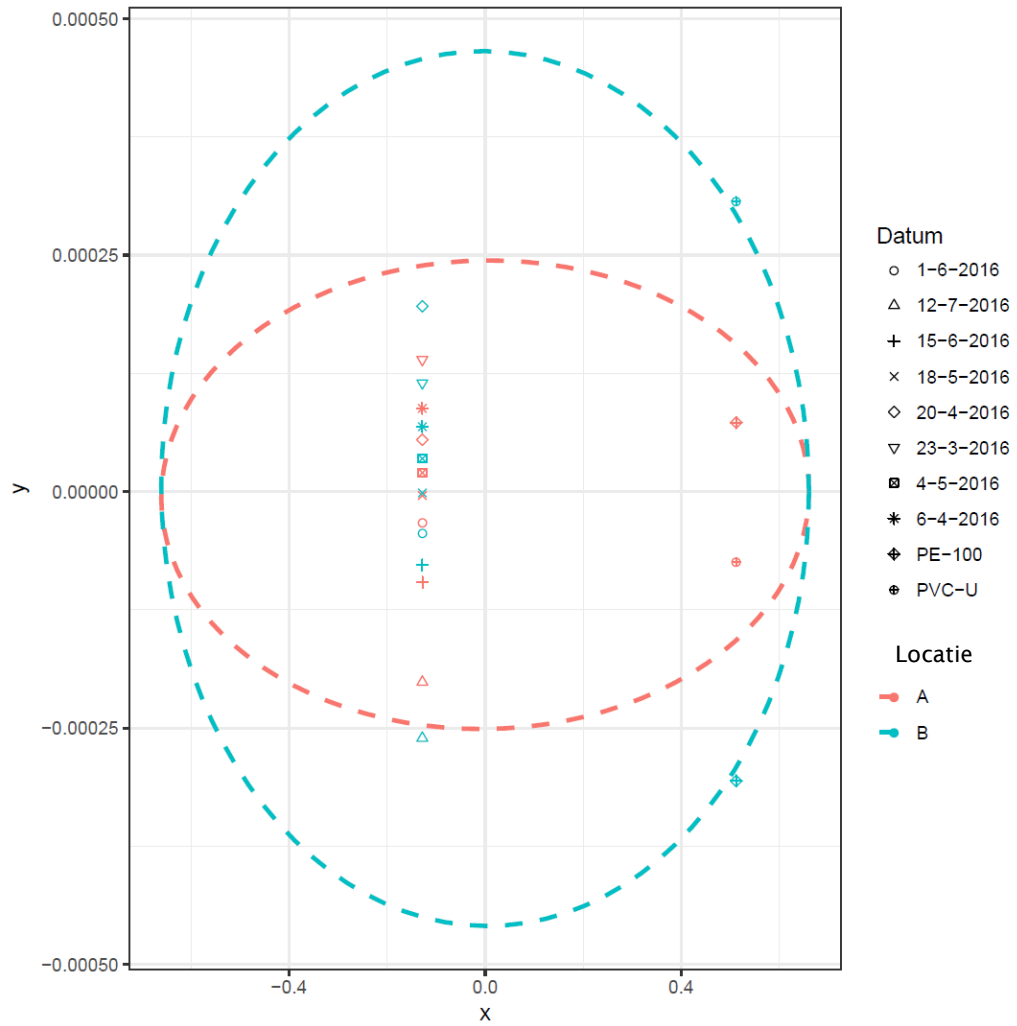
4.5 NGS

De totaal 16 watermonsters (van locatie A en B) en de vier biofilmmonsters (PVC-U en PE-100 van locatie A en B) zijn ook geanalyseerd met microbiële profilering. Deze analyses met behulp van NGS hebben geresulteerd in gemiddeld 66.914 DNA-sequenties van hoge kwaliteit met een spreiding van 780, een maximum aantal van 117.448 en een minimum aantal van 402 sequenties per monster. Er zijn 20.583 unieke OTU's in de monsters van Bloemendalerpolder. Figuur 49 laat de top 21 zien van de meest dominante bacteriegroepen (tot waar mogelijk op genus niveau) die aanwezig zijn in de water- en biofilmmonsters. De monsters zijn per locatie A of B op datum gesorteerd. Te zien is dat bacteriegroepsamenstelling van de watermonsters van locaties A en B op de meeste monsterdata op elkaar lijken. Echter de populatiesamenstelling van het watermonster van locatie B is op 20-4-2016 anders dan op de andere data voor deze locatie en is daarnaast ook anders dan voor locatie A op 20-4-2016. Met name Methylococcales is percentageel toegenomen in het monster van 20-4-2016 op locatie B, ten koste van Bacteria_uncultured en subgroep 6. De watermonsters genomen op 12-7-2016 hebben wel een vergelijkbare bacteriegroepsamenstelling op locaties A en B, maar deze samenstelling wijkt af van de eerder genomen watermonsters. Percentageel zijn er op deze dag meer Comamonadaceae, Albideferax en Polynucleobacter waargenomen en veel minder others in vergelijking met de andere monsters genomen op de andere tijdstippen. Op 12-7-2016 werden de monsters door een andere monsternemer genomen en er zat meer tijd tussen twee monsternames (vier weken i.p.v. de gebruikelijke twee weken), dat de afwijkende populatiesamenstelling op 12 juli mogelijk verklaart. De bacteriegroepsamenstelling van de biofilmmonsters genomen op de twee verschillende locaties lijken op elkaar en ook de binnen de locatie lijken ze op elkaar ondanks het feit dat ze van twee verschillende materiaaltypen komen. De populatiesamenstelling van de biofilms wijkt echter wel af van de populatiesamenstelling van de watermonsters. In de biofilm zijn Rhizobiales_unclassified en Comamonadaceae_unclassified meer dominant aanwezig, terwijl in de watermonsters subgroep 6 (van phylum Acidobacteria) en Candidatus_unclassified dominant aanwezig zijn. Daarnaast behoort een groot deel van de aangetroffen sequenties (>50%) tot de groep others., wat betekent dat veel verschillende bacteriegroepen in ongeveer in dezelfde hoeveelheid aanwezig zijn in deze monsters. Het is daarbij ook mogelijk dat in de groep others veel meer verschillende bacteriegroepen zitten die de watermonsters meer onderscheidend van elkaar maken.



Figuur 49. Top 21 van de bacteriën aanwezig in water en biofilmmonsters (PVC-U en PE-100 in sample naam) genomen gedurende 23-3-2016 t/m 12-7-2016.

Een NMDS plot van de OTU's van alle water en biofilmmonsters gedurende de periode 23-3-2016 t/m 12-7-2016 staat in Figuur 50. Te zien is dat de watermonsters en biofilmmonsters apart van elkaar groeperen, wat betekent dat de bacteriesamenstelling van de watermonsters verschillend is van de bacteriesamenstelling van de biofilms (ongeacht van welk materiaal). Daarnaast is te zien dat de watermonsters van dezelfde datum naast elkaar staan, wat betekent dat de bacteriesamenstelling van de watermonsters op locatie A en B vergelijkbaar waren op de meeste data. Alleen op 20 april waren de populaties in water van locatie A en B duidelijk verschillend, dat overeenkomt met de verschillen die zijn waargenomen bij de samenstelling van de bacteriegroepen. De watermonsters van 12-7-2016 liggen ook meer apart van de andere watermonsters, wat overeenkomt met Figuur 49. De twee PVC-U materialen clusteren niet bij elkaar, evenmin de twee PE-100 materialen. PE-100 en PVC-U van locatie A clusteren wel wat meer bij elkaar, dus locatie lijkt daar meer belangrijk te zijn dan materiaaltype. Echter dit geldt niet voor locatie B, waar PE-100 en PVC-U ver uit elkaar liggen. Over het geheel genomen betekenen deze resultaten dat (i) overeenkomsten tussen de bacteriepopulatie in biofilm en water klein is, dus uitwisseling van biofilm naar water is geen dominant proces en de biofilm bepaalt niet de bacteriesamenstelling van het water, (ii) dat in de tijd de populatiesamenstelling in het water licht verandert, aangezien de verschillende monsterdagen niet volledig bij elkaar clusteren en (iii) locatie een belangrijkere rol lijkt te spelen bij overeenkomst van de populatiesamenstelling dan materiaaltype.



Figuur 50. NMDS plot van alle water en biofilmmonsters gedurende de periode 23-3-2016 t/m 12-7-2016.

5 Discussie

De vraag die centraal stond tijdens dit onderzoek is: Wat is de mate van uitwisseling van micro-organismen tussen de waterfase en de biofilm en wat is het effect van leidingmaterialen hierop? Om die vraag te beantwoorden is er een materialentest met verschillende leidingmaterialen uitgevoerd en tevens zijn er verschillende leidingmaterialen uitgenomen in de praktijk.

5.1 Materialentest

De materialentest wordt uitgevoerd in glazen flessen. Dit betekent dat tijdens deze test zich ook biofilm kan ontwikkelen op de wand van de glazen flessen, welke niet wordt meegenomen in het onderzoek. Een deel van de micro-organismen die je in water meet kan dus afkomstig zijn van de biofilm van de wand. Echter deze fractie is gelijk voor alle geteste materialen, omdat alle monsters worden ingezet met glazen flessen. Daarnaast is glas een inert materiaal en scheidt dus geen groeibevorderende stoffen uit, waardoor dit aspect niet zorgt voor verhoogde groei in de BPP-test en verwaarloosbaar klein is in vergelijking met de groei die materialen als PE of PVC-P veroorzaken.

Bij de materialentest wordt een materiaalstukje uitgenomen en in 40 ml geplaatst. Tijdens deze uitname blijft een klein volume water achter op het materiaal uit de kolf en dit komt dus ook terecht in de biofilmfractie. Tijdens de analyse worden de parameters dus niet alleen gemeten van de biofilm, maar ook van dit kleine watervolume. Daarom zijn experimenten uitgevoerd om te achterhalen hoeveel water achter blijft op een materiaal als het uit de kolf wordt gehaald voor analyse. Uit deze experimenten blijkt 40-350 µl water achter te blijven op het materiaal. Omgerekend naar aantal bacteriën blijkt dit volume 0,01-0,03% te zijn van het totaal aantal bacteriën. Dit is verwaarloosbaar en de biofilmanalyses geven dus daadwerkelijk waarden van de biofilm. Dit blijkt ook uit de resultaten van de materialentest en de uitname bij Bloemendalerpolder, waar de samenstelling van de bacteriepopulatie van de biofilm duidelijk anders was dan die van het water.

Zoals verwacht zijn op basis van de BPP waarde de materialen onderling te onderscheiden. De BPP waarden van glas waren $83,9 \pm 16,6$ pg ATP cm⁻² voor deel 1 en $99 \pm 41,2$ pg ATP cm⁻² voor deel 2, dat valt binnen de grenswaarde die binnen het NEN-EN voor glas is gesteld (100 pg ATP cm⁻²). Deze BPP-waarden zijn wel hoger dan meestal wordt gevonden als de analyses volledig worden ingezet op het KWR-laboratorium. Deze hogere BPP waarde kan zijn veroorzaakt doordat het drinkwater van Leeuwarden in de BPP-test is gebruikt, terwijl normaal het drinkwater van Nieuwegein wordt gebruikt. Het distributiesysteem van Leeuwarden wordt gevoed met drinkwater van twee verschillende pompstations: Noordbergum en Spannenburg. Zowel het drinkwater van Noordbergum als het drinkwater van Spannenburg is minder biologisch stabiel (het bevat dus meer voor micro-organismen afbreekbare stoffen) dan het drinkwater van 't Tull en Waal, waar het distributiesysteem van Nieuwegein door wordt gevoed (van der Wielen, 2018). De hogere concentratie afbreekbare stoffen in het drinkwater van Noordbergum en Spannenburg resulteert daardoor in meer groei in het water en op een inert materiaal als glas tijdens de BPP-test.

Door de matrixverhouding (biofilm en water) te berekenen en in een grafiek uit te zetten, wordt duidelijk waar de biomassa of specifieke bacteriegroepen zich bevinden, in de waterfase of de biofilm. Dit is echter wel een relatieve verdeling, wat bijvoorbeeld betekent

dat relatief gezien bij PVC-P minder biomassa (in %) in het water dan in de biofilm bevindt van vergeleken met andere materialen, maar dat absoluut gezien PVC-P meer biomassa in het water (in ng ATP/l) bevat dan in het water met andere materialen. Voor de meeste materialen geldt dat het grootste gedeelte van de biomassa (ATP) zich in de biofilm bevindt. Het verschil tussen de verdeling tussen de waterfase en biofilm komt overeen met de BPP-waarden. Wanneer de BPP-waarde van het materiaal hoger is (PVC-P, PE-Xc en PVC-C) dan is het aandeel in de biofilm ook hoger, terwijl wanneer de BPP zeer laag is (glas) dan is het aandeel in de biofilm ook kleiner. Dit is logisch omdat bij een hoge BPP-waarde van een materiaal veel voedingsstoffen aanwezig zijn in het materiaal, waardoor de hoogste concentraties voedingsstoffen beschikbaar zijn aan het oppervlakte van het materiaal, wat leidt tot de meeste groei (en dus biomassa) op die plaats. PVC-P heeft de hoogste BPP-waarde, dus de meeste voedingsstoffen aan het oppervlakte van het materiaal. Deze stoffen zijn blijkbaar ook goed te gebruiken door bacteriën die worden bepaald met KG25, aangezien de KG25-aantallen in de biofilm van PVC-P het hoogst waren. De materialen PE-Xc en PE-100 hebben een duidelijk lagere BPP-waarde dan PVC-P, maar de BPP-waarde en ATP-concentraties in de biofilm bij deze materialen is wel hoger dan voor glas, koper of PVC-C. De hogere BPP-waarden van de PE-materialen resulteerde echter niet in hogere KG25 aantallen. Dus stoffen die vrijkomen bij PE-Xc en PE-100 aan het oppervlakte lijken minder goed afbreekbaar door bacteriën die worden gemeten met KG25.

Voor *Legionella* spp. geldt ook dat de groeibevorderende stoffen uit PVC-P duidelijk groei van *Legionella* spp. bevorderen, maar dit is minder duidelijk voor de andere materialen. Koper heeft de laagste legionella-aantallen in zowel het water als de biofilm. Dit is anders dan wat in eerder onderzoek is gerapporteerd, waar *L. pneumophila* werd gedoseerd aan de materialentest (geïncubeerd bij 37°C) en wat wel tot groeibevordering van *L. pneumophila* op PE-materialen leidde (Learbuch, 2016; van der Kooij et al., 2017). Het lijkt er dus op dat *L. pneumophila* anders reageert dan de legionellasoorten die in deze studie zijn waargenomen in de BPP-test bij koudere temperaturen. De “koudwaterlegionellas” die we in onze studie detecteerden lijken hun niche voornamelijk in water te hebben. Deze preferentie voor de waterfase maakt het ook aannemelijk dat deze “koudwaterlegionellas” zich niet in protozoa vermeerderen (zoals *L. pneumophila*), aangezien protozoa zich voornamelijk in de biofilm ophouden (Kuiper, 2006). Bij PVC-P vindt overigens wel een verschuiving van *Legionella* spp. plaats van water naar biofilm. Week 12 is daarop een uitzondering, maar dat komt door de afwijkende waarde in de biofilm van week 12.

De resultaten van *Mycobacterium* spp. voor PVC-P laten ook voor dit organisme een verschuiving van water naar biofilm zien. Een dergelijke verschuiving is te verwachten, omdat *Mycobacterium* een celmembraan met een waslaagje heeft en daardoor makkelijker blijft plakken aan oppervlaktes (Bergey, 2000). Een verschuiving van water naar biofilm voor *Mycobacterium* spp. wordt echter niet waargenomen voor de overige materialen, waar *Mycobacterium* spp. vooral wordt gevonden in het water.

Voor *Pseudomonas* spp. geldt dat in de eerste weken van de BPP-test hoge aantallen in zowel de biofilm als het water worden waargenomen in aanwezigheid van PVC-P. Daarna nemen de aantallen van *Pseudomonas* spp. af. Dit laat zien dat *Pseudomonas* pp. waarschijnlijk een opportunist is ten aanzien van groei en bij een hoog voedselaanbod (PVC-P) zich snel weet te vermeerderen (hoge groeisnelheid), waarna de aantallen dalen omdat andere micro-organismen (waarschijnlijk met lagere groeisnelheid maar hogere affiniteit) *Pseudomonas* spp. verdringen. Het feit dat *Pseudomonas* afneemt in de tijd is vergelijkbaar met eerdere doseerexperimenten met *P. aeruginosa* aan de materialentest (van der Wielen & Bereschenko, 2016). Het lijkt er dus opdat alle *Pseudomonas* soorten die in het drinkwatersysteem kunnen groeien opportunistische groeiers zijn. Voor de overige

materialen zijn de verschillen van concentraties niet zo groot en valt op dat *Pseudomonas* spp. vooral in waterfase voorkomt, waar het waarschijnlijk stoffen kan afbreken (zoals ook is waargenomen voor *P. aeruginosa* en *P. fluorescence* stam P17 die in de AOC-test wordt gebruikt (van der Kooij et al. 1982a, 1982b)). De enige uitzondering is koper, waar het hogere percentage in de biofilm op koper opvallend is, omdat koper bacteriostatisch werkt tegen *P. aeruginosa* (Hoekstra et al. 1984). Een mogelijkheid is dat cellen afsterven, maar omdat ze negatief geladen zijn passief gaan hechten aan het positief geladen koper.

Voor *Aeromonas* lijkt het erop dat het materiaal geen invloed heeft op de *Aeromonas*-aantallen in het water, wat ook eerder is gerapporteerd en waar *Aeromonas* actief werd gedoseerd aan de materialentest (van der Wielen & Bereschenko, 2016). *Aeromonas* wordt het meest aangetroffen in het water en in de biofilm wordt na verloop van de tijd van de materialen PVC-P, PE-100, PE-Xb en glas deel 2 geen *Aeromonas* genkopieën meer aangetroffen.

Schimmels lijken hun dominante niche veel meer te hebben in de biofilm dan in het water. Dit geldt ook wanneer het materiaal geen groeibevorderende stoffen afgeeft (glas) en groei afhankelijk is van afbreekbare stoffen in het water. De hogere schimmelaantallen in de biofilm bij sommige materialen in vergelijking met glas lijkt dus aan te geven dat ze in staat zijn om te groeien op de stoffen uit het materiaal komen (PVC-C en PE-100) en bij deze materialen zijn de aantallen ook hoger dan bij glas. De schimmelaantallen in water en biofilm op PE-Xc is echter wel vergelijkbaar met glas, terwijl voor PE-Xc de aantallen schimmels ook hoger zijn. Dit betekent dus dat bij PE-Xc afbraak van stoffen door schimmels evenredig plaatsvindt in biofilm en water. In week 4 werd zowel in het water als in de biofilm een piek aangetroffen van het aantal genkopieën van schimmels in aanwezigheid van elk materiaal. Deze piekwaarde is echter niet zichtbaar bij de ATP resultaten, dus dat duidt erop dat het specifieke stoffen zijn die door schimmels tussen week 2 en 4 worden omgezet.

De resultaten van *V. vermiformis* laten zien dat wanneer zich *V. vermiformis* weet te vermeerderen op het materiaal in vergelijking met de controle, de aantallen voornamelijk toenemen in de biofilm. Dit is ook volgens verwachting omdat deze protozoa waarschijnlijk op biofilms graast en dus van de biofilm afhankelijk is om zich te kunnen vermeerderen

5.1.1 NGS

Bij de verwerking van NGS data zijn er veel keuzemogelijkheden in de software die de NGS data verwerken tot heldere figuren. In dit onderzoek is gebruik gemaakt van een online beschikbaar script voor analyses in het statistisch softwareprogramma R. Daarnaast is ook de webbased tool MicrobiomeAnalyst gebruikt, met de default instellingen.

De NGS data laat duidelijke verschillen zien in de bacteriesamenstelling tussen de verschillende materialen, maar ook tussen de verschillende matrices (water en biofilm) en in de tijd. Tabel 6 geeft de unieke bacteriegroepen die voor de afzonderlijke materialen zijn gevonden weer, gebaseerd op de top 21 van meest voorkomende bacteriën per materiaal en van alle geanalyseerde monsters (water en biofilm; week 1, 8 en 16). Te zien is dat PVC-P de meest unieke bacteriegroepen heeft en met dit materiaal worden ook bacteriegroepen waargenomen die opportunistische ziekteverwekkende bacteriesoorten bevatten (*Pseudomonas* en *Legionella*). Een nuance hierbij is dat de specifieke qPCR's deze bacteriesoorten ook voorkomen bij de andere materialen, maar blijkbaar minder dominant dan op PVC-P. PE-Xb, PE-Xc, PVC-C en PE-100 hebben ieder maar één unieke bacteriegroep in de top 21, de andere 20 werden ook bij één of meer van de andere materialen waargenomen. Dit betekent dat de dominante bacteriegroepen tussen deze vier materialen voor een groot deel met elkaar overeenkomen.

Bij elk materiaal werd waargenomen dat de samenstelling van de bacteriepopulatie van de biofilm en water op de verschillende materialen na week 1 relatief grote verschillen vertoonden met de samenstelling van de bacteriepopulatie na week 8 en 16. De samenstelling van de bacteriepopulaties na week 8 en 16, daarentegen, was veel meer vergelijkbaar met elkaar. Voor glas, dat een inert materiaal is en dus weinig tot geen groeibevorderende stoffen uitscheid, kan dit verschil in samenstelling na week 1 en week 8/16 er op duiden dat in het begin van de BPP-test lage concentraties stoffen van het glas vrijkomen in het water en in combinatie met stoffen uit het water zorgen voor groei van andere micro-organismen in de biofilm. Na acht weken lijkt de bacteriepopulatie veel meer gestabiliseerd te zijn, waardoor de bacteriesamenstelling van de biofilm en water meer op elkaar lijkt. Het lijkt er dus op dat uitwisseling tussen biofilm en water een belangrijker proces is geworden, waardoor de water- en biofilmpopulatie vergelijkbaar zijn. Het is daarbij aannemelijk dat een deel van de biofilmbacteriën naar water is gegaan.

De analyses laten dus zien dat in de BPP-test voor materialen een relatief stabiele bacteriepopulatie in water en biofilm ontstaat na ongeveer acht weken. Dit komt overeen met de ATP-concentratie (als maat voor actieve biomassa) die tijdens het begin van de BPP-test ook hoger kan zijn (Figuur 5 en 6; van der Kooij et al., 2006). Destijds is gekozen om pas na 8, 12 en 16 weken in de BPP-test water- en biofilmmonsters te nemen, omdat de ATP-concentratie dan gestabiliseerd is (van der Kooij et al., 2006). Uit de analyses van onze studie blijkt dat die periode goed gekozen is in relatie tot de stabiliteit van de samenstelling van de bacteriepopulatie. Andere onderzoekers hebben een vergelijkbare test ontwikkeld om de groeipotentie van materialen te bepalen, maar dan gebruikmakend van celaantallen in plaats van ATP (Bucheli-Witschel et al., 2012). Die test duurt echter aanzienlijk korter (7 dagen), wat de auteurs zien als een voordeel ten opzichte van de BPP-test. Uit deze en eerdere studies volgt echter dat gedurende een dergelijke korte incubatieperiode de microbiële populatie niet stabiel is, wat dus tot onbetrouwbare resultaten kan leiden om de groeibevorderende eigenschappen van materialen te beschrijven.

Verder werden er veel verschillen gevonden in de NGS resultaten van de duplo kolven van water van glas en koper van week 1. Wanneer de NGS resultaten van deze monsters gezamenlijk in een bargraph plot werden gezet, werd duidelijk dat de monsters zijn verwisseld. Er kan niet met zekerheid worden gezegd welke monsters bij welk materiaal horen.

Voor sommige materialen werden specifieke bacteriegenera gevonden (Tabel 6). Waarschijnlijk zijn dergelijke genera dus specifiek aangepast aan de omstandigheden die door dat materiaal wordt veroorzaakt (specifieke voedingsstoffen of stoffen die groei van micro-organismen kan remmen, zoals koper). *Sediminibacterium* is als unieke bacteriegenus gevonden in week 8 en 16 van de BPP-test met het materiaal koper. Deze bacterie werd ook in eerder onderzoek gevonden als dominant in de biofilm op koper (Buse et al., 2014). *Methylophilus* is als unieke bacteriegenus gevonden met het materiaal PE-Xb (vooral na week 1) in zowel water en biofilm. *Methylophilus* werd in eerder onderzoek ook gevonden in de biofilm die zich op PE-Xb ontwikkelde, maar niet in het water dat in contact stond met dit materiaal (Rožej et al., 2015). *Aquabacterium* is een bacteriegenus die gevonden is in het water en voornamelijk in de biofilm van alle materialen. Dit bacteriegenus is als dominante genus aangetroffen in drinkwaterbiofilms in het distributiesysteem van Berlijn, en werd ook geïsoleerd van glas en PE monsters onder laboratoriumcondities (Kalmbach et al. 1997, 1999; Roeder, 2010).

TABEL 6. UNIEKE BACTERIEGROEPEN PER MATERIAAL.

PVC-P	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Legionella</i>
	Planctomycetaceae_unclassified (tot family geclassificeerd)
	Phenylobacterium
	X3_genus_incertae_sedis
	<i>Planctomyces</i>
Koper	<i>Sediminibacterium</i>
	Sphingomonadales_unclassified (tot order geclassificeerd)
PE-Xb	<i>Methylophilus</i>
PE-Xc	Sphingomonadaceae_unclassified (tot family geclassificeerd)
PVC-C	Deltaproteobacteria_unclassified (tot klasse geclassificeerd)
PE-100	<i>Rheinheimera</i>

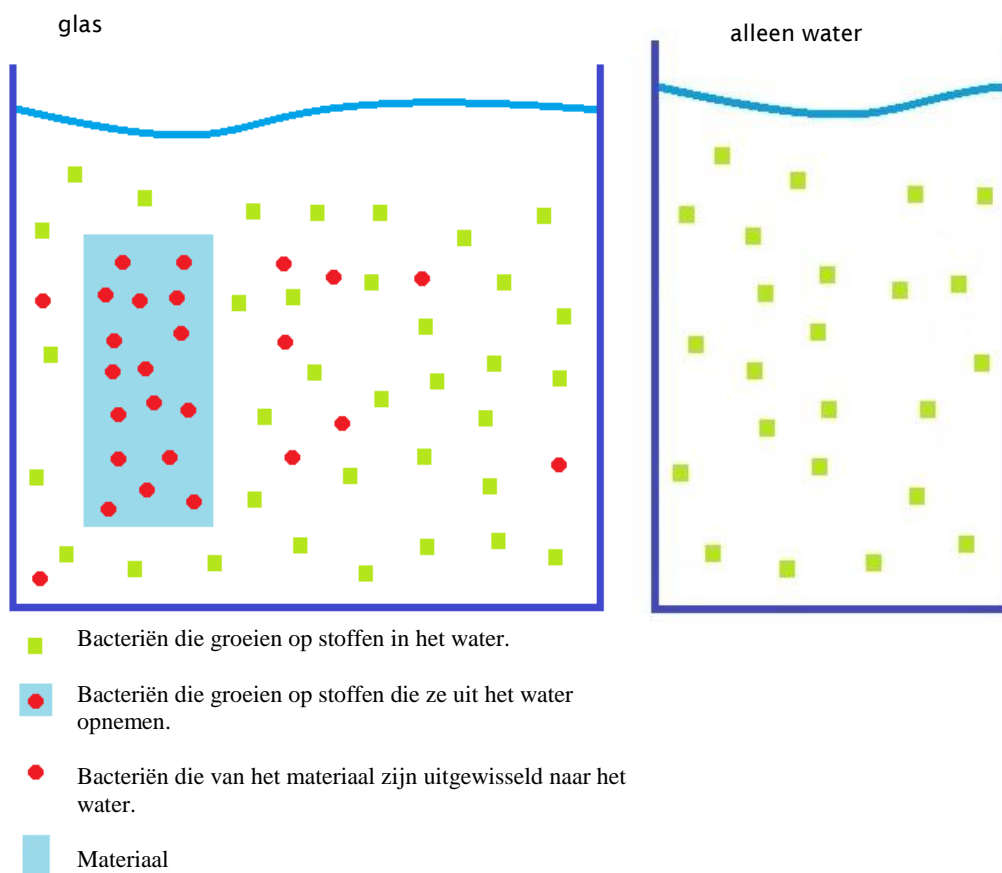
Uit de NGS-resultaten blijkt ook dat veel van de bacteriën die in de biofilm en drinkwater van de BPP-test voor materialen werden aangetroffen nog onbekend zijn, omdat diverse bacteriën maar tot klasse, order of family kunnen worden geclassificeerd of helemaal niet wordt geclassificeerd. Voor deze bacteriën geldt daarom dat nog onbekend is welke functie ze in het ecosysteem innemen en wat voor metabole processen ze uitvoeren.

5.1.2 Uitwisseling

De oorspronkelijke vraag in dit onderzoek was: wat is de mate van uitwisseling van micro-organismen tussen de waterfase en de biofilm en verschilt deze tussen de materialen? Om die vraag te kunnen beantwoorden is hieronder een aanpak beschreven om de uitwisseling te kunnen kwantificeren.

5.1.2.1 De berekeningen

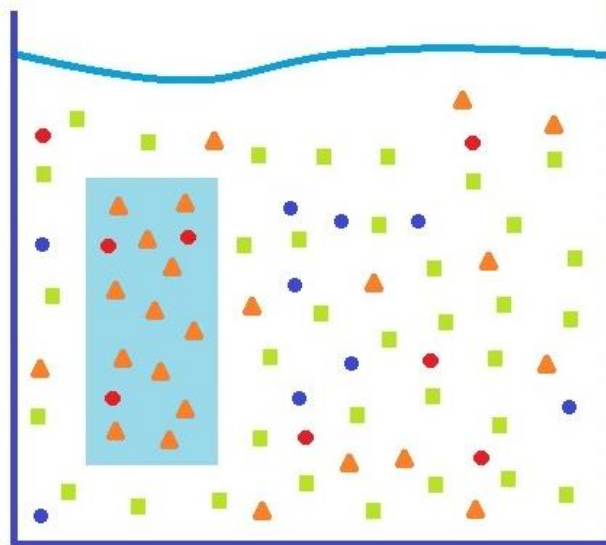
De ATP concentratie in het water (zonder aanwezigheid van materiaal) is 7,5 ng ATP/l. De ATP concentratie in het water in aanwezigheid van glas (met daarop een biofilm) is 10,1 ng ATP/l. Het verschil tussen deze twee is 2,6 ng ATP/l. Dat betekent dus dat er 2,6 ng ATP/l biomassa is uitgewisseld van biofilm naar water. Dit is in Figuur 51 gevisualiseerd, waarbij de groene bolletjes bacteriebiomassa is die alleen in het water voorkomt en de rode bolletjes bacteriebiomassa van de biofilm die of in de biofilm aanwezig is of van de biofilm naar de waterfase is uitgewisseld. In tabel 7 is de ATP-concentratie van de verschillende fracties weergegeven. Daarnaast gaan er waarschijnlijk ook bacteriën van het water naar de biofilm, maar er wordt aangenomen dat dit deel verwaarloosbaar klein is.



Figuur 51. Schematische tekening die weergeeft in welke niches de verschillende bacteriën zitten in aanwezigheid van glas (links) en afwezigheid van glas (rechts).

TABEL 7. ATP-CONCENTRATIES OVER DE VERSCHILLENDE NICHES, ZIE UITLEG KLEUREN EN VORMEN FIGUUR 40.

■	7,5	pg/ml		
●	12,7	pg/cm ²		
■ ●	10,2	pg/ml		
●	2,6	pg/ml	= 15,9	pg/cm ²



- Bacteriën die groeien op stoffen in het water.
- Bacteriën die groeien op stoffen die door het materiaal worden uitgescheiden en nog op het materiaal zitten.
- Bacteriën die groeien op stoffen van materiaal die in het water terecht zijn gekomen.
- ▲ Bacteriën die groeien op stoffen die door het materiaal worden uitgescheiden en zijn uitgewisseld naar het water.
- Bacteriën die groeien op stoffen die ze uit het water opnemen.
- Bacteriën die van het materiaal zijn uitgewisseld naar het water.

Figuur 52. Schematische tekening die weergeeft waar de verschillende bacteriën zitten in aanwezigheid van materiaal.

TABEL 8. VOORBEELDBEREKENING VOOR HET MATERIAAL PVC-P, ZIE UITLEG KLEUREN EN VORMEN FIGUREN 51 EN 52.

					■	7,5	pg/ml
1.			■ ▲	-	●	1,1E+04	pg/cm ²
2.	■ ▲ ●	-	■		●	2,0E+04	pg/cm ²
3.			■ ▲	+	▲	3,1E+04	pg/cm ²

Als we vervolgens de uitwisseling willen gaan bepalen voor de verschillende materialen, komen er een aantal aspecten bij, waardoor de berekening complexer wordt, wat in Figuur 52 is gevisualiseerd. Nieuw in Figuur 52 zijn de oranje driehoekjes (bacteriën die biofilm hebben gevormd door te groeien op stoffen van het materiaal en die nog in de biofilm zitten of vanuit de biofilm zijn uitgewisseld naar water). Daarnaast zijn de blauwe bolletjes (bacteriën die in het water groeien op stoffen die vanuit materiaal naar water zijn gediffundeerd) ook nieuw. In de berekening om de uitwisseling te kunnen bepalen, wordt daarom de ATP concentratie gevonden in de biofilm van glas (negatieve controle, rode bolletjes) afgetrokken van de ATP concentratie in de biofilm van het materiaal (in dit voorbeeld PVC-P, oranje driehoek) (berekening 1 in tabel 8). Daarnaast wordt ook de ATP-

concentratie van de Bacteriën die groeien op stoffen die ze uit het water opnemen (groene vierkanten) in mindering gebracht (berekening 2). De uitkomst van berekening 2 is het aantal bacteriën dat van de biofilm die is gevormd door de afbreekbare stoffen uit het materiaal naar de waterfase is gegaan en de bacteriën die in de waterfase groeien op stoffen die worden uitgescheiden door het materiaal. Het percentage micro-organismen dat is uitgewisseld van biofilm naar water, wordt vervolgens berekend door de uitkomst van berekening 2 te delen door het totaal aantal bacteriën dat een biofilm heeft weten te ontwikkelen door de afbreekbare stoffen uit het materiaal (berekening 3): $2,0E+04/3,1E+04 = 64\%$.

Om de uitwisseling van biofilm naar water volgens bovenstaande beschrijving te berekenen zijn ATP waarden nodig van water in aanwezigheid van glas, maar ook ATP waarden van water in afwezigheid van materiaal. In mei 2016 is het drinkwater daarom geanalyseerd op dag 0 en dag 7. Dit drinkwatermonster werd bemonsterd aan dezelfde kraan waar in mei-sept 2015 het water is getapt voor de materialentest. Het doel van deze extra monsternamen was om te analyseren wat met de microbiologie gebeurt tijdens zeven dagen incubatie zonder aanwezigheid van materialen. Doordat in de materialentest elke zeven dagen het water wordt ververs met drinkwater, kan incubatie van een watermonster zonder materialen als controle worden gebruikt. Doordat dit watermonster op een ander moment is genomen dan het drinkwater dat voor de materialentest wordt gebruikt, is aangenomen dat de resultaten van dit watermonster vergelijkbaar zijn met de materialentest uitgevoerd in mei-sept 2015. Roeselers et al. (2015) heeft voor een aantal productielocaties laten zien dat de ATP concentratie en de bacteriepopulatie van het drinkwater weinig varieert gedurende het jaar, wat deze aanname ondersteunt. Daarnaast wordt aangenomen dat de AOC concentratie in het drinkwater vergelijkbaar is gedurende de verschillende monsternamen. De waarden van dag 0 zijn nodig om de uitwisseling van week 1 te bepalen. Deze zijn dus momenteel afkomstig van meetmomenten die op een ander tijdstip zijn bepaald. Hoewel de studie van Roeselers et al. (2015) indicaties geven dat de ATP-concentratie en bacteriepopulaties in drinkwater bereid uit grondwater niet veel verandert in de tijd, blijft het onduidelijk of de gegevens dusdanig betrouwbaar zijn, dat de uitwisseling kan worden berekend, ook omdat het gebruikte drinkwater van twee productielocaties afkomstig kan zijn. Vervolgens zijn wekelijkse ATP waarden van water in aanwezigheid en afwezigheid van materiaal noodzakelijk om het verloop van uitwisseling in de tijd te volgen. Zo kan dus worden gezien wat er in de week stilstand gebeurt met het ATP-gehalte.

In tabel 9 is de ATP uitwisseling van biofilm naar water weergegeven in percentages voor ieder materiaal. Deze percentages variëren sterk in de tijd, van sterk negatief (wat betekent dat bacteriën van water naar biofilm zijn uitgewisseld) naar sterk positief (wat betekent dat bacteriën van biofilm naar water zijn uitgewisseld). Het blijft onduidelijk in hoeverre deze variatie daadwerkelijk optreedt, of wordt veroorzaakt door de aannames die zijn gedaan. Door de onduidelijkheid over de betrouwbaarheid van deze percentages, is besloten om geen verdere berekeningen voor de afzonderlijke bacteriegroepen uit te voeren. Om het bovenstaande rekenmodel wel te kunnen toepassen en zo de uitwisseling tussen biofilm en water te kwantificeren moeten de volgende controles meegenomen worden in een volgend experiment. Een fles zonder materiaal met dus alleen water. Van alle flessen moet op dag 0 ook ATP worden gemeten en daarnaast ATP iedere week meten voordat en nadat het water wordt ververs. Met die extra controles worden de berekeningen betrouwbaar, maar de betrouwbaarheid kan nog steeds vertroebeld worden doordat de bacteriën die biofilm op het glas van de monsterflessen vormen niet worden meegenomen (aannee dat deze biofilmconcentratie voor de flessen met de verschillende materialen hetzelfde is) en blijft de aanname dat bacteriën die zich op stoffen in het drinkwater hebben vermeerderd niet of nauwelijks uitwisselen naar de biofilm op het materiaal.

TABEL 9. OVERZICHT ATP UITWISSELING PERCENTAGES BEREKEND VOOR IEDER MATERIAAL.

dagen	PVC-P	koper	PE-Xb	PE-Xc	PVC-C	PE-100
7	64,1	28,7	20,8	18,6	44,9	5,7
28	22,5	34,7	11,8	11,1	-29,8	4,6
56	30,7	-14,9	6,6	29,1	11,1	18,9
84	8,7	346,4	-0,3	-1,4	-277,0	4,0
112	5,3	-598,9	-5,1	67,9	2,2	16,2

De ATP, KG25 en specifieke qPCR's resultaten en de relatieve verdeling over water en biofilm van deze parameters voor de verschillende materialen kunnen worden gebruikt om een indicatie te geven over verschillen in biofilm- en waterfase tussen de materialen. Op basis van de verdeling biomassa tussen water en biofilm en de BPP-waardes wordt verwacht dat bij PVC-P de meeste uitwisseling plaatsvindt. Dit omdat er bij PVC-P in de loop van de tijd relatief steeds meer biomassa in de biofilm werd aangetroffen. Bij glas en koper wordt de minste uitwisseling verwacht, omdat de relatieve verhouding van biomassa tussen water en biofilm in de tijd gelijk nagenoeg bleef. Daarna volgen de materialen PE-100 en PVC-C, die meer schommelingen van biomassa tussen water en biofilm laten zien. De materialen PE-Xb en PE-Xc zitten naar verwachting hiertussen.

5.2 Praktijkmonsters Bloemendalerpolder

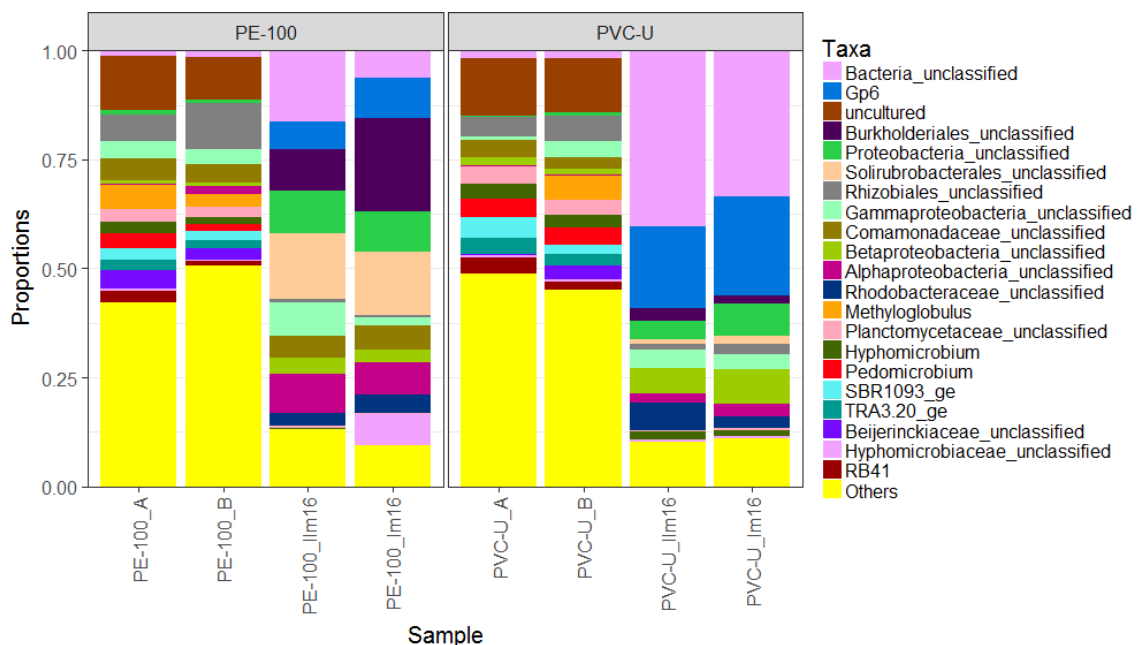
Analyse van watermonsters uit de tijdelijke PE-leiding in de Bloemendaalpolder (1520 m) liet zien dat geen grote verschillen werden gevonden tussen het influent (locatie A) en effluent (locatie B) water (ATP, KG25, qPCR en NGS resultaten). Wel werden verschillen waargenomen tussen de biofilms op de PE-100 en PVC-U coupons die voor en achter de tijdelijke leiding zijn aangebracht (ATP, KG25, qPCR en NGS resultaten). De analyses lieten zien dat ook in de praktijksituatie specifieke micro-organismen in verschillende niches (biofilm versus drinkwater) worden gevonden. De verdeling van specifieke bacteriegroepen over deze niches kwam echter niet geheel overeen met die gevonden in de materialentest. *Mycobacterium* spp. werd in de materialentest vooral in het water gevonden, terwijl bij de Bloemendaalpolder *Mycobacterium* spp. voornamelijk in de biofilm werd aangetroffen. Hetzelfde geldt voor schimmel totaal en *Legionella* spp. De grootste verschillen in condities tussen deze praktijksituatie en de materialentest is de temperatuur en de hydraulica (contacttijd en schuifspanningen tussen water en materiaal). Ook is de verversingsgraad heel anders. In de materialentest staat het water een week stil, terwijl in de praktijksituatie het water continue wordt verversd en is het water binnen 48-72 uur van het pompstation bij de klant. Daarnaast wordt in de materialentest de temperatuur constant gehouden op 25°C, terwijl in de praktijksituatie de watertemperatuur varieert van ± 5°C in de winter tot 15-20°C in de zomer. Het is mogelijk dat deze verschillende condities de verschillen kunnen verklaren in de verdeling van bepaalde organismen over water en biofilm, maar aanvullende experimenten zijn nodig om de precieze invloed van hydraulica en temperatuur op uitwisseling te bepalen. Momenteel wordt bij KWR de invloed van hydraulica, op de populatiesamenstelling, onderzocht in een proefinstallatie KIVODIS die het distributiesysteem nabootst.

De resultaten van de qPCR en kweek voor *Aeromonas* verschilde 6-7 log met elkaar. In eerder onderzoek is gevonden dat *Aeromonas* meerdere gen- of genoomkopieën kan hebben, waarbij het aantal genkopieën van *Aeromonas* afhankelijk is van de *Aeromonas*-soort en de

groeifase waarin de *Aeromonas* cel zich bevindt (BTO 2013.228). Het verschil tussen qPCR en kweek in onze studie is echter hoger dan kan worden verklaard door het aantal gen- en genoomkopieën. Waarschijnlijk worden de hogere aantallen ook veroorzaakt doordat qPCR *Aeromonas* soorten detecteert die niet op het agarmedium groeien of dat er ook *Aeromonas* in viable but nonculturable (VBNC)-status aanwezig zijn.

De NMDS plot van de Bloemendalerpolder resultaten lieten zien dat de bacteriepopulaties van de verschillende materialen van de verschillende locaties verschillend zijn. Dit werd ook gezien in een eerder onderzoek, waar door heel Nederland verschillende leidingmaterialen zijn uitgenomen (Learbuch & Wullings, 2018). Hier werd bij bijvoorbeeld Culemborg ook gevonden dat de biofilm van dezelfde materialen uit één voorzieningsgebied verschillende biofilmsamenstellingen hadden.

Wanneer de NGS resultaten van de Bloemendalerpolder worden vergeleken met de NGS resultaten van de materialentest, valt op dat bij de materialentest de PVC-U en PE-100 materialen onderling verschillend waren in bacteriesamenstelling van de biofilm, terwijl bij de praktijkmonsters de populatiesamenstelling van de biofilm op PE-100 en PVC-U veel meer op elkaar leken (Figuur 53). Daarnaast zijn de dominante bacteriegroepen die worden aangetroffen bij de materialentest en praktijkmonsters ook heel verschillend. Zo zijn in de monsters van de materialentest de bacteriegroepen Gp6, Burkholderiales en Solirubrobacterales aanwezig, maar worden deze niet in de praktijkmonsters aangetroffen. Andersom geldt dat bij de praktijkmonsters de bacteriegroepen Comamonadaceae, *Methyloglobulus*, Planctomycetaceae, *Pedomicrobium* en Beijerinckiaceae worden gevonden, maar deze groepen worden niet aangetroffen in de monsters van de materialentest. Net zoals de qPCR data kunnen deze verschillen mogelijk worden verklaard door de verschillen in temperatuur en hydraulica tussen de praktijksituatie en de materialentest.



Figuur 53. Top 21 van de bacteriën aanwezig in biofilmmonsters genomen in de Bloemendalerpolder (A = influent, B = effluent) en week 16 van de materialentest (kolff I en II).

6 Conclusies en aanbevelingen

6.1 Conclusies

- Tijdens de BPP-test ontwikkelt de bacteriepopulatie zich van week 1 tot week 8, waarna de bacteriepopulatie relatief stabiel is geworden tot week 16. De groeibevorderende eigenschappen van materialen kunnen dus pas betrouwbaar worden bepaald na 8 weken incubatie in de BPP-test.
- De percentuele verdeling van het aantal *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp. en *Aeromonas* spp. 16S rRNA genkopieën over de twee verschillende matrices water en biofilm die zich heeft gevormd op verschillende materialen in de BPP-test, laat percentueel zien dat de meeste van deze bacteriën zich in het water bevinden. Het materiaaltype lijkt dus geen invloed te hebben op de relatieve verdeling van deze bacteriegroepen over water en biofilm.
- De percentuele verdeling van het aantal schimmels 18S rRNA genkopieën over de twee verschillende matrices water en biofilm die zich heeft gevormd op verschillende materialen in de BPP-test, laat percentueel zien dat de meeste schimmels zich in de biofilm bevinden. Het materiaaltype lijkt dus geen invloed te hebben op de relatieve verdeling van deze bacteriegroepen over water en biofilm.
- De percentuele verdeling van het aantal *Vermamoeba vermiformis* 18S rRNA genkopieën over de twee verschillende matrices water en biofilm die zich heeft gevormd op verschillende materialen in de BPP-test, laat percentueel zien dat de meeste *V. vermiformis* zich in de loop van de tijd steeds meer in de biofilm bevinden. Het materiaaltype lijkt dus geen invloed te hebben op de relatieve verdeling van deze bacteriegroepen over water en biofilm.
- De NGS resultaten van de materialentest laten variatie zien van de populatiesamenstelling tussen water en biofilm van een bepaald materiaal.
- De NGS resultaten laten verder variatie zien in de tijd; week 1 verschilt met week 8 en 16, terwijl week 8 en 16 meer op elkaar lijken.
- De NGS resultaten laten variatie zien tussen de verschillende materialen; vooral koper en PVC-P wijken veel af van de andere materialen.
- Met de huidige proefopzet bleek de onderzoeksvraag 'Wat is de mate van uitwisseling van micro-organismen tussen de waterfase en de biofilm en wat is het effect van leidingmaterialen hierop?' niet betrouwbaar beantwoord te kunnen worden.
- De resultaten van de praktijkmonsters van de Bloemendalerpolder laten zien dat er een minimaal effect was van de tussenliggende 1500m PE op de waterkwaliteit.
- De resultaten van de praktijkmonsters van de Bloemendalerpolder laten zien dat er een effect was van de tussenliggende 1500m PE op de biofilm. Dit verschil is met name zichtbaar in de ATP-concentratie en *Aeromonas*-aantallen in de biofilm van PE-100 op de effluent locatie.
- De resultaten van de praktijkmonsters van de Bloemendalerpolder laten zien dat de samenstelling van de bacteriepopulatie in de biofilm tussen de vier biofilmmonsters verschillen, waarbij ook verschillen worden waargenomen tussen dezelfde materialen of dezelfde locatie.
- Een vergelijking van de resultaten van de materialentest en de Bloemendalerpolder laat zien dat in de praktijksituatie andere bacteriegroepen dominant zijn op PE-100 of PVC-U dan in de materialentest en dat in de materialentest bepaalde

bacteriegroepen dominant zijn in de biofilm en opzichte van water, terwijl in de praktijksituatie dit andersom is.

6.2 Aanbevelingen

Op basis van de resultaten doen we de volgende aanbevelingen:

- Om het model voor de uitwisseling te kwantificeren, de materialentest opnieuw uitvoeren met de benodigde controles.
- Materialentest opnieuw uitvoeren, waarbij meer controles worden meegenomen en gebruik wordt gemaakt van gelabelde bacteriën. Deze gelabelde bacteriën (bijvoorbeeld met green fluorescent protein) kan worden achterhaald waar bepaalde bacteriën groeien.
- Water in de materialentest gebruiken dat van maar één pompstation afkomstig is zodat dit geen extra variabele betekent.
- Verschillende materialen analyseren in een dynamisch systeem, zoals bijvoorbeeld KIVODIS, zodat kan worden achterhaald of de resultaten beter overeenkomen met praktijksituaties.
- Effect van hydraulica op uitwisseling nader analyseren, gezien de verschillen tussen de materialentest (stilstand) en praktijk (continue doorstroming). Dit wordt momenteel uitgevoerd met de proefinstallatie KIVODIS.
- In deze studie hebben we gezien dat de veranderingen van week 8 t/m 16 beperkt zijn, dus mogelijk zouden we de test ook kunnen verkorten. Door bijvoorbeeld na 8 weken alle materiaalstukken uit te nemen (zodat de test 8 weken korter wordt) of door bijvoorbeeld in week 8, 9 en 10 materiaalstukken uit te nemen (zodat de test 6 weken korter wordt). Dit zou nog wel verder moeten worden getest.

7 Referenties

- Anaissie, E. J., & Costa, S. F. (2001). Nosocomial aspergillosis is waterborne. *Clinical infectious diseases*, 33(9), 1546-1548.
- Anoniem (2017) Regeling materialen en chemicaliën drink- en warm tapwatervoorziening <http://wetten.overheid.nl/BWBR0030279/2017-07-01>
- Bergey, D.H., Holt, J. (2000). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins. Ninth edition.
- Bucheli-Witschel, M., Kötzsch, S., Darr, S., Widler, R., & Egli, T. (2012). A new method to assess the influence of migration from polymeric materials on the biostability of drinking water. *Water research*, 46(13), 4246-4260.
- Buse, H. Y., Lu, J., Lu, X., Mou, X., & Ashbolt, N. J. (2014). Microbial diversities (16S and 18S rRNA gene pyrosequencing) and environmental pathogens within drinking water biofilms grown on the common premise plumbing materials unplasticized polyvinylchloride and copper. *FEMS microbiology ecology*, 88(2), 280-295.
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I.L., Agellon, L.B. and Xia, J. (2017) MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res.*
- Douterelo, I., Jackson, M., Solomon, C., & Boxall, J. (2016). Microbial analysis of in situ biofilm formation in drinking water distribution systems: implications for monitoring and control of drinking water quality. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(7), 3301-3311.
- Havelaar, A. H. (1992). De betekenis van *Aeromonas* in drinkwater voor de volksgezondheid. In D. Van der Kooij (Ed.), *Aeromonas in drinkwater. Vóórkomen, bestrijding, betekenis*. (pp. 84-94). Nieuwegein: Kiwa NV.
- Heijnen, L., Wullings, B., & Medema, G. (2002). Toepassingsmogelijkheden van moleculair-biologische methoden voor de drinkwater praktijk (Vol. BTO 2002.136, pp. 106). Nieuwegein: KWR.
- Hoekstra A. C., van der Kooij D., Visser A. and Hijnen W. A. M. (1984). Bacteriological, chemical and physical characteristics of samples from two hot water systems containing *Legionella pneumophila*, compared with drinking water from municipal waterworks. In: *Legionella, Proceedings of the 2nd International Symposium*, C. Thornsberry, A. Balows, J. C. Feeley and W. Jakobovský (eds), Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, pp. 343-346.
- Kalmbach S., Manz W., Szewzyk U. (1997). Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(11), 4164-4170.
- Kalmbach S., Manz W., Wecke J. and Szewzyk U. (1999). *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49 Pt 2, 769-777.
- Kuiper, M. W. (2006). *Occurrence of Legionella pneumophila and Hartmannella vermiformis in fresh water environments and their interactions in biofilms*. (PhD), Wageningen University, Wageningen.
- Kuiper, M. W., Valster, R. M., Wullings, B. A., Boonstra, H., Smidt, H., & Van Der Kooij, D. (2006). Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 5750-5756.
- Latgé, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 12(2), 310-350.
- Learbuch, K. L. G. (2016). Legionellagroei-potentie van (geremineraliseerd) RO-water (Vol. BTO 2016.202, pp. 32). Nieuwegein: KWR BTO 2016.202.

- Learbuch, K., & Wullings, B. (2018). Indicator voor biofilm in het drinkwater- distributiesysteem (Vol. BTO 2018.011, pp. 68). Nieuwegein: KWR.
- Liu, G., Bakker, G. L., Li, S., Vreeburg, J. H., Verberk, J. Q., Medema, G. J., . . . Van Dijk, J. C. (2014). Pyrosequencing reveals bacterial communities in unchlorinated drinking water distribution system: an integral study of bulk water, suspended solids, loose deposits, and pipe wall biofilm. *Environ Sci Technol*, 48(10), 5467-5476. doi: 10.1021/es5009467
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1997). *Brock biology of microorganisms* (Vol. 11). Upper Saddle River, NJ: Prentice hall.
- Roeder, R. S., Heeg, K., Tarne, P., Benölken, J. K., Schaule, G., Bendinger, B., ... & Szewzyk, U. (2010). Influence of materials, water qualities and disinfection methods on the drinking water biofilm community. *Water Practice and Technology*, 5(4), wpt2010082.
- Roeselers, G., Coolen, J., van der Wielen, P. W. J. J., Jaspers, M. C., Atsma, A., de Graaf, B., & Schuren, F. (2015). Microbial biogeography of drinking water: patterns in phylogenetic diversity across space and time. *Environ Microbiol*.
- Rožej, A., Cydzik-Kwiatkowska, A., Kowalska, B., & Kowalski, D. (2015). Structure and microbial diversity of biofilms on different pipe materials of a model drinking water distribution systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(1), 37-47.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. and Weber, C.F. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75(23), 7537-7541.
- Selvaraju, S. B., Khan, I. U., & Yadav, J. S. (2005). Biocidal activity of formaldehyde and nonformaldehyde biocides toward *Mycobacterium immunogenum* and *Pseudomonas fluorescens* in pure and mixed suspensions in synthetic metalworking fluid and saline. *Appl Environ Microbiol*, 71(1), 542-546.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbbraken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C. H., . . . Tanney, J. B. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141-173.
- Torvinen, E., Lehtola, M. J., Martikainen, P. J., & Miettinen, I. T. (2007). Survival of *Mycobacterium avium* in drinking water biofilms as affected by water flow velocity, availability of phosphorus, and temperature. *Appl Environ Microbiol*, 73(19), 6201-6207.
- van der Kooij, D.; Oranje, J. P.; Hijnen, W. A., (1982a) Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in tap water in relation to utilization of substrates at concentrations of a few micrograms per liter. *Appl Environ Microbiol*, 44, (5), 1086-95.
- van der Kooij, D.; Visser, A.; Hijnen, W. A. M., (1982b) Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *Journal (American Water Works Association)*, 74, (10), 540-545.
- Van der Kooij, D.; Baggelaar, P. K.; Veenendaal, H. R.; Moulin, L.; Corfitzen, C. B.; Albrechtsen, H. J.; Holt, D.; Hamsch, B. (2006) Standardising the biomass production potential test method for determining the enhancement of microbial growth by construction products in contact with drinking water.
- Van der Kooij, D., Wubbels, G., & Veenendaal, G. (2006). *Legionella anisa* in leidingwater: bedreiging of bondgenoot? (Vol. KWR 06.089, pp. 29). Nieuwegein: KWR.
- van der Kooij, D., Bakker, G.L., Italiaander, R., Veenendaal, H.R., & Wullings, B.A., (2017). Biofilm composition and threshold concentration for growth of *legionella pneumophila* on surfaces exposed to flowing warm tap water without disinfectant. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM. 02737-02716.
- van der Wielen, P. W. J. J., Italiaander, R., & Heijnen, L. (2011). Kwantitatieve detectiemethoden voor opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater. (Vol. BTO 2011.034(s)). Nieuwegein: KWR.
- van der Wielen, P. W. J. J., Italiaander, R., Wullings, B. A., Heijnen, L., & van der Kooij, D. (2014). Opportunistic pathogens in drinking water in the Netherlands. In D. Van der Kooij & P. W.

- J. J. van der Wielen (Eds.), *Microbial Growth in Drinking-Water Supplies. Problems, Causes, Control and Research Needs* (pp. 177-205). London, UK: IWA Publishing.
- van der Wielen, P. W. J. J., & Lut, M. C. (2016). Distribution of microbial activity and specific microorganisms across sediment size fractions and pipe wall biofilm in a drinking water distribution system. *Water Science & Technology: Water Supply*, 16(4), 896-904.
- van der Wielen, P. W. J. J., & van der Kooij, D. (2009). Literatuurstudie naar opportunistisch-ziekteverwekkende micro-organismen die zich in drinkwater kunnen vermeerderen (Vol. BTO 2009.001, pp. 82). Nieuwegein: KWR.
- van der Wielen, P. W. J. J., & van der Kooij, D. (2011). Opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater (Vol. BTO 2011.035). Nieuwegein: KWR.
- van der Wielen, P. W. J. J., & Wullings, B. (2013). Moleculaire methoden voor de kwantificatie en identificatie van *Aeromonas* in drinkwater (Vol. BTO 2013.228). Nieuwegein: KWR.
- Van der Wielen, P.W.J.J. & Bereschenko, L. 2016. Rol van leidingmaterialen bij groei van micro-organismen en opportunistische pathogenen. BTO 2016.022. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
- Van der Wielen, P.W.J.J. (2018). Aandachtswaarden nieuwe meetmethoden biologische stabiliteit. BTO 2018.049. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
- Warris, A., Klaassen, C. H., Meis, J. F., de Ruiter, M. T., de Valk, H. A., Abrahamsen, T. G., . . . Verweij, P. E. (2003). Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from water, air, and patients shows two clusters of genetically distinct strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4101-4106.
- Wullings, B. (2015). Karakterisering van bacteriën die een rol spelen in de biologische ontijzering en ontmanging in de grondwaterzuivering (Vol. BTO 2015.032, pp. 60). Nieuwegein: KWR.
- Wullings, B., Wubbels, G., Douma, A., & Voogt, R. (2005). Detectie van *Legionella pneumophila* in water met een kwantitatieve real-time PCR-methode (Vol. BTO 2005.033, pp. 34). Nieuwegein: KWR.

Bijlage I Leidinguitname protocol

- Leiding wordt uitgegraven en rondom vrijgemaakt van de bodem;
- Plastic bescherming plaatsen in de put, om de put schoon te houden;
- Ontwateren: wanneer de leiding onder de grondwaterspiegel ligt wordt een ontwateringspomp gebruikt om de put vrij te houden van water;
- Afsluiters voor en na uitnamepunt dicht/ druk eraf;
- Buitenkant leiding wordt goed schoongemaakt met chloorwater;
- Even aftekenen met een watervaste marker: wat de stroomrichting is en wat de bovenkant is;
- Zaag voor gebruik schoonmaken met chloorwater.;
- Leiding wordt ontwaterd door een sleufje te zagen in de buiswand. Zorg er voor dat de put vrij blijft van water;
- Nadat het meeste water is weggelopen uit de leiding, wordt met twee zaagsneden, het stuk leiding van 0,5 m (maximaal de breedte van de koelbox!) uitgezaagd. Vermijd tijdens het verwijderen van het stuk leiding sterke mechanische trillingen en schokken. Ook mag het stuk leiding in- en uitwendig niet in aanraking komen met het bodemmateriaal of met het grondwater.
- Als de leiding water of de bodem heeft geraakt, is dit geen bruikbaar monster meer en zal de leidinguitname opnieuw dienen te gebeuren.
- Het leidingstuk wordt (zonder water) in een steriele zak gedaan en met een kabelbinder (tyrap) dichtgemaakt. Vervolgens wordt het geheel in nog een steriele zak gedaan en ook weer dicht gemaakt met een kabelbinder (tyrap). Dit is zodat er geen water van het ijs bij de leiding kan komen. Vervolgens wordt het geheel in de koelbox met ijs geplaatst en vervoerd naar het laboratorium.