

A network diagram consisting of various-sized light blue circles connected by thin white lines, set against a solid blue background. The circles are scattered across the page, with some larger and some smaller, creating a complex web of connections.

Bedrijfstakonderzoek
BTO 2020.036 | Juli 2020

**Invloed van
temperatuur op groei
van opportunistische
ziekteverwekkers in
drinkwater**

Bedrijfstakonderzoek

KWR

Bridging Science to Practice

Rapport

Invloed van temperatuur op groei van opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater

BTO 2020.036 | Juli 2020

Dit onderzoek is onderdeel van het collectieve Bedrijfstakonderzoek van KWR, de waterbedrijven en Vewin.

Opdrachtnummer

402045/131

Projectmanager

Geertje Pronk

Opdrachtgever

BTO - Bedrijfsonderzoek

Auteur

Paul van der Wielen

Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Keywords

Opportunistische ziekteverwekkers, temperatuur, Drinkwaterbesluit, temperatuurnorm, microbiologische drinkwaterkwaliteit

Jaar van publicatie
2020

Meer informatie

Dr. Paul van der Wielen
T +31 306069642
E paul.van.der.wielen@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl



Juli 2020 ©

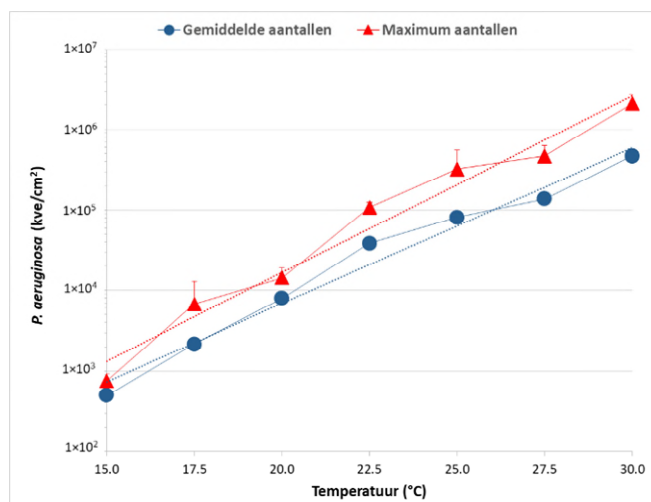
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen,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

Managementsamenvatting

Hogere drinkwatertemperaturen resulteren in hogere aantallen opportunistische ziekteverwekkers in de biofilm

Auteur: Paul van der Wielen.

Op grond van een studie naar de invloed van een toenemende drinkwatertemperatuur (15 tot 30°C) op groei van vijf verschillende opportunistische ziekteverwekkers in natuurlijke drinkwaterbiofilms, wordt aanbevolen om de huidige norm van 25°C in het Drinkwaterbesluit te handhaven. Door klimaatverandering nemen de drinkwatertemperatuur en het aantal overschrijdingen van de drinkwaternorm van 25°C toe. Dit onderzoek laat zien dat een verhoogde drinkwatertemperatuur het risico verhoogt op groei van opportunistische ziekteverwekkers in het distributiesysteem, zoals *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* en *Mycobacterium kansasii*. Deze ziekteverwekkers verhogen het gezondheidsrisico voor mensen met een verzwakt immuunsysteem.



Gemiddeld en maximaal aantallen *P. aeruginosa* in een natuurlijke drinkwaterbiofilm geïncubeerd bij verschillende temperaturen

Belang: onduidelijk of hogere watertemperatuur gevaar betekent voor de volksgezondheid

Eerder onderzoek in het BTO heeft laten zien dat opportunistische ziekteverwekkers zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Aspergillus fumigatus* in het Nederlandse drinkwater kunnen voorkomen. Deze drinkwaterstammen zijn identiek aan patiëntstammen en kunnen dus een bedreiging vormen voor de volksgezondheid. Tevens blijkt dat door klimaatverandering de drinkwatertemperatuur in Nederland toeneemt, wat betekent dat in het distributiesysteem de temperatuurnorm van 25°C vaker wordt overschreden. Vooralsnog is onduidelijk

of die hogere drinkwatertemperatuur resulteert in hogere aantallen opportunistische ziekteverwekkers. Om dit te achterhalen is de invloed van drinkwatertemperatuur op de vermeerdering van opportunistische ziekteverwekkers onderzocht. Daarnaast wordt ingegaan op de vraag wat een hogere norm voor drinkwatertemperatuur in Drinkwaterbesluit kan betekenen voor eventuele gezondheidsrisico's.

Aanpak: drinkwaterbiofilms gekweekt bij verschillende temperaturen

Vier opportunistische ziekteverwekkers – *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium kansasii* en *Aspergillus fumigatus* – zijn toegevoegd aan monsterflessen waarin drinkwater en stukken PVC-P leidingmateriaal zat. Het drinkwater van de monsterflessen werd wekelijks ververst en gedurende 112 dagen geïncubeerd bij temperaturen tussen de 15,0 en 30,0°C. Op zes momenten werd een stuk PVC-P leidingmateriaal uitgenomen, de biofilm die zich erop heeft ontwikkeld bemonsterd en geanalyseerd op actieve biomassa en aantallen van de vier verschillende ziekteverwekkers. De resultaten van deze experimenten werden samen met eerdere resultaten ten aanzien van *Legionella pneumophila* geïnterpreteerd in relatie tot de drinkwaternorm in het Drinkwaterbesluit.

Resultaten: opportunistische ziekteverwekkers nemen toe bij hogere temperaturen

In een natuurlijke drinkwaterbiofilm wisten twee van de vier opportunistische ziekteverwekkers zich al bij temperaturen onder de 20°C te vermeerderen. Bij één hiervan namen de aantallen toe bij temperatuurstijgingen tot 30°C. De twee andere opportunistische ziekteverwekkers wisten zich in ieder geval te vermeerderen bij temperatuur van 20°C of 25°C of hoger. De aantallen namen daarbij toe bij een toenemende watertemperatuur tot 30°C. Onder invloed van temperatuurstijging nam de hoeveelheid actieve biomassa in de biofilm echter af. Uit de resultaten wordt geconcludeerd dat een

hogere norm voor de drinkwatertemperatuur in het distributiesysteem kan leiden tot hogere aantallen *P. aeruginosa*, *M. kansasii*, *A. fumigatus* en *L. pneumophila* in het distributiesysteem. Voor de eerste drie genoemde opportunistische ziekteverwekkers geldt dit bij verhoging vanaf 25°C, terwijl voor *L. pneumophila* pas hogere aantallen worden waargenomen wanneer de norm wordt verhoogd tot 28°C of hoger. Hogere aantallen van deze opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwater verhoogt het gezondheidsrisico voor mensen met een verzwakt immuunsysteem.

Toepassing: handhaaf drinkwaternorm op 25°C

Er wordt aanbevolen om de huidige norm voor de drinkwatertemperatuur van 25°C in het Drinkwaterbesluit te handhaven. Dit gaat hogere aantallen opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwaterdistributiesysteem tegen en verlaagt daardoor waarschijnlijk het gezondheidsrisico op infectie met opportunistische ziekteverwekkers via drinkwater. Wel is het raadzaam om te onderzoeken of een 98-percentielwaarde van 25°C voor drinkwater een betere norm is in relatie tot het vóórkomen van opportunistische ziekteverwekkers dan de huidige maximum norm van 25°C.

Het rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Invloed van temperatuur op groei van opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater* (BTO-2020.036).

Meer informatie

Dr. Geertje Pronk
T +31 306069634
E geertje.pronk@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands



Inhoud

Managementsamenvatting	3
Inhoud6	
1 Introductie	8
2 Materiaal en Methoden	9
2.1 Opportunistische pathogenen	9
2.2 Opzet experimenten	9
2.2.1 Entflessen	9
2.2.2 Groei bij verschillende temperaturen	9
2.2.3 Monstername	10
2.3 Analyses	10
2.3.1 ATP	10
2.3.2 Kweekmethoden	10
2.3.3 DNA-isolatie en qPCR	10
3 Resultaten	12
3.1 Groei curven bij verschillende temperaturen (15,0 tot 30,0 °C)	12
3.1.1 ATP	12
3.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
3.1.3 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	14
3.1.4 <i>Mycobacterium kansasii</i>	15
3.1.5 <i>Aspergillus fumigatus</i>	16
3.2 Groei maximum/opbrengst bij verschillende temperaturen (15,0 tot 30,0 °C)	17
3.2.1 ATP	17
3.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
3.2.3 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	18
3.2.4 <i>Mycobacterium kansasii</i>	19
3.2.5 <i>Aspergillus fumigatus</i>	20
4 Discussie	21
4.1 Totale biomassa	21
4.2 <i>Legionella pneumophila</i>	21
4.3 <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>M. kansasii</i> en <i>A. fumigatus</i>	22
4.3.1 Invloed van temperatuur	22
4.3.2 Invloed van andere factoren	25
4.4 Betekenis voor de drinkwaternorm van 25°C	26

5	Conclusies en aanbevelingen	31
5.1	Conclusies	31
5.2	Aanbevelingen	32
6	Referenties	35
I	Bijlage – Data groeicurven	38
II	Bijlage – Data groeiofbrengst	39

1 Introductie

In Nederland wordt het drinkwater gedistribueerd zonder een desinfectieresidu en wordt de groei van micro-organismen beperkt door de beperkte beschikbaarheid van biodegradeerbaar organisch koolstof (BDOC) in het drinkwater. Ondanks deze ultraoligotrofe condities in het Nederlandse drinkwater, zijn er micro-organismen die zich onder deze condities kunnen vermeerderen. Enkele micro-organismen die daartoe in staat zijn, kunnen opportunistische ziekteverwekkend zijn, dat wil zeggen dat ze ziekte kunnen veroorzaken bij mensen met een verzwakt immuunsysteem. De afgelopen tien jaar zijn verschillende onderzoeken uitgevoerd naar het vóórkomen van opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater en daaruit is duidelijk geworden dat de opportunistische pathogenen *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* en *Stenotrophomonas maltophilia* in het Nederlandse drinkwater aanwezig kunnen zijn (van der Wielen & van der Kooij, 2011; 2013; van der Wielen, 2014). Aanvullend onderzoek in het BTO heeft tevens laten zien dat het genotype van drinkwaterisolaten en patiëntisolaten van *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* overeenkomen, wat het aannemelijk maakt dat de drinkwaterisolaten van deze twee opportunistische ziekteverwekkers in staat zijn om patiënten te infecteren (Wullings, 2017; van der Wielen & Wullings, 2019).

Problemen met deze organismen uit drinkwater zouden de aankomende jaren kunnen toenemen, doordat we steeds meer mensen met een verzwakt immuunsysteem in onze Westerse maatschappij krijgen (Glasmacher et al., 2003). Daarnaast zal onder invloed van klimaatverandering de drinkwatertemperatuur in de zomer steeds verder stijgen (Agudelo-Vera et al., 2020). Onduidelijk is in hoeverre die temperatuuropenname een risico vormt op groei van opportunistische ziekteverwekkers die zich in drinkwater vermeerderen. Volgens het Drinkwaterbesluit mag de drinkwatertemperatuur bij het punt van levering aan de drinkwaterinstallatie van de consument niet hoger zijn dan 25°C. Deze norm is overgenomen uit de WHO richtlijnen voor drinkwater (WHO, 2006). De afgelopen jaren is door de warmere zomers een toename gezien van het aantal overschrijdingen van de drinkwatertemperatuurnorm van 25°C (ILT, 2019). Het is waarschijnlijk dat we in de toekomst vaker dergelijke warme zomers krijgen of dat deze mogelijk nog warmer worden. Deze ontwikkelingen roepen de volgende vragen op:

1. Wat is de invloed van hogere drinkwatertemperatuur op groei van de opportunistische ziekteverwekkers die zich in drinkwater kunnen vermeerderen?
2. Wat is het gevolg van een hogere drinkwatertemperatuurnorm voor het gezondheidsrisico ten aanzien van opportunistische ziekteverwekkers?

De invloed van de drinkwatertemperatuur op groei van *L. pneumophila* is in het verleden bepaald door KWR in opdracht van de Nederlandse overheid (Oesterholt et al., 2007; van der Kooij et al., 2009b; van der Kooij et al., 2010), maar wat de invloed is op groei van andere opportunistische ziekteverwekkers die in het Nederlandse drinkwater kunnen voorkomen, is nog onbekend. Het onderzoek beschreven in dit rapport probeert daarom een antwoord te vinden op de twee hier boven beschreven vragen in relatie tot een viertal opportunistische ziekteverwekkers (*P. aeruginosa*, *A. fumigatus*, *S. maltophilia* en *Mycobacterium kansasii*) die tijdens eerder onderzoek in het Nederlandse drinkwater zijn aangetroffen (Engel et al., 1980; van der Wielen & van der Kooij, 2011; 2013; van der Wielen, 2014). Daarvoor is onderzoek uitgevoerd waarbij de invloed van verschillende incubatietemperaturen is achterhaald op de groei van deze vier opportunistische ziekteverwekkers in een natuurlijke biofilm op PVC-P dat in contact staat met drinkwater.

2 Materiaal en Methoden

2.1 Opportunistische pathogenen

Binnen het project zijn de volgende vier opportunistische pathogenen onderzocht: *P. aeruginosa*, *A. fumigatus*, *S. maltophilia* en *M. kansasii* en de informatie over de stam die voor elke ziekteverwekker is gebruikt staat vermeld in Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Opportunistische ziekteverwekkers gebruikt in de studie.

Opportunistische ziekteverwekker	Stamcode KWR	Bron	Bijzonderheden
<i>P. aeruginosa</i>	M103998	Nederlands drinkwater	MLST type: ST 712
<i>S. maltophilia</i>	M143212	Nederlands drinkwater	Genoomsequentie bekend
<i>M. kansasii</i>	Geen	Patiënt	Verkregen van Radboud UMC
<i>A. fumigatus</i>	M142650-2	Nederlands drinkwater	Getypeerd met microsatellietenanalyse

2.2 Opzet experimenten

2.2.1 Entflessen

Voor ieder van de vier opportunistische ziekteverwekkers werd een entfles gemaakt in minimaal medium. *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* en *A. fumigatus* groeiden tot voldoende aantallen in deze entflessen. *M. kansasii* groeide niet in de entfles met mineraal medium, waardoor het inoculum vanuit het groeimedium (dat werd verkregen van het Radboud UMC) werd gebruikt.

2.2.2 Groei bij verschillende temperaturen

Om de groei van de verschillende opportunistische pathogenen bij verschillende temperaturen onder natuurlijke condities te bepalen, werden materiaalstukjes van PVC-P (50 cm²) aan flessen met drinkwater (900 ml, drinkwater getapt in het microbiologisch laboratorium van KWR) toegevoegd. Aan het drinkwater is fosfaat en nitraat toegevoegd volgens het standaardprotocol van de materialentest (NEN-EN 16421-2015). Aan iedere fles met PVC-P materiaalstukjes en drinkwater werd vervolgens op dag 0 en op dag 7 *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. kansasii* en *A. fumigatus* toegevoegd, waarbij de toegevoegde aantallen per organisme in iedere fles ongeveer 1×10^4 cellen per 900 ml waren, dus in totaal werden 4×10^4 cellen toegevoegd aan iedere fles. De flessen werden vervolgens 112 dagen in duplo geïncubeerd bij 15,0; 17,5; 20,0; 22,5; 25,0; 27,5 en $30,0 \pm 1,0$ °C. Na twee weken werd het drinkwater van de flessen wekelijks ververst.

2.2.3 Monstername

Op dag 0, 7, 14, 28, 56 en 112 werden per fles twee PVC-P materiaalstukjes uitgenomen. De biofilm op de materiaalstukjes werd bemonsterd zoals beschreven in NEN-EN 16421-2015 en vervolgens direct geanalyseerd op ATP en kweek van *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* en *A. fumigatus*. Daarnaast werd een deel van de gesoniceerde biofilmsuspensie gefiltreerd over een 0,22 µm polycarbonaatfilter. Het filter werd toegevoegd aan een beadbuis van de PowerBiofilm™ DNA isolatie kit van MoBio, dat 350 µl van oplossing BF1 van de kit bevat. Vervolgens werd 10 µl DNA suspensie van de interne controle toegevoegd en werden de beadbuisen opgeslagen bij -20°C totdat het DNA werd geïsoleerd en geanalyseerd op het aantal genkopieën van *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. kansasii* en *A. fumigatus*.

2.3 Analyses

2.3.1 ATP

De ATP-concentratie van de biofilm op de PVC-P materiaalstukjes werd bepaald volgens NEN-EN 16421-2015.

2.3.2 Kweekmethoden

2.3.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Het aantal kolonievormende eenheden van *P. aeruginosa* werd bepaald volgens de internationale standaardmethode voor drinkwater (ISO 16266). Een selectief kweekmedium (cetrimide-nalidixic acid agar) wordt in dit ISO-protocol gebruikt waar *P. aeruginosa* fluorescerende kolonies op vormt. De agarplaten werden 48 uur geïncubeerd bij 36°C en na 24 en 48 uur werden het aantal fluorescerende kolonies op de agarplaten bepaald.

2.3.2.2 *Stenotrophomonas maltophilia*

Het aantal kolonievormende eenheden van *S. maltophilia* werd bepaald met behulp van vancomycine, imipenem, amphotericine B (VIA) agar. In een eerder onderzoek is aangetoond dat dit agarmedium het meest geschikt is om *S. maltophilia* selectief uit drinkwater te kweken (Wullings, 2017). De agarplaten werden geïncubeerd bij 30°C gedurende 72 uur. Na 24, 48 en 72 uur werden het aantal kolonies op de agarplaten bepaald.

2.3.2.3 *Aspergillus fumigatus*

Het aantal kolonievormende eenheden van *A. fumigatus* werd bepaald op malt extract agar. Dit medium is specifiek voor schimmels, maar door de platen te incuberen bij 50°C is van de schimmels die in drinkwater voorkomen alleen *A. fumigatus* in staat te groeien (Wullings, 2017). De agarplaten werden gedurende 72 uur weggezet bij een incubatietemperatuur van 50°C. Na 24, 48 en 72 uur werden het aantal kolonies op de agarplaten bepaald.

2.3.3 DNA-isolatie en qPCR

2.3.3.1 DNA-isolatie

Na ontdooien van de beadbuisen met de filters werd het DNA geïsoleerd volgens de handleiding van de PowerBiofilm™ kit producent. Het geïsoleerde DNA werd geëluëerd in 150 µl elutiebuffer van de kit.

2.3.3.2 qPCRs

Verschillende qPCRs werden uitgevoerd om het aantal genkopieën van iedere opportunistische ziekteverwekker te bepalen. De qPCR voor *P. aeruginosa* amplificeert specifiek het *regA* gen van *P. aeruginosa* met behulp van twee specifieke primers en een fluorescerende probe. De qPCR voor *S. maltophilia* amplificeert specifiek het *chitA* gen van *S. maltophilia* met specifieke primers en het fluorescerende SYBRgreen. De qPCR voor *M. kansasii* amplificeert specifiek het 16S-23S ITS gen met specifieke primers en een fluorescerende probe. De qPCR voor *A. fumigatus* amplificeert specifiek het 28S rRNA gen van *A. fumigatus* door gebruik van twee specifieke primers en een fluorescerende probe. Details over de primer- en probesequenties alsook over de PCR programma's voor

amplificatie zijn te vinden in eerdere publicaties (van der Wielen & van der Kooij, 2013; van der Wielen & Uytewaal-Aarts, 2013).

Het aantal genkopieën van ieder opportunistische ziekteverwekker werd vervolgens teruggerekend naar cm^2 PVC-P materiaal door gebruik te maken van het aantal genkopieën bepaald met qPCR, de opbrengst van de interne controle, elutievolume, gefiltreerd volume en het oppervlakte van het materiaalstukje.

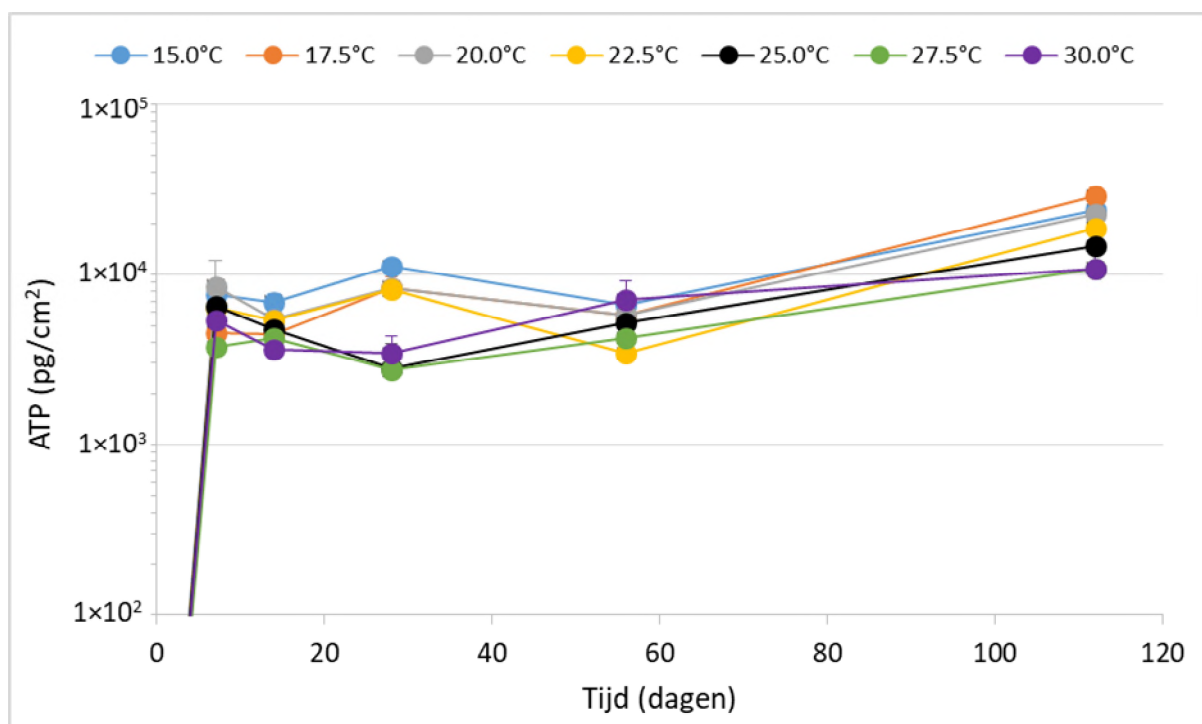
3 Resultaten

3.1 Groeicurven bij verschillende temperaturen (15,0 tot 30,0 °C)

De data verkregen voor de verschillende parameters zijn verwerkt tot grafieken die in deze paragraaf worden getoond. De onderliggende data voor deze grafieken is in tabelvorm terug te vinden in Bijlage I.

3.1.1 ATP

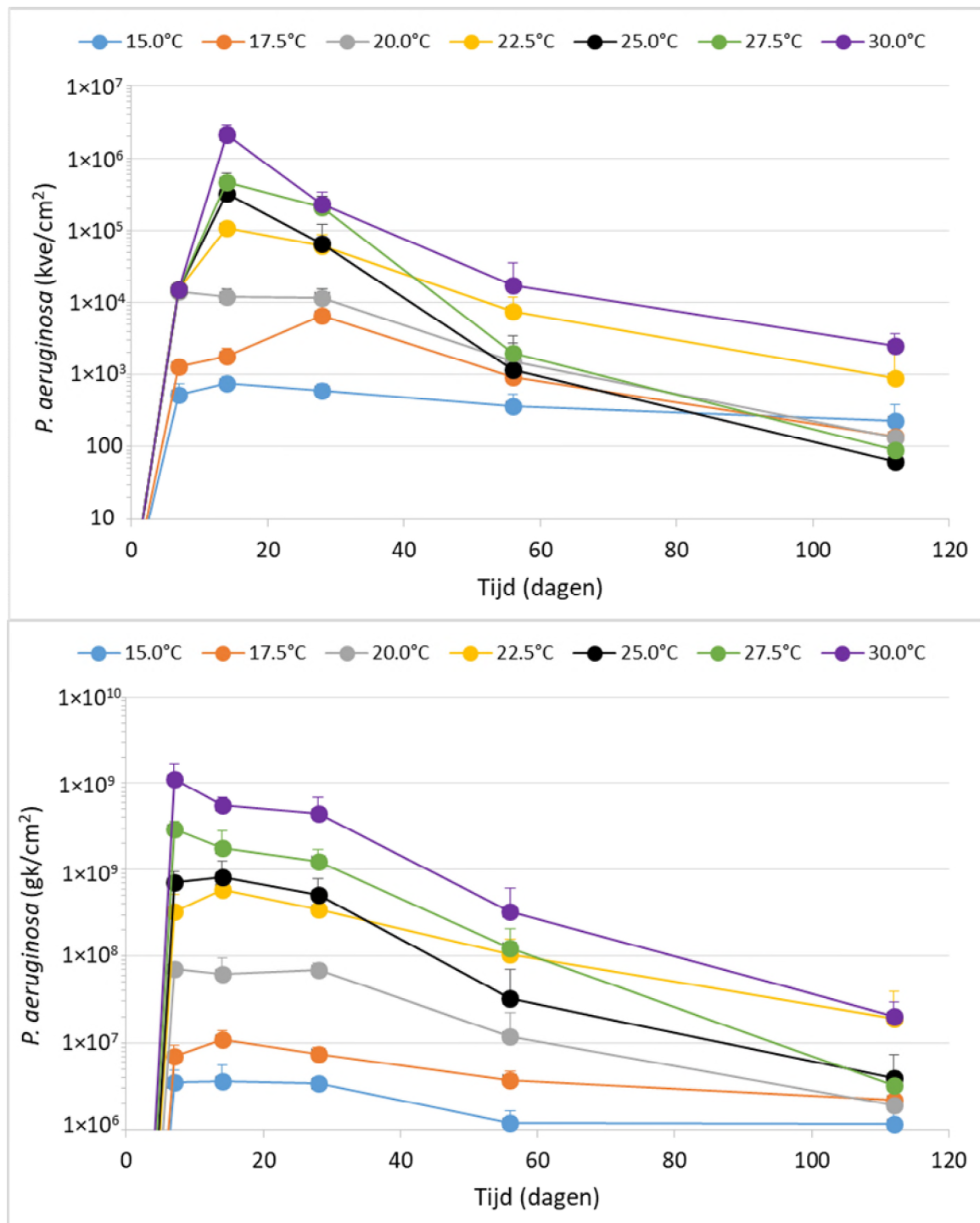
De ATP-concentratie van de biofilm op PVC-P nam sterk toe gedurende de eerste zeven dagen na incubatie bij temperaturen tussen 15,0 en 30,0°C (Figuur 3.1). Van dag 7 t/m dag 56 bleven de ATP-concentraties bij de verschillende incubatietemperaturen relatief constant, maar op dag 112 waren de ATP-concentraties bij alle monsters hoger dan op dag 56. De hoogste ATP-concentraties werden over het algemeen waargenomen bij de laagste incubatietemperaturen (15,0 – 20,0°C) en de laagste ATP-concentraties bij de hoogste incubatietemperaturen (25,0 – 30,0°C).



Figuur 3.1 De gemiddelde ATP-concentratie \pm standaarddeviatie van de biofilm op PVC-P materiaal in flessen met drinkwater en geïncubeerd bij zeven verschillende temperaturen. Vanwege de overzichtelijkheid is de standaarddeviatie alleen naar boven weergegeven.

3.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

De invloed van temperatuur op groei van *P. aeruginosa* in drinkwatergerelateerde biofilms is bepaald door het aantal kweekbare *P. aeruginosa* te bepalen met behulp van selectieve agarplaten en het totaal aantal *P. aeruginosa* te bepalen met behulp van qPCR (Figuur 3.2). De aantallen kweekbare *P. aeruginosa* nam gedurende de eerste zeven dagen sterker toe dan verwacht, waardoor bij de incubatietemperaturen 22,5; 25,0; 27,5 en 30,0°C te lage verdunningen zijn uitgeplaat, wat resulteerde in niet telbare hoeveelheden kolonies (> 300) op iedere agarplaat bij deze temperaturen. De waarden die voor dag 7 zijn weergegeven in Figuur 3.2 voor deze temperaturen zijn daarom niet correct en liggen in werkelijkheid hoger.



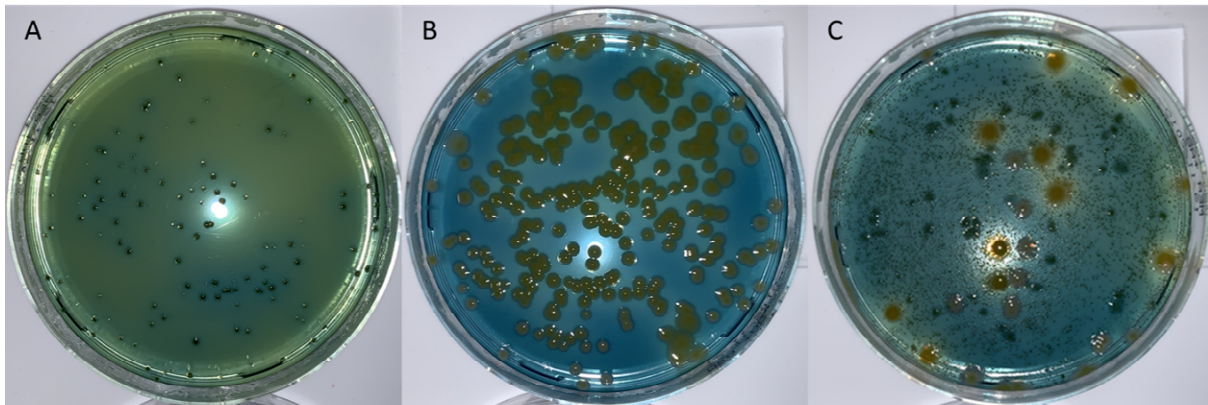
Figuur 3.2. De gemiddelde *P. aeruginosa*-aantallen in kolonievormende eenheden (kve) per cm² (boven) en in genkopieën (gk) per cm² (onder) ± standaarddeviatie in de biofilm op PVC-P materiaal in flessen met drinkwater en geïncubeerd bij zeven verschillende temperaturen. Vanwege de overzichtelijkheid is de standaarddeviatie alleen naar boven weergegeven.

Uit Figuur 3.2 volgt dat het aantal kweekbare *P. aeruginosa* en de totale aantallen van *P. aeruginosa* sterk toenamen van dag 0 tot dag 7 of dag 14, waarna ze tot dag 21 relatief stabiel bleven. Na dag 21 nam *P. aeruginosa* sterk af tot de laatste meting (dag 112). Voor de twee hoogste incubatietemperaturen (27,5 en 30,0°C) werden op dag 7 de hoogste aantal genkopieën van *P. aeruginosa* gevonden, terwijl voor de overige incubatietemperaturen dit maximum op dag 14 lag. Dit betekent dat bij 27,5 en 30,0°C de hoogste aantallen kweekbare *P. aeruginosa* waarschijnlijk ook op dag 7 lagen, maar doordat te lage verdunningen waren ingezet, blijft het onduidelijk of dit maximum inderdaad op dag 7 lag. Desondanks laten beide grafieken zien dat de hoogste aantallen *P. aeruginosa*

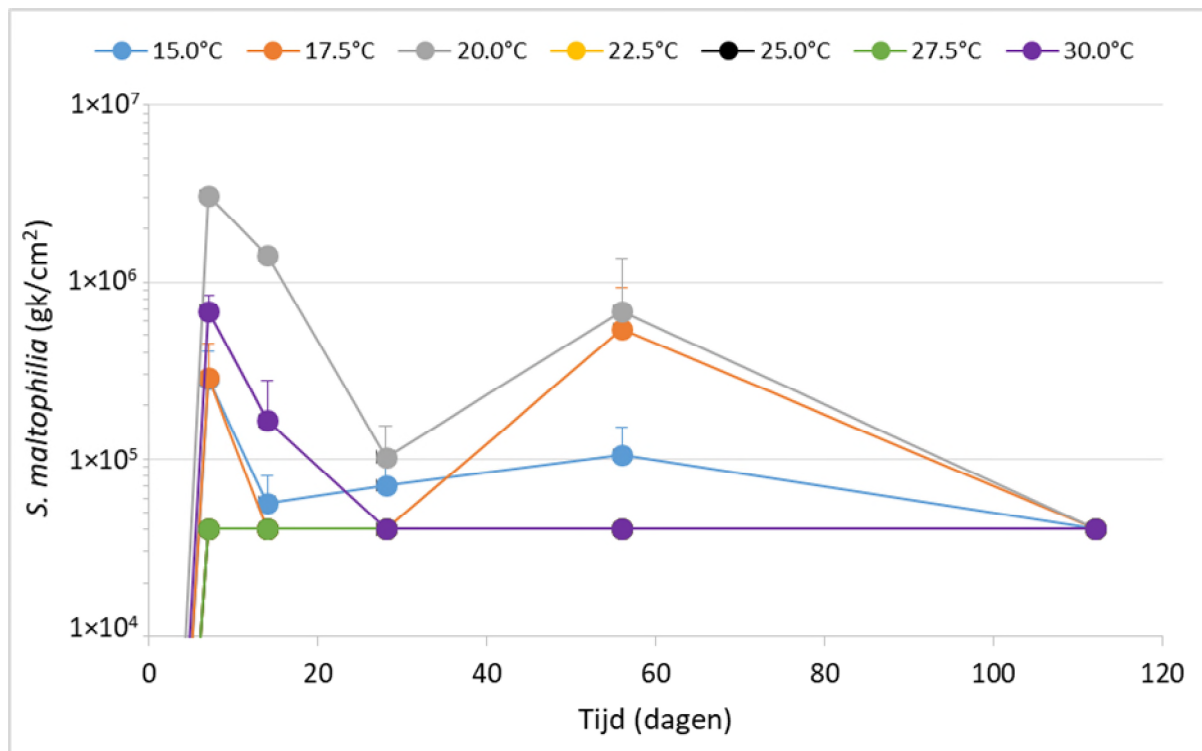
werden waargenomen bij de hoogste incubatietemperatuur (30,0°C) en was het maximum aantal *P. aeruginosa* lager naarmate de incubatietemperatuur afnam, wat in tegenstelling is met de waarnemingen voor de totale actieve biomassa (ATP).

3.1.3 *Stenotrophomonas maltophilia*

De aantallen kweekbare *S. maltophilia* werden getracht te tellen door kweek op een selectief agarmedium. De resultaten lieten echter zien dat andere bacteriën (waaronder *P. aeruginosa*) ook prima groeide op het selectieve agarmedium voor *S. maltophilia* (Figuur 3.3). Hierdoor was het niet mogelijk om het aantal kweekbare *S. maltophilia* te bepalen en werd alleen het aantal genkopieën van *S. maltophilia* bepaald met behulp van qPCR.



Figuur 3.3. Reincultuur van *S. maltophilia* (A) en *P. aeruginosa* (B), én monster van de biofilm uit één van de monsterflessen uitgeplaat op het "selectieve" VIA agar medium voor *S. maltophilia*.

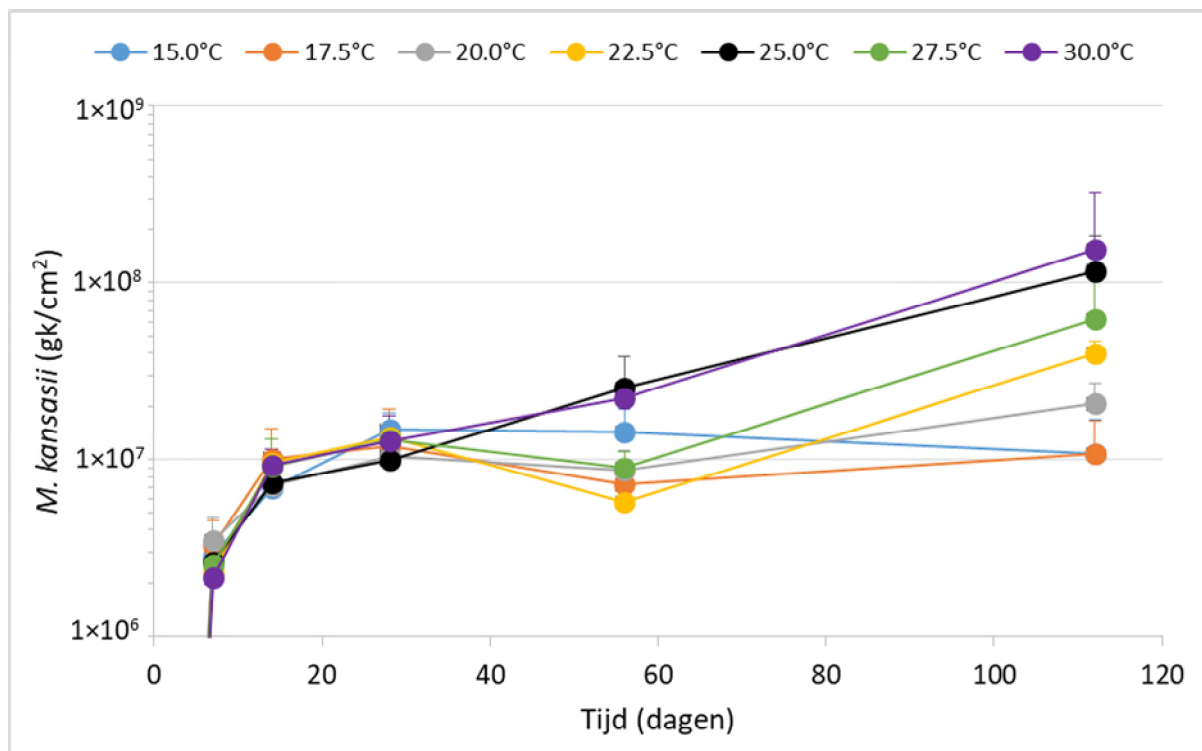


Figuur 3.4. De gemiddelde aantallen genkopieën (gk) per $\text{cm}^2 \pm$ standaarddeviatie van *S. maltophilia* in de biofilm op PVC-P materiaal in flessen met drinkwater en geïncubeerd bij zeven verschillende temperaturen. Vanwege de overzichtelijkheid is de standaarddeviatie alleen naar boven weergegeven. De gemiddelde aantallen voor 20,0°C zijn gebaseerd op slechts één van de twee duploflessen, aangezien de aantallen in de andere duplo fles altijd onder de detectiegrens lagen.

De qPCR resultaten voor *S. maltophilia* waren niet eenduidig. Zo lagen de aantallen op ieder meetmoment onder de detectiegrens ($4,0 \times 10^4$ gk cm⁻²) in de biofilm op PVC-P materiaalstukjes die bij 22,5; 25,0 en 27,5°C waren geïncubeerd (Figuur 3.4). Daarnaast werd waargenomen dat de aantallen *S. maltophilia* ook onder de detectiegrens lagen bij alle meetmomenten voor één van de twee duplo flessen die bij 20,0°C was geïncubeerd, terwijl de aantallen in de andere fles toenamen tot $3,0 \times 10^6$ gk cm⁻². Het lijkt dat *S. maltophilia* dus niet in alle flessen in staat was om de biofilm op de PVC-P materiaalstukjes te koloniseren. Bij de incubatietemperaturen waar *S. maltophilia* wel in de biofilm werd teruggevonden (15,0; 17,5; één van de twee flessen bij 20,0 en 30,0°C) namen de aantallen toe tot dag 7, waarna de aantallen weer afnamen. Bij 30,0°C lag het aantal *S. maltophilia* genkopieën van dag 28 tot 112 onder de detectiegrens. Bij de drie andere temperaturen werd weer een kleine toename van het aantal *S. maltophilia* genkopieën waargenomen op dag 56, terwijl op dag 112 de aantallen bij alle incubatietemperaturen onder de detectiegrens lagen.

3.1.4 *Mycobacterium kansasii*

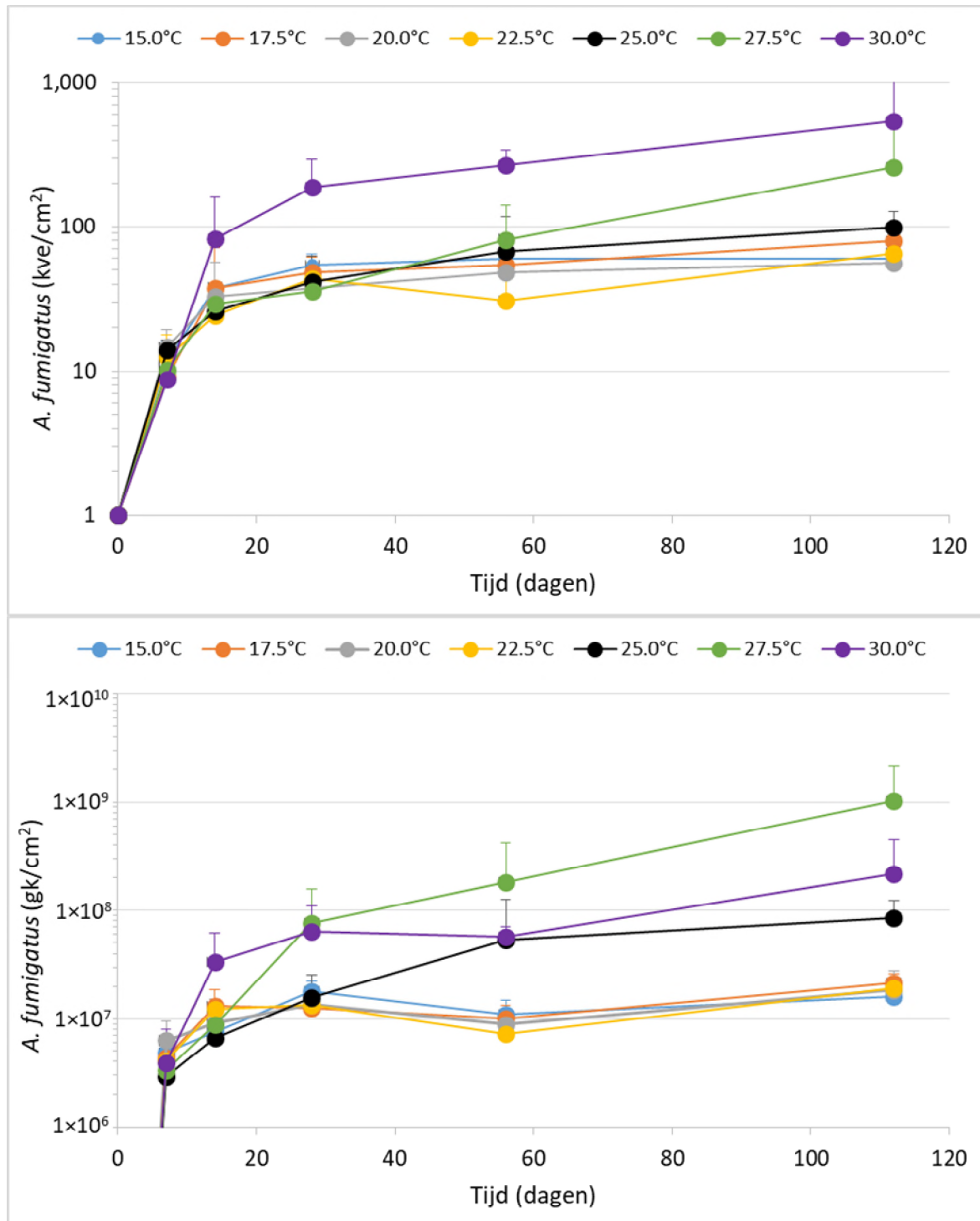
De aantallen *M. kansasii* in de biofilm op de PVC-P materiaalstukjes werden alleen bepaald door het aantal genkopieën met qPCR te kwantificeren. De aantallen *M. kansasii* namen over het algemeen toe van dag 0 t/m dag 112 en voor de incubatietemperaturen 20,0; 22,5; 25,0; 27,5 en 30,0°C lijkt het groeimaximum op dag 112 nog niet te zijn bereikt (Figuur 3.5). Het groeimaximum van *M. kansasii* in de biofilm bij 15,0 en 17,5°C werd op dag 28 bereikt, waarna de aantallen stabiel bleven tot dag 112 op ongeveer 1×10^7 gk cm⁻². Over het algemeen nam het aantal genkopieën van *M. kansasii* toe met toenemende incubatietemperatuur, hoewel bij een incubatietemperatuur van 25,0°C de aantallen vergelijkbaar waren met de aantallen bij 30,0°C.



Figuur 3.5. De gemiddelde aantallen genkopieën (gk) per cm² ± standaarddeviatie van *M. kansasii* in de biofilm op PVC-P materiaal in flessen met drinkwater en geïncubeerd bij zeven verschillende temperaturen. Vanwege de overzichtelijkheid is de standaarddeviatie alleen naar boven weergegeven.

3.1.5 *Aspergillus fumigatus*

De aantallen *A. fumigatus* in de biofilm op PVC-P materiaalstukjes geïncubeerd bij zeven verschillende temperaturen werden bepaald door kweek en met qPCR. De resultaten van deze twee analyses zijn weergegeven in Figuur 3.6.



Figuur 3.6. De gemiddelde *A. fumigatus*-aantallen in kolonievormende eenheden (kve) per cm² (boven) en in genkopieën (gk) per cm² (onder) ± standaarddeviatie in de biofilm op PVC-P materiaal in flessen met drinkwater en geïncubeerd bij zeven verschillende temperaturen. Vanwege de overzichtelijkheid is de standaarddeviatie alleen naar boven weergegeven.

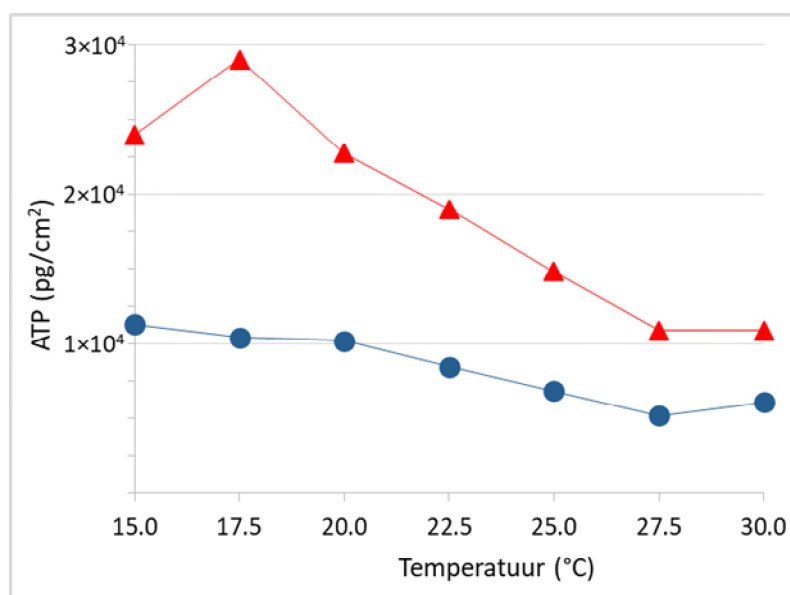
De kweekbare en totale *A. fumigatus* aantallen in de biofilm geïncubeerd bij 15,0; 17,5; 20,0 en 22,5°C namen toe van dag 0 tot en met dag 14/28, waarna de aantallen stabiel bleven tot het laatste meetmoment (dag 112). De aantallen verschilden ook niet tussen deze vier incubatietemperaturen. Wanneer de monsterflessen met de PVC-P materiaalstukjes werden geïncubeerd bij 25,0°C waren de kweekbare *A. fumigatus* aantallen ook vergelijkbaar met de aantallen die werden waargenomen bij de vier laagste temperaturen. Het aantal genkopieën van *A. fumigatus* in de biofilm geïncubeerd bij 25,0°C nam echter wel toe van dag 0 tot en met 56, waarna de aantallen op dag 112 vergelijkbaar waren met dag 56. Deze aantallen waren op dag 56 en 112 hoger dan de aantallen genkopieën die bij de lagere incubatietemperaturen werden waargenomen. De kweekbare en totale aantallen *A. fumigatus* van de monsterflessen geïncubeerd bij 27,5 en 30,0°C namen toe van dag 0 tot en met dag 112 en deze aantallen waren hoger dan bij de lagere incubatietemperaturen. Daarbij waren de kweekbare aantallen bij 30,0°C hoger dan bij 27,5°C, terwijl het aantal genkopieën hoger was bij 27,5°C dan bij 30,0°C. Doordat de aantallen *A. fumigatus* bij deze twee hoogste incubatietemperaturen toenamen tot en met dag 112, zijn de maximum aantallen bij deze twee temperaturen mogelijk hoger wanneer de PVC-P materiaalstukjes langer zouden zijn geïncubeerd.

3.2 Groeimaximum/opbrengst bij verschillende temperaturen (15,0 tot 30,0 °C)

Op basis van de groeicurven beschreven in paragraaf 3.1 werd voor iedere opportunistische ziekteverwekker en de ATP-concentratie het groeimaximum en gemiddelde groeiopbrengst bepaald. Het groeimaximum is daarbij het maximum aantal kolonievormende eenheden of genkopieën gedurende de incubatieperiode van 112 dagen. De gemiddelde groeiopbrengst is bepaald door het gemiddelde te nemen van het aantal kolonievormende eenheden of genkopieën die gemeten zijn van dag 7 tot en met dag 112. De grafieken van deze data zijn weergegeven in deze paragraaf, terwijl de onderliggende data in tabelvorm is opgenomen in Bijlage II.

3.2.1 ATP

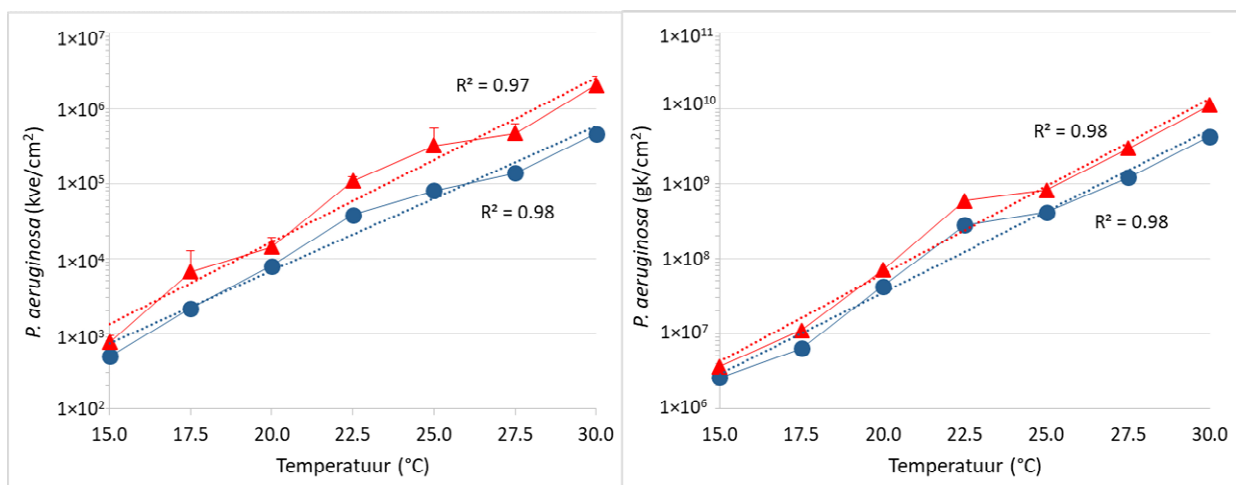
De gemiddelde groeiopbrengst van ATP, als maat voor de hoeveelheid actieve biomassa, was het hoogst bij de laagste incubatietemperatuur (15,0°C) en nam af bij toenemende incubatietemperaturen tot 27,5°C, waarna het stabiliseerde (Figuur 3.7). Het groeimaximum van ATP was het hoogst bij de incubatietemperatuur van 17,5°C en nam ook af bij toenemende incubatietemperatuur tot 27,5°C. Bij 30,0°C was het groeimaximum van ATP vergelijkbaar met het groeimaximum gemeten bij 27,5°C.



Figuur 3.7. Het groeimaximum (rode lijn; ▲) en de gemiddelde groeiopbrengst (blauwe lijn; ●) van ATP, als maat voor totale actieve biomassa, bij zeven verschillende incubatietemperaturen.

3.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

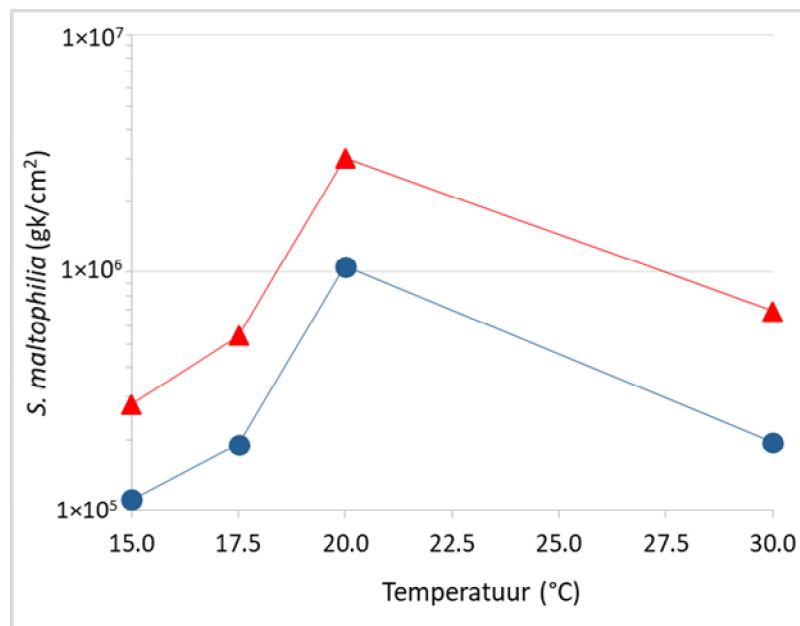
Het groeimaximum en de gemiddelde groeiopbrengst van *P. aeruginosa* nam toe over het gehele traject van 15,0 tot 30,0 °C (Figuur 3.8). Daarbij werd een sterke correlatie waargenomen tussen de incubatietemperatuur en het logaritme van het groeimaximum of de gemiddelde groeiopbrengst ($R^2 \geq 0,97$). Dit betekent dat het aantal kve of gk van *P. aeruginosa* tussen de incubatietemperaturen van 15,0 t/m 30,0°C proportioneel toenam met 0,22 logeenheden bij iedere °C hogere incubatietemperatuur. Doordat deze proportionele toename werd waargenomen tot en met de hoogste incubatietemperatuur van het experiment (30,0 °C), is het waarschijnlijk dat de optimale en maximale groeitemperatuur van *P. aeruginosa* hoger zullen zijn dan 30,0°C. Deze resultaten laten tevens zien dat de *P. aeruginosa* aantallen beneden een drinkwatertemperatuur van 25,0°C al relatief sterk kunnen toenemen.



Figuur 3.8. Het groeimaximum (rode lijn; ▲) en de gemiddelde groeiopbrengst (blauwe lijn; ●) van *P. aeruginosa*, weergegeven in kve cm⁻² (links) en gk cm⁻² (rechts), bij zeven verschillende incubatietemperaturen. Tevens zijn de correlatielijnen en R^2 van de correlaties weergegeven.

3.2.3 *Stenotrophomonas maltophilia*

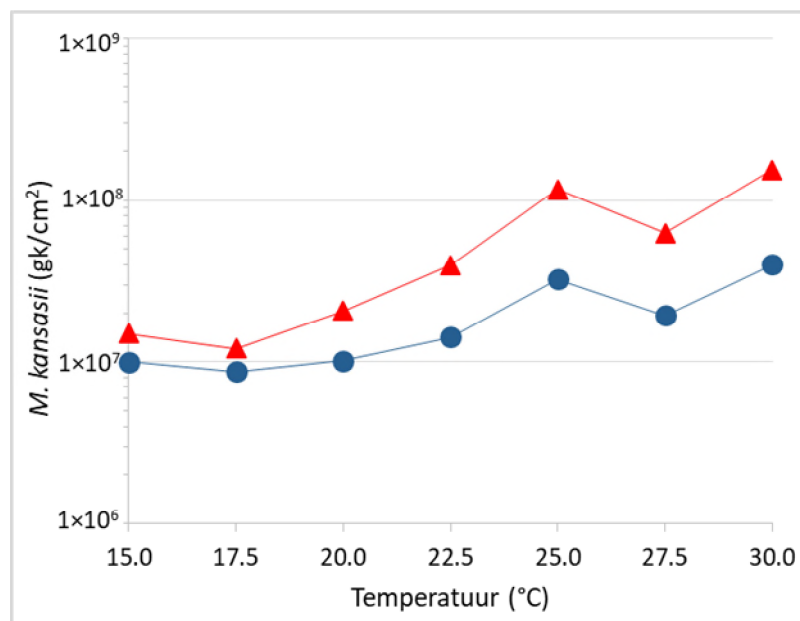
De invloed van de incubatietemperatuur op het groeimaximum en gemiddelde groeiopbrengst van *S. maltophilia* is minder duidelijk (Figuur 3.9). Van 15,0 tot 20,0°C namen het groeimaximum en de gemiddelde groeiopbrengst vergelijkbaar toe, maar bij 22,5 en 25,0°C waren het groeimaximum en de gemiddelde groeiopbrengst in ieder geval niet hoger dan de detectiegrens van 4×10^4 gk cm⁻². Bij 30°C waren het groeimaximum en gemiddelde groeiopbrengst van *S. maltophilia* weer hoger dan deze detectiegrens, maar lager dan de waarden waargenomen voor 20,0°C. Overigens is het groeimaximum en de gemiddelde groeiopbrengst bij 20,0°C gebaseerd op één van de twee duploflessen, aangezien de aantallen in de andere duplofles ook onder de detectiegrens lagen (zie ook paragraaf 3.1.3).



Figuur 3.9. Het groeimaximum (rode lijn; ▲) en de gemiddelde groeiopbrengst (blauwe lijn; ●) van *S. maltophilia* bij zeven verschillende incubatietemperaturen.

3.2.4 *Mycobacterium kansasii*

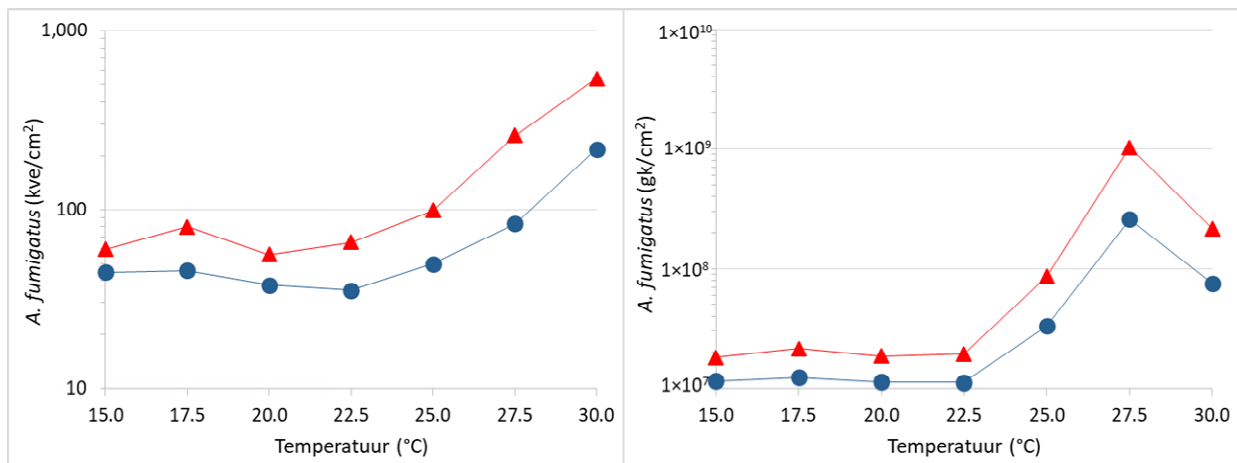
Het groeimaximum en de gemiddelde groeiopbrengst van *M. kansasii* bij iedere incubatietemperatuur is net als voor *S. maltophilia* alleen bepaald met het aantal genkopieën (Figuur 3.10). Evenals voor de andere geteste opportunistische ziekteverwekkers werd ook voor *M. kansasii* waargenomen dat het verloop van de grafieken met het groeimaximum en de gemiddelde groeiopbrengst vergelijkbaar waren. In het traject van 15,0 tot 20,0°C bleef het groeimaximum en de gemiddelde groeiopbrengst stabiel, terwijl beide parameters duidelijk toenamen in het traject van 20,0 tot 25,0°C. Tussen de incubatietemperatuur van 25,0 en 30,0 leek het groeimaximum en de gemiddelde groeiopbrengst weer meer te stabiliseren of licht toe te nemen. Het hoogste groeimaximum en de hoogste gemiddelde groeiopbrengst werd waargenomen bij de hoogste geteste incubatietemperatuur van 30,0°C.



Figuur 3.10. Het groeimaximum (rode lijn; ▲) en de gemiddelde groeiopbrengst (blauwe lijn; ●) van *M. kansasii* bij zeven verschillende incubatietemperaturen.

3.2.5 *Aspergillus fumigatus*

Voor *A. fumigatus* werd het groeimaximum en de gemiddelde groeiopbrengst bepaald met behulp van het aantal kolonievormende eenheden en met het aantal genkopieën (Figuur 3.11). In het temperatuurbereik van 15,0 t/m 22,5°C bleef het groeimaximum en de gemiddelde groeiopbrengst stabiel op basis van het aantal kolonies en genkopieën. Bij incubatietemperaturen boven de 22,5°C nam het groeimaximum en de gemiddelde groeiopbrengst op basis van het aantal kolonies toe met toenemende incubatietemperatuur en de hoogste waarden werden waargenomen bij 30°C. Op basis van het aantal genkopieën nam het groeimaximum en de gemiddelde groeiopbrengst ook toe bij incubatietemperaturen van 25,0 en 27,5°C, maar bij 30°C lagen deze waarden lager dan bij 27,5°C. De hoogste waarden voor het groeimaximum en de gemiddelde groeiopbrengst werden voor het aantal genkopieën van *A. fumigatus* dus waargenomen bij 27,5°C.



Figuur 3.11. Het groeimaximum (rode lijn; ▲) en de gemiddelde groeiopbrengst (blauwe lijn; ●) van *A. fumigatus*, weergegeven in kve cm⁻² (links) en gk cm⁻² (rechts), bij zeven verschillende incubatietemperaturen.

4 Discussie

Het doel van het onderzoek beschreven in deze rapportage was om (i) de invloed van hogere drinkwatertemperatuur te bepalen op groei van de opportunistische ziekteverwekkers die zich in drinkwater kunnen vermeerderen en (ii) het gevolg van een hogere drinkwatertemperatuurnorm voor het gezondheidsrisico ten aanzien van opportunistische ziekteverwekkers te beschrijven. Eerder BTO-onderzoek heeft laten zien dat de aanwezigheid van opportunistische ziekteverwekkers *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. kansasii* en *A. fumigatus* in drinkwater een mogelijk gezondheidsrisico vormen (Engel et al., 1980; Wullings, 2017; van der Wielen & Wullings, 2019). In het hier beschreven onderzoek werd daarom onderzocht wat de invloed van de drinkwatertemperatuur is op groei van *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. kansasii* en *A. fumigatus*. *L. pneumophila* is binnen de hier beschreven studie echter niet meegenomen, omdat de invloed van de drinkwatertemperatuur op *L. pneumophila* al in eerder onderzoek is achterhaald. In deze discussie worden de resultaten van de drinkwatertemperatuur op de totale biomassa in de biofilm, *L. pneumophila* en de vier opportunistische ziekteverwekkers (die in deze studie zijn onderzocht) bediscussieerd. Tot slot worden de resultaten bediscussieerd in relatie tot de drinkwatertemperatuurnorm van 25°C.

4.1 Totale biomassa

Uit de resultaten van het onderzoek volgt dat de actieve biomassa in de biofilm, bepaald door de concentratie ATP te meten, afnam bij toenemende drinkwatertemperatuur. Bij een drinkwatertemperatuur van 30°C was de maximale hoeveelheid actieve biomassa 2,7 keer lager dan bij 17,5°C en de gemiddelde hoeveelheid biomassa 1,9 keer lager dan bij 15°C. Een dergelijke inverse relatie tussen de temperatuur en yield van bacteriën werd al in 1941 door Monod gepubliceerd (Monod, 1942) en is daarna meerdere malen beschreven (Lipson, 2015 en referenties daarin). Die onderzoeken lieten overigens zien dat de groeisnelheid wel toenam bij toenemende temperatuur. Er zijn zowel thermodynamische als biochemische verklaringen beschreven voor de inverse wisselwerking tussen hogere groeisnelheid en lagere yield (Lipson, 2015 en referenties daarin). Bij drinkwateronderzoek in het verleden is de inverse relatie tussen temperatuur (10 – 30 °C) en de biomassaconcentratie van de biofilm ook vaker waargenomen (Farhat et al., 2016; van der Kooij et al., 2003). Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat bij toenemende drinkwatertemperatuur de biofilmconcentratie op de leidingwand en het sediment in het drinkwaterdistributiesysteem afneemt.

4.2 *Legionella pneumophila*

In een eerdere studie, dat KWR heeft uitgevoerd in opdracht van VROM-inspectie, werd het effect van de drinkwatertemperatuur op de concurrentie tussen *L. anisa* en *L. pneumophila* in een natuurlijke biofilm onder drinkwatercondities bepaald (van der Kooij et al., 2009b). In dat onderzoek werden biofilmmonitoren gevuld met PVC-P materiaalringen en doorstroomd met drinkwater, waarbij gedurende de looptijd van een experiment de temperatuur regelmatig werd verhoogd of verlaagd. Uit de resultaten van die studie bleek dat bij drinkwatertemperaturen tot en met 30°C *L. pneumophila* zich niet kon handhaven in de biofilm, terwijl *L. anisa* in relatief hoge aantallen (10^6 t/m 10^7 kve cm^{-2}) aanwezig was in de biofilm wanneer de temperatuur boven de 25°C uitkwam. Bij temperaturen die werden verhoogd tot 34°C t/m 38,5°C (hoogste temperatuur getest), werd *L. pneumophila* in relatief hoge aantallen (10^6 t/m 10^7 kve cm^{-2}) in de biofilm op het zacht PVC oppervlakte waargenomen. Tot 37°C werd naast *L. pneumophila* ook *L. anisa* in dezelfde aantallen in de biofilm waargenomen, bij 38,5°C werd *L. anisa* echter niet langer in de biofilm waargenomen. Uit deze resultaten werd geconcludeerd dat, met de onderzochte stammen van *L. pneumophila* en *L. anisa*, *L. pneumophila* zich pas in de biofilm weet te vermeerderen als de temperatuur wordt verhoogd tot boven de 30°C. Bij verlaging van de watertemperatuur van

boven de 30°C naar 27 of 25°C waren de resultaten ten aanzien van de *L. pneumophila* aantallen minder eenduidig. Tijdens een aantal experimenten werd *L. pneumophila* nog steeds waargenomen in de biofilm gedurende meer dan 50 dagen nadat de temperatuur was verlaagd van 30°C naar 27 of 25°C.

In een vervolproject werd vervolgens in biofilmmonitoren onderzocht wanneer *L. pneumophila* en *L. anisa* zich in de biofilm weten te vermeerderen wanneer de temperatuur voor lange periode (160 dagen) constant wordt gehouden op 25, 27, 30, 33 of 35°C (van der Kooij et al., 2010). De resultaten van die experimenten lieten zien dat bij 25 en 27°C de aantallen *L. pneumophila* relatief laag waren ($\sim 10^3$ kve cm⁻²), bij 30°C waren de *L. pneumophila* aantallen 10^4 kve cm⁻², bij 33°C 10^5 kve cm⁻² en bij 35°C 10^7 kve cm⁻². Deze aantallen werden meestal na 10 tot 20 dagen bereikt. De *L. anisa* aantallen in de biofilm waren voor alle temperaturen tussen de 10^6 en 10^7 kve cm⁻². Bij de drie hoogste temperaturen werden deze *L. anisa* aantallen bereikt tussen 10 en 20 dagen, terwijl bij de twee lagere temperaturen deze aantallen pas werden bereikt na ongeveer 50 dagen. De resultaten laten dus wederom zien dat bij temperaturen van 30°C de aantallen *L. pneumophila* toenamen in de biofilm, hoewel relatief lage aantallen van *L. pneumophila* in de biofilm ook werden waargenomen bij 25 en 27°C.

4.3 *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. kansasii* en *A. fumigatus*

4.3.1 Invloed van temperatuur

De invloed van temperatuur op de andere vier opportunistische ziekteverwekkers die voor het Nederlandse drinkwater van belang zijn is getracht in eerder onderzoek te bepalen onder dynamische condities in biofilmmonitoren (van der Wielen, 2014b). In tegenstelling tot *L. pneumophila* lukte het echter niet om een stabiele populatie van deze opportunistische ziekteverwekkers in de biofilm te krijgen, waardoor geen betrouwbare uitspraken over de invloed van de drinkwatertemperatuur op groei van deze opportunistische ziekteverwekkers kon worden gedaan. Doordat onvoldoende kennis aanwezig is over de ecologische condities waaronder deze opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwaterdistributiesysteem groeien, is het onduidelijk waarom deze opportunistische ziekteverwekkers de biofilm niet konden koloniseren onder dynamische condities in een biofilmmonitor. De verwachting is dat wanneer de microbiële ecologie van deze organismen in het drinkwaterdistributiesysteem is opgehelderd, het mogelijk moet zijn om deze organismen ook in biofilmmonitoren te laten groeien. Eerder onderzoek heeft namelijk wel laten zien dat *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. kansasii* en *A. fumigatus* onder de dynamische condities in Nederlandse drinkwaterdistributiesystemen aanwezig kunnen zijn (Engel et al., 1980; van der Wielen & van der Kooij, 2011; 2013; van der Wielen, 2014) en dat het genotype of faagtype van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *M. kansasii* stammen geïsoleerd uit Nederlandse drinkwaterdistributiesystemen hetzelfde zijn als genotype van in Nederland geïsoleerde patiëntstammen (Engel et al., 1980; Wullings, 2017; van der Wielen & Wullings, 2019). Die onderzoeksresultaten laten zien dat de aanwezigheid van ziekteverwekkers in drinkwater zeer waarschijnlijk een gezondheidskundig risico vormen. Het is daarom belangrijk om de invloed van de drinkwatertemperatuur op de groei van deze vier opportunistische ziekteverwekkers te achterhalen, omdat door klimaatverandering de drinkwatertemperatuur in het distributiesysteem in de toekomst zal toenemen (Agudelo-Vera et al., 2020) en om te achterhalen of de drinkwaternorm van 25°C nodig blijft om gezondheidsrisico's voor de consument te beperken.

Doordat in eerder onderzoek het niet lukte om stabiele populaties van deze opportunistische ziekteverwekkers in een biofilm te krijgen die continu werd doorstroomd met drinkwater, is in de hier beschreven studie gekozen om de experimenten uit te voeren onder de condities die worden gebruikt om de groeibevorderende eigenschappen van materialen in contact met drinkwater te bepalen. Er werd daarbij gebruik gemaakt van PVC-P materiaalstukken in monsterflessen met drinkwater die onder stagnante condities werden geïncubeerd bij verschillende temperaturen, waarbij wekelijks het drinkwater werd verversd. Deze condities bootsen een worstcasesituatie na in een drinkwatersysteem, doordat materiaal werd gebruikt met een zeer hoge groeipotentie voor micro-organismen en drinkwaterstagnatie van een week, met de hypothese dat onder deze condities de toegevoegde opportunistische ziekteverwekkers wel in staat waren om de biofilm te koloniseren.

Het is opvallend dat de aantallen *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. kansasii* en *A. fumigatus*, in tegenstelling tot *L. pneumophila*, toenemen bij de laagst geteste incubatietemperatuur van 15°C. Na zeven dagen waren de aantallen *P. aeruginosa* die aanwezig waren op het totale oppervlakte van de materiaalstukjes (500 cm² bij start) in een monsterfles hoger dan de aantallen die in totaal aan de monsterfles waren toegevoegd (2,6×10⁵ kve versus 1,0×10⁴ kve toegevoegd). Dit laat zien dat vermeerdering van *P. aeruginosa* in de monsterflessen al optrad bij een incubatietemperatuur van 15°C.

De aantallen van *A. fumigatus* in de biofilm op het totale oppervlakte van de materiaalstukjes waren na zeven dagen incubatie bij 15°C lager dan de aantallen die aan de fles waren toegevoegd (6,0×10³ kve versus 1,0×10⁴ kve toegevoegd). Gedurende de incubatietijd namen bij de lagere temperaturen (≤ 25°C) de aantallen *A. fumigatus* ook maar weinig toe, waardoor bij deze temperaturen onduidelijk blijft of de toegevoegde *A. fumigatus* cellen zich aan de biofilm hechtte en overleefde of dat daadwerkelijk groei optrad. In eerder BTO-onderzoek is de invloed van leidingmaterialen op groei van *A. fumigatus* onderzocht, waarbij *A. fumigatus* werd toegevoegd aan verschillende materialen bij 25°C onder dezelfde testcondities als de testcondities beschreven in deze rapportage (van der Wielen & Bereschenko, 2016). Het aantal genkopieën van *A. fumigatus* bij de materialen koper, PVC-C en PE namen daarbij af van ~ 1×10⁴ gk/cm² tot 1×10² tot 1×10³ gk/cm² na 112 dagen incubatie, terwijl in de hier beschreven studie het aantal genkopieën constant bleef rond de 1×10⁷ gk/cm². De resultaten van van der Wielen & Bereschenko (2016) suggereren dat *A. fumigatus* niet in staat is langdurig te overleven in een biofilm op materiaalstukjes in contact met drinkwater. Het is daarom aannemelijk dat de stabiele (relatief hoge) aantallen *A. fumigatus* die gedurende de volledige incubatieperiode op PVC-P bij 15 t/m 25°C werden waargenomen, veroorzaakt worden doordat afsterving en vermeerdering van *A. fumigatus* in evenwicht zijn. Bij de twee hoogste temperaturen (27,5 en 30,0°C) waren de aantallen aan het einde van de incubatieperiode echter wel duidelijk hoger dan bij de andere temperaturen, wat alleen verklaard kan worden door vermeerdering van *A. fumigatus* bij deze twee incubatietemperaturen.

Voor *S. maltophilia* en *M. kansasii* kan niet worden bepaald of de aantallen die teruggevonden werden na zeven dagen incubatie hoger waren dan de aantallen die op dag 0 en 7 werden toegevoegd, omdat het aantal kve werd bepaald van de inoculatie maar het aantal genkopieën van de biofilm op de materiaalstukjes. Doordat het aantal genkopieën beduidend hoger was dan het aantal kve (zie bijvoorbeeld het verschil in aantal tussen kve en genkopieën bij *P. aeruginosa* (aantal gk gemiddeld 40.000 keer hoger dan aantal kve) en *A. fumigatus* (aantal gk gemiddeld 350.000 keer hoger dan aantal kve) bepaald in deze studie, Figuur 3.2 en Figuur 3.6), kunnen deze aantallen niet met elkaar worden vergeleken. Het is echter wel waargenomen dat het aantal genkopieën van *S. maltophilia* bij 17,5°C hoger waren dan bij 15,0°C, waardoor het in ieder geval zeker is dat bij 17,5°C al vermeerdering van *S. maltophilia* optrad. Voor *M. kansasii* waren de genkopieaantallen aan het einde van de incubatieperiode vergelijkbaar voor de flessen geïncubeerd bij 15,0 en 17,5°C, maar bij 20°C en hoger waren de aantallen hoger. Hierdoor kan worden geconcludeerd dat bij 20,0°C in ieder geval dus al vermeerdering van *M. kansasii* optrad.

Op basis van deze resultaten kan worden geconcludeerd dat *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* en *M. kansasii* zich in drinkwater kunnen vermeerderen wanneer de drinkwatertemperatuur lager is dan de drinkwaternorm van 25°C. Dat verklaart ook waarom deze bacteriën in eerdere studies zijn waargenomen in het distributiesysteem van verschillende Nederlandse productielocaties, waar de temperatuur meestal lager is dan 25°C (Engel et al., 1980; van der Wielen & van der Kooij, 2013; Wullings, 2017). *A. fumigatus* kan zich in ieder geval vermeerderen bij drinkwatertemperaturen boven de 25°C, terwijl bij 25°C of lagere temperaturen het aannemelijk is dat het organisme zich ook kan vermeerderen, maar dat afsterving en groei bij die temperaturen in evenwicht zijn. Dat verklaart ook waarom ook *A. fumigatus* is waargenomen in het distributiesysteem van verschillende Nederlandse drinkwaterproductielocaties (van der Wielen & van der Kooij, 2013; Wullings, 2017).

Hoewel de vier geteste opportunistische ziekteverwekkers zich dus kunnen vermeerderen bij drinkwatertemperaturen van 15,0 tot 20,0°C, laten de resultaten ook zien dat bij toenemende

drinkwatertemperaturen de aantallen hoger werden. Zo namen zowel het maximum als de gemiddelde logaantallen van *P. aeruginosa* rechtlijnig toe van 15,0 tot 30,0°C, waarbij de maximaantallen 3,4 (kve) tot 3,5 (gk) logeenheden hoger waren bij 30,0°C dan 15,0°C. De maximaantallen namen ook toe bij toenemende temperatuur in een deel van de onderzochte temperatuurrange voor de andere drie onderzochte opportunistische ziekteverwekkers: voor *S. maltophilia* 1,0 logeenheid in traject van 15,0 tot 20,0°C, voor *M. kansasii* 1,1 logeenheid in traject van 17,5 tot 30,0°C en voor *A. fumigatus* 1,0 logeenheid in traject van 22,5 tot 30,0°C. Uit deze resultaten wordt daarom geconcludeerd dat wanneer de drinkwatertemperatuur stijgt de kans op hogere aantallen van deze opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwaterdistributiesysteem ook toeneemt. Hogere aantallen van deze opportunistische ziekteverwekkers in het distributiesysteem vormen een hoger risico voor de volksgezondheid. Het is aannemelijk dat de kans op kolonisatie van de drinkwaterinstallatie binnen gebouw toeneemt, wanneer de aantallen van deze micro-organismen in het inkomende drinkwater van een gebouw hoger zijn. Daarnaast wordt het risico op infectie met deze opportunistische ziekteverwekkers bepaald door de dosis-responsrelatie, waarbij een hogere dosis (hogere aantallen in drinkwater) leidt tot een hogere kans op een respons (infectie) (Rasheduzzaman et al., 2019; Rusin et al., 1997).

De resultaten laten zien dat de groeicurves die werden waargenomen voor *M. kansasii* en *A. fumigatus* vergelijkbaar waren tussen 15,0 en 17,5°C (*M. kansasii*) en 15,0 en 25,0°C (*A. fumigatus*). Dit duidt erop dat de minimumtemperatuur waarbij deze micro-organismen zich tot hogere aantallen weten te vermeerderen in een natuurlijk ontwikkelde biofilm op PVC-P in contact met drinkwater rond de 17,5°C of 25,0°C is. Zoals eerder uitgelegd voor *A. fumigatus*, lijkt het ook voor *M. kansasii* dat dit micro-organismen bij 15,0 en 17,5°C zich wel weet te vermeerderen, maar dat afsterving en groei in balans is. Voor *P. aeruginosa* werd waargenomen dat bij 17,5°C een hogere groeicurve werd waargenomen dan bij 15,0°C, waardoor de minimumtemperatuur waarbij *P. aeruginosa* zich kan vermeerderen 15,0°C of lager is. Om de minimumtemperatuur voor groei van *P. aeruginosa* definitief te bepalen, zijn aanvullende experimenten nodig, waarbij onder dezelfde condities als gebruikt in de hier beschreven studie de vermeerdering van *P. aeruginosa* wordt bepaald in het traject van 5,0 tot 15,0°C. Het is raadzaam om bij een dergelijk experiment ook de andere drie opportunistische ziekteverwekkers te onderzoeken. Daarmee wordt duidelijkheid gekregen bij welke temperatuur deze organismen afnemen. Informatie over de minimumtemperatuur van vermeerdering in het drinkwaterdistributiesysteem is van belang om te achterhalen wanneer in een jaar het risico op vermeerdering van deze opportunistische ziekteverwekkers optreedt.

Voor *P. aeruginosa* en *M. kansasii* werd waargenomen dat de groeicurven, maximaantallen en gemiddelde aantallen bij 30°C hoger waren dan bij 25°C. Dezelfde waarneming werd gedaan voor de kve-aantallen van *A. fumigatus*. Dit betekent dat de optimum- en maximumtemperatuur voor groei van deze drie opportunistische ziekteverwekkers niet werden bereikt met deze experimenten en daarmee dus 30°C of hoger zijn. In het drinkwaterdistributiesysteem zullen de drinkwatertemperaturen in Nederland niet tot boven de 30°C toenemen, maar in drinkwaterinstallaties in gebouwen kan dit wel gebeuren door opwarming in het gebouw of door het mengen van koud en warm tapwater, bijvoorbeeld tijdens het douchen. Het is daarom aan te bevelen om ook te achterhalen wat de optimum- en maximumtemperatuur voor groei van de vier in het hier beschreven onderzoek geteste opportunistische ziekteverwekkers zijn. Met die gegevens kan worden vastgesteld bij welke temperaturen in de drinkwaterinstallatie van gebouwen de hoogste aantallen in de biofilm kunnen voorkomen en of bepaalde activiteiten (bijvoorbeeld douchen) leiden tot blootstelling aan hogere aantallen opportunistische ziekteverwekkers. Met die informatie wordt tevens meer duidelijkheid gekregen over het risico van het leveren van drinkwater waar *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. kansasii* en *A. fumigatus* in aanwezig zijn.

Momenteel worden in Nederland geen aparte beheersmaatregelen genomen in drinkwaterinstallaties om blootstelling aan de in deze studie geteste opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater te voorkómen. Er worden wel beheersmaatregelen in Nederland genomen om blootstelling aan *L. pneumophila* te voorkómen. De kern van de beheersmaatregelen tegen *L. pneumophila* is dat de koudwatertemperatuur lager moet zijn dan 25°C en de warmwatertemperatuur hoger dan 60°C. Een drinkwatertemperatuur beneden de 25°C zal voorkómen dat *L.*

pneumophila zich in het drinkwatersysteem vermeerderd, maar de resultaten uit deze rapportage laten zien dat een koudwatertemperatuur van lager dan 25°C niet volstaat voor sommige andere opportunistische ziekteverwekkers die zich in drinkwater kunnen vermeerderen. Bedard et al. (2016) concludeerde op basis van een literatuurreview over groei van *P. aeruginosa* in drinkwaterinstallaties van gebouwen dat de afsterving van *P. aeruginosa* bij een warmwatertemperatuur van 60°C tot dusverre niet of nauwelijks onderzocht. Voor *S. maltophilia*, *M. kansasii* en *A. fumigatus* lijkt dergelijke informatie ook te ontbreken. Het is daarom raadzaam om onderzoek uit te voeren naar de mate van afsterving van deze opportunistische ziekteverwekkers in drinkwaterbiofilms bij drinkwatertemperaturen van 40 tot 80°C. Met de resultaten van een dergelijk onderzoek kan worden achterhaald in hoeverre de meest toegepaste beheersmaatregel voor *L. pneumophila* (thermische desinfectie bij 60°C) ook effectief is voor beheersing van deze andere opportunistische ziekteverwekkers in drinkwaterinstallaties van gebouwen.

4.3.2 Invloed van andere factoren

Uit de groeicurven van de vier onderzochte opportunistische ziekteverwekkers bij verschillende temperaturen kan, naast de invloed van temperatuur op groei van deze micro-organismen, ook andere informatie worden gehaald. Zo valt op dat *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* binnen zeven dagen na inoculatie hun hoogste aantallen bereikten in de natuurlijke biofilm die op PVC-P was gevormd bij verschillende temperaturen en dat na 7 tot 14 dagen deze aantallen over het algemeen weer afnamen. Daarentegen namen de aantallen van *M. kansasii* en *A. fumigatus* toe tot aan het einde van de incubatieperiode bij de incubatietemperaturen waar verhoogde groei werd waargenomen (*M. kansasii*: $\geq 20,0^\circ\text{C}$; *A. fumigatus*: $\geq 25,0^\circ\text{C}$). Deze toename in aantallen vond voor *M. kansasii* zelfs pas plaats in de biofilm na 28 (25,0 en 30,0°C) of 56 (20,0; 22,5 en 27,5°C) dagen incubatie. Onderzoek door anderen heeft al eerder laten zien dat *P. aeruginosa* een initiële kolonisator is in biofilms die in contact staan met water, maar dat hun aantallen afnemen bij toenemende incubatie (Bressler et al., 2009; Dođruöz et al., 2019). Informatie over snelheid van kolonisatie van (drink)watergerelateerde biofilms door de andere drie opportunistische ziekteverwekkers is niet in de wetenschappelijke literatuur gevonden.

Uit de resultaten volgt dus dat opportunistisch groeiende bacteriën zoals *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* in staat zijn om een biofilm snel te koloniseren. Een kenmerk van dergelijke micro-organismen is dat ze, bij beschikbaarheid van voldoende substraat, een hogere groeisnelheid hebben dan andere micro-organismen, waardoor ze de competitie met andere micro-organismen winnen. Deze hoge groeisnelheid gaat echter ten koste van de affiniteit voor het substraat. Het gevolg van een lage substraataffiniteit is dat bij lage substraatconcentraties de groeisnelheid van deze opportunistisch groeiende micro-organismen dusdanig laag wordt dat ze de competitie verliezen van micro-organismen die een hogere affiniteit voor het substraat hebben. Met deze gegevens kan een hypothese worden opgesteld waarom *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* in de uitgevoerde experimenten in korte tijd tot hoge aantallen piekten, terwijl in de loop van de incubatietijd deze aantallen afnamen, terwijl de aantallen van *M. kansasii* en *A. fumigatus* juist toenamen. Deze hypothese gaat er vanuit dat relatief hoge substraatconcentraties beschikbaar zijn na start van de experimenten, waardoor organismen met een relatief hoge maximale groeisnelheid (zoals *P. aeruginosa* en *S. maltophilia*) de competitie winnen van andere micro-organismen en dus in korte tijd tot relatief hoge aantallen in de biofilm kunnen voorkomen. In deze periode wordt een groot deel van het substraat omgezet, waardoor de substraatconcentratie daalt en micro-organismen met een hoge affiniteit voor het substraat (zoals *M. kansasii* en *A. fumigatus*) in staat zijn om de competitie te winnen van micro-organismen met een lage affiniteit voor het substraat (zoals *P. aeruginosa* en *S. maltophilia*). Het gevolg hiervan is dat de aantallen *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* in de tijd zullen afnemen, terwijl de aantallen *M. kansasii* en *A. fumigatus* juist zullen toenemen, zoals ook is waargenomen in de uitgevoerde studie. De maximale groeisnelheid en substraataffiniteit voor micro-organismen zijn te bepalen door het uitvoeren van gecontroleerde groei-experimenten op bekende substraatconcentraties. Voor *P. aeruginosa* zijn dergelijke groei-experimenten in het verleden voor drinkwater uitgevoerd (van der Kooij et al., 1982). De resultaten lieten zien dat de substraataffiniteit van *P. aeruginosa* voor acetaat en aspartaat beduidend lager was dan van andere bacteriën die in drinkwater voorkomen en dat ondersteunt dus de hierboven gestelde hypothese. Van de andere drie micro-organismen zijn dergelijke gegevens niet bepaald met behulp van groei-experimenten in drinkwater. Indien groei van *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* in

het drinkwaterdistributiesysteem voornamelijk wordt veroorzaakt door verhoogde substraatconcentraties dan speelt naast de temperatuur ook de concentratie biodegradeerbaar organisch koolstof (BDOC) een belangrijke rol bij vermeerdering van deze twee bacteriesoorten in drinkwatersystemen. Het is niet ondenkbaar dat de BDOC concentratie in drinkwaterdistributiesystemen tijdelijk verhoogd kunnen zijn wanneer er bepaalde verstoringen optreden, waardoor lokaal bijvoorbeeld biofilm en sediment ophopen. Aanvullende experimenten zijn echter nodig om deze hypothesen te bevestigen en een beter begrip te krijgen van de ecologie en het gedrag van deze opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwaterecosysteem. Dergelijke informatie is nodig om efficiënte beheersmaatregelen voor deze opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater te definiëren.

Een andere opvallende observatie is dat vermeerdering van *S. maltophilia* in de biofilm op PVC-P inconsistent lijkt te zijn. Bij incubatietemperaturen van 15,0 t/m 20,0°C werd vermeerdering van *S. maltophilia* in de biofilm waargenomen en lagen de aantallen gedurende 56 dagen incubatie boven de detectiegrens, terwijl bij incubatietemperaturen van 22,5 t/m 27,5°C geen vermeerdering van *S. maltophilia* werd waargenomen en de aantallen tijdens alle meetmomenten onder de detectiegrens waren. Bij de incubatietemperatuur van 30,0°C, tot slot, werd weer een vermeerdering van *S. maltophilia* in de biofilm waargenomen, maar waren de aantallen alleen de eerste 14 dagen boven de detectiegrens. Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat *S. maltophilia* niet in staat was om bij alle incubatietemperaturen de biofilm te koloniseren. Doordat bij temperaturen van 15,0 t/m 20,0 en 30,0°C het organisme in staat was om wel de biofilm te koloniseren, is het niet aannemelijk dat de incubatietemperatuur verantwoordelijk was dat *S. maltophilia* niet in staat was om de biofilm te koloniseren bij 22,5 t/m 27,5°C. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat bepaalde micro-organismen in de biofilm antagonistisch zijn tegen *S. maltophilia*. Dit zouden micro-organismen kunnen zijn die van nature voorkomen in de biofilm, maar ook één van de andere opportunistische ziekteverwekkers die gezamenlijk met *S. maltophilia* werden toegevoegd aan de flessen met materiaalstukjes. Doordat *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* soms gezamenlijk worden aangetroffen in sputum van patiënten met taaislijmziekte, zijn onderzoeken naar de interactie tussen beide micro-organismen in biofilms gedaan. De resultaten van die studies zijn echter niet eenduidig, doordat is gevonden dat *P. aeruginosa* de groei en aantallen *S. maltophilia* in de biofilm verlaagt (Pompilio et al., 2015) alsook dat *P. aeruginosa* de groei van *S. maltophilia* stimuleert (McDaniels et al., 2020). Deze resultaten laten in ieder geval zien dat het mogelijk is dat bepaalde bacteriën in de biofilm de groei van andere bacteriën kunnen onderdrukken of stimuleren, wat een oorzaak zou kunnen zijn voor de inconsistente resultaten die voor *S. maltophilia* werden gevonden. Aanvullend onderzoek is echter nodig om te achterhalen of overeenkomstige fenomenen ook in natuurlijke drinkwaterbiofilms optreden. Dergelijke informatie is ook van belang voor de drinkwatersector, omdat de resultaten van zo'n onderzoek laten zien of beheersing van opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwaterecosysteem kan plaatsvinden door de vorming van een natuurlijke protectieve microflora in de biofilm op de leidingwand en sediment.

4.4 Betekenis voor de drinkwaternorm van 25°C

In het Drinkwaterbesluit in Nederland is opgenomen dat het drinkwater bij levering aan de consument niet hoger mag zijn dan 25°C, overeenkomstig de aanbeveling van de WHO (2004). De WHO stelt daarbij dat hogere drinkwatertemperaturen kunnen resulteren in verhoogde groei van micro-organismen en een toename van smaak-, geur-, kleur- en corrosieproblemen. Een wetenschappelijke onderbouwing dat dergelijke problemen beheersbaar blijven bij een temperatuur onder de 25°C ontbreekt echter.

In Nederland is het aantal smaak-, geur-, kleur- en corrosieproblemen relatief laag, waardoor verwacht wordt dat bij toenemende drinkwatertemperatuur het aantal smaak-, geur-, kleur- en corrosieklachten beheersbaar blijft. Het is echter onduidelijk in hoeverre een hogere drinkwatertemperatuur kan leiden tot meer nagroei van ongewenste micro-organismen. Een hogere temperatuur kan daarbij van invloed zijn op enkele wettelijke microbiologische parameters (KG22, *Aeromonas*, bacteriën van de coligroep en *Legionella*) en op opportunistische ziekteverwekkers die zich in drinkwater kunnen vermeerderen en die in het verleden in het Nederlandse drinkwater zijn aangetroffen

(*L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. kansasii* en *A. fumigatus*). In een eerdere rapportage is op basis van wetenschappelijke literatuur en waarnemingen in het Nederlandse drinkwater de verwachte invloed van drinkwatertemperaturen boven de 25°C op de wettelijke microbiologische parameters aangegeven (van der Kooij et al., 2009) en deze effecten zijn samengevat in Tabel 4.1. Uit die studie volgt dat een drinkwatertemperatuur boven de 25°C zal leiden tot hogere aantallen KG22, *Aeromonas* en *Legionella* in het gedistribueerde drinkwater. De verwachting is echter dat de hogere KG22-aantallen niet zullen leiden tot een toename van wettelijke overschrijdingen voor KG22, doordat het geometrisch gemiddelde voor KG22 momenteel ver beneden de wettelijke norm ligt. Een toename in KG22 aantallen in de zomerperiode zal daardoor niet leiden tot een dusdanige toename van het geometrisch gemiddelde van KG22 dat de wettelijke norm zal worden overschreden. Door de toename in aantallen *Aeromonas* en *Legionella* wanneer de drinkwatertemperatuur boven de 25°C komt, is het waarschijnlijk dat het aantal overschrijdingen van de wettelijke norm van *Aeromonas* en *Legionella* zal toenemen. De studie van van der Kooij et al. (2009) geeft aan dat niet te verwachten valt dat het aantal bacteriën van de coligroep zal toenemen wanneer de drinkwatertemperatuur boven de 25°C uitkomt, omdat groei van deze bacteriën wordt voorkómen door de lage AOC-concentraties in het Nederlandse drinkwater en niet door de drinkwatertemperatuur.

Tabel 4.1. De verwachte invloed van een drinkwatertemperatuur boven de 25°C op wettelijke microbiologische parameters voor micro-organismen die zich in het drinkwater kunnen vermeerderen (van der Kooij et al., 2009).

Wettelijke parameter	Aantallen kve/volume	Aantallen overschrijdingen norm
KG22	Toename	Geen toename
<i>Aeromonas</i>	Toename	Toename
<i>Legionella</i>	Toename ¹	Toename ¹
Bacteriën van de coligroep	Geen toename	Geen toename

¹ Toename van *Legionella*-aantallen en *Legionella*-overschrijdingen wordt veroorzaakt door *L. anisa*

De wettelijke parameters KG22 en *Aeromonas* zijn als bedrijfstechnische parameters in het Drinkwaterbesluit opgenomen en dienen als indicatie voor nagroeiproblemen. Het is echter onduidelijk dat als deze parameters toenemen wanneer de drinkwatertemperatuur vaker boven de 25°C uitkomt, de nagroeiproblemen ook toenemen. Uit de resultaten van de in deze rapportage beschreven studie blijkt bijvoorbeeld dat de hoeveelheid actieve biofilmbiomassa afneemt bij toenemende drinkwatertemperaturen onder semi-stagnante condities. Een afnemende biomassa van de biofilm heeft waarschijnlijk positieve effecten, omdat het voedselweb van bacteriën tot ongewervelde dieren wordt gevoed door de biofilmbiomassa in het drinkwaterdistributiesysteem. Een afname van de biofilmbiomassa zal daarom leiden tot lagere aantallen ongewervelde dieren in het drinkwaterdistributiesysteem, waardoor klachten veroorzaakt door ongewervelde dieren waarschijnlijk ook zullen afnemen bij hogere drinkwatertemperaturen. Onduidelijk is of een lagere biofilmbiomassa ook leidt tot verlaging van smaak-, geur- en corrosieproblemen. Enerzijds lijkt het aannemelijk dat dit optreedt, doordat biofilmconcentratie een rol zou kunnen spelen bij deze problemen. Anderzijds leidt een hogere temperatuur waarschijnlijk tot een andere samenstelling van de microbiële gemeenschap (van der Kooij et al., 2009). Wanneer de gemeenschap onder invloed van een hogere temperatuur verschuift naar een gemeenschap met hogere aantallen micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor geur-, smaak en corrosieklachten, dan leidt een hogere temperatuur tot een toename van deze klachten. De verwachting is echter dat, doordat dergelijke klachten momenteel laag zijn, deze klachten beheersbaar blijven. Aanvullend onderzoek is echter nodig om hier wetenschappelijk onderbouwde uitspraken over te kunnen doen.

De wettelijke parameter *Legionella* is opgenomen als gezondheidkundige parameter in het Drinkwaterbesluit, maar een toename van de *Legionella*-aantallen wanneer de drinkwatertemperatuur boven de 25°C uitkomt, heeft niet direct een gezondheidkundige betekenis. Bij temperaturen tussen 25 en 28°C zal namelijk *L. anisa* in aantallen toenemen (van der Kooij et al., 2009b), wat ook kan resulteren in een toename van het aantal wettelijke overschrijdingen van *Legionella*. *L. anisa* is echter een *Legionella*soort die vrijwel ongevaarlijk is voor de volksgezondheid (van der Kooij et al., 2009). Zoals beschreven in paragraaf 4.2 is in eerder onderzoek bepaald wat de invloed van de drinkwatertemperatuur is op de voor mensen ziekteverwekkende soort *L. pneumophila*. Samenvattend kan worden gesteld dat uit deze onderzoeken is gebleken dat de watertemperatuur een belangrijke factor is bij de vermeerdering van *L. pneumophila* in het drinkwatersysteem. Bij drinkwatertemperaturen onder de 30°C wordt verwacht dat vermeerdering van *L. pneumophila* niet of in mindere mate optreedt, terwijl bij temperaturen boven de 30°C het aannemelijk is dat vermeerdering van *L. pneumophila* optreedt, wanneer ook voldoende biofilm aanwezig is. Hierbij dient echter te worden opgemerkt dat de temperatuur wel voor meerdere dagen boven de 30°C moet zijn, aangezien resultaten van deze experimenten hebben laten zien dat wanneer de drinkwatertemperatuur wordt verhoogd tot boven de 30°C het ongeveer 7 tot 10 dagen duurt voordat vermeerdering van *L. pneumophila* optreedt. Op basis van deze resultaten zou geconcludeerd kunnen worden dat een verhoging van de drinkwatertemperatuurnorm naar 30°C niet zal leiden tot een verhoogd gezondheidsrisico ten aanzien van *L. pneumophila*. Het is echter verstandig om op basis van de resultaten van de hierboven beschreven studies een extra veiligheidsmarge van 2°C mee te nemen, zodat een verhoging van de drinkwaternorm van 25°C naar 28°C niet zal leiden tot een verhoogd gezondheidsrisico voor *L. pneumophila*. Zoals eerder gesteld zal het verhogen van de drinkwaternorm naar 28°C echter wel leiden tot een toename van het aantal wettelijke overschrijdingen van *Legionella* door een toename in groei van *L. anisa* in het distributiesysteem wanneer de temperatuur langere tijd boven de 25°C uitkomt (van der Kooij et al., 2009b). Op basis van het gezondheidsrisico voor *L. pneumophila* is in het verleden voorgesteld dat de norm voor de watertemperatuur in een niet-drinkwatergerelateerde systeem hoger zou mogen zijn (28°C) dan de nu in het Drinkwaterbesluit opgenomen 25°C (van der Wielen & Medema, 2014).

In hoeverre het risico op groei van andere opportunistische ziekteverwekkers, die in het Nederlandse drinkwater kunnen voorkomen, toeneemt bij temperaturen boven de 25°C was echter nog niet uitgezocht en vormt daarom de basis van het in dit rapport beschreven onderzoek. Uit de resultaten blijkt dat indien de condities gunstig zijn voor vermeerdering van de onderzochte opportunistische pathogenen, *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* zich weten te vermeerderen tot relatief hoge aantallen wanneer de drinkwatertemperatuur tussen de 15 en 25°C is, terwijl *M. kansasii* in staat is zich te vermeerderen tot relatief hoge aantallen bij temperaturen tussen 20 en 25°C, wat dus betekent dat risico op groei van deze bacteriën al aanwezig is bij de huidige drinkwaternorm van 25°C. Voor *P. aeruginosa* werd tevens waargenomen dat de toename in aantallen loglineair is tussen 15 en 30°C, waaruit blijkt dat de aantallen van *P. aeruginosa* onder geschikte groeicondities in het drinkwatersysteem nog verder toenemen als de drinkwaternorm van 25°C zou worden verhoogd. Elke °C verhoging leidt daarbij tot een verhoging van 0,22 logeenheden van *P. aeruginosa* in de biofilm. Voor *M. kansasii* was het loglineair verband tussen gemiddelde groeiopbrengst en temperatuur minder sterk ($R^2=0,81$) dan voor *P. aeruginosa*, maar nemen de aantallen verder toe met ongeveer 0,052 logeenheden toe per °C verhoging wanneer de temperatuur boven de 25°C komt. Het verband tussen toenemende temperatuur en aantallen *S. maltophilia* kon niet worden vastgesteld, doordat *S. maltophilia* niet bij alle incubatietemperaturen de biofilm wist te koloniseren. In tegenstelling tot *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* en *M. kansasii* werd verhoogde groei van *A. fumigatus* pas waargenomen rond een drinkwatertemperatuur van 25°C. Daarbij werd over het algemeen waargenomen dat wanneer de incubatietemperatuur verder toeneemt boven de 25°C de aantallen *A. fumigatus* ook verder toenemen. Het risico op groei van *A. fumigatus* in het drinkwaterdistributiesysteem lijkt dus beheersbaar wanneer de drinkwaternorm van 25°C wordt gehandhaafd.

Op basis van de hierboven beschreven discussie is het advies om de huidige drinkwaternorm van 25°C in het drinkwaterdistributiesysteem te handhaven. De belangrijkste reden daarvoor is dat met een drinkwaternorm van 25°C verhoogde groei van *A. fumigatus* wordt voorkómen en dat, wanneer de overige condities in het distributiesysteem toereikend zijn voor vermeerdering van *P. aeruginosa* en *M. kansasii*, de aantallen van *P. aeruginosa* en *M. kansasii* in het drinkwaterdistributiesysteem bij de norm van 25°C niet verder toenemen. Daardoor zal met de drinkwaternorm van 25°C het risico op infectie met deze vier opportunistische ziekteverwekkers via drinkwater niet verder toenemen, terwijl bij gebruik van een hogere drinkwaternorm dit risico wel kan toenemen. Met het handhaven van de drinkwaternorm op 25°C wordt tevens voorkómen dat het aantal overschrijdingen van de wettelijke parameters *Aeromonas* en *Legionella* zal toenemen.

De norm voor temperatuur in het Drinkwaterbesluit is een maximum watertemperatuur van 25°C. Deze norm wordt al overschreden op sommige locaties in het distributiesysteem (ILT, 2018). Onduidelijk is hoe vaak de norm wordt overschreden omdat incidenteel de drinkwatertemperatuur in het distributiesysteem wordt bepaald. Een betrouwbare handhaving van een maximum watertemperatuur van 25°C vergt eigenlijk continue meting van de watertemperatuur, wat veel kosten met zich meeneemt wanneer dit op alle leverpunten wordt bepaald. Voor microbiologische processen, zoals groei van opportunistische ziekteverwekkers, is een maximum drinkwatertemperatuur ook minder relevant, omdat deze processen tijd vergen. Zo werd voor *L. pneumophila* waargenomen dat wanneer de temperatuur van 25 naar 30°C werd verhoogd, het zeven tot tien dagen duurde voordat vermeerdering van *L. pneumophila* optrad (van der Kooij et al., 2009b). De resultaten van de studie beschreven in dit rapport laten zien dat groei van *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* relatief snel kan optreden (binnen zeven tot 14 dagen) bij drinkwatertemperaturen van 25°C en hoger, maar dat groei van *M. kansasii* en *A. fumigatus* soms pas optreedt na incubatie van 28 dagen of langer. Het is daarom raadzamer om een percentielwaarde van 25°C als norm op te nemen voor de watertemperatuur in het Drinkwaterbesluit in plaats van de huidige maximum waarde van 25°C. Op basis van de waargenomen incubatietijd voor groei van opportunistische ziekteverwekkers in drinkwatergerelateerde biofilms zou de watertemperatuur gedurende zeven dagen boven de 25°C kunnen zijn, zonder dat dit tot problematische groei van deze opportunistische ziekteverwekkers leidt. Een dergelijke periode komt overeen met 98-percentielwaarde (P98-waarde) van 25°C. Daarbij dienen wel een kanttekening te worden geplaatst. Deze percentielwaarde geldt wanneer de temperatuur op één locatie in het distributiesysteem wordt bepaald, terwijl in het reguliere monitoringsprogramma van de drinkwaterbedrijven monsters op verschillende locaties en op verschillende momenten in het distributiesysteem worden genomen. De 98-percentielwaarde van de gemonitorde drinkwatertemperaturen is daardoor niet alleen gebaseerd op de periode dat de temperatuur boven de 25°C is, maar ook op het aantal locaties dat deze overschijding laat zien. Indien overwogen wordt om het Drinkwaterbesluit op basis van deze aanbeveling aan te passen, zal (statistisch) moeten worden onderbouwd hoe vaak de drinkwatertemperatuur op bepaalde locaties in een distributiesysteem bepaald zou moeten worden om een P98-waarde van de temperatuur te verkrijgen die voorspellend is voor het overschrijden van de 25°C norm voor meer dan zeven dagen op een locatie in het distributiesysteem.

In de studie beschreven in deze rapportage is de invloed van de temperatuur op groei van de opportunistische ziekteverwekkers in de biofilm onderzocht. Daarvoor werden monsterflessen met materiaalstukjes en drinkwater geïncubeerd bij een aantal specifieke temperaturen. Door deze opzet te kiezen was de temperatuur van de materiaalstukjes, biofilm en drinkwater gelijk. In het drinkwaterdistributiesysteem is echter de verwachting dat de temperatuur van het drinkwater en van het leidingmateriaal niet hetzelfde zijn. Het is namelijk aannemelijk dat de temperatuur van de leidingwand voornamelijk wordt bepaald door de omgevingstemperatuur van de bodem ter plekke, terwijl de drinkwatertemperatuur wordt bepaald door de temperatuur van het drinkwater af pompstation en de opwarming (of afkoeling) die optreedt tijdens het transport in het distributiesysteem. Hierdoor kan de drinkwatertemperatuur die na doorstroming wordt gemeten aan de keukenkraan anders zijn dan de temperatuur van de leidingwand in het distributiesysteem. De biofilm, waarin deze opportunistische ziekteverwekkers zich vermeerderen, ontwikkelt zich op de leidingwand in het distributiesysteem. Naar verwachting zal het deel van de biofilm die dicht tegen de leidingwand aanwezig is een temperatuur hebben dat hetzelfde is als de temperatuur

van de leidingwand, terwijl het deel van de biofilm dat direct contact maakt met het langsstromende water vermoedelijk dezelfde temperatuur zal hebben als het drinkwater. Voor zover bekend is de temperatuurgradiënt van de biofilm (van leidingwand naar drinkwater) in een drinkwaterdistributiesysteem niet eerder onderzocht. Daarnaast ontbreekt ook informatie over de locatie in de biofilm (deel dat in direct contact staat met de leidingwand of deel dat in direct contact staat met het drinkwater) waar de opportunistische ziekteverwekkers zich vermeerderen. Hierdoor is de invloed van de mogelijke temperatuurgradiënt in de biofilm niet meegenomen in het opgestelde advies. De adviezen gegeven in de bovenstaande paragrafen gelden daarom dus onder de aanname dat de drinkwatertemperatuur, de temperatuur van de leidingwand en de temperatuur van de biofilm hetzelfde zijn. Het is wenselijk om aanvullend onderzoek uit te voeren naar deze temperatuurgradiënt in de biofilm alsook de locatie in de biofilm waar de meeste vermeerdering van de opportunistische ziekteverwekkers optreedt, zodat deze factoren in de toekomst meegewogen kunnen worden in het advies ten aanzien van de norm voor de drinkwatertemperatuur.

Het is belangrijk om te realiseren dat sommige opportunistische ziekteverwekkers in staat zijn zich te vermeerderen in het drinkwaterdistributiesysteem bij temperaturen onder de drinkwaternorm van 25°C. Dit betekent dat het beheersen van de drinkwatertemperatuur tot 25°C in het distributiesysteem onvoldoende is bij het beheersen van deze opportunistische ziekteverwekkers. Voor *P. aeruginosa* geldt zelfs dat hoe lager de drinkwatertemperatuur (in ieder geval tot een minimum van 15°C), des te lager de aantallen *P. aeruginosa* in de biofilm zullen zijn. Het beste is daarom, om de drinkwatertemperatuur in het distributiesysteem zo laag mogelijk te houden. Eerder onderzoek bij KWR heeft laten zien dat binnen een drinkwaterdistributiesysteem van een productielocatie zogenaamde hotspots, een bepaald deel in het distributiesysteem waar de drinkwatertemperatuur hoger is dan in andere delen van het distributiesysteem, kunnen voorkomen (Agudelo-Vera & Fujita, 2017). Om te voldoen aan het advies om de drinkwatertemperatuur in het distributiesysteem zo laag mogelijk te houden, is het aan te bevelen dat drinkwaterbedrijven dergelijke hotspots actief opsporen en maatregelen nemen (bijvoorbeeld dieper leggen van drinkwaterleidingen) die de drinkwatertemperatuur op deze locaties zullen verlagen. In eerdere KWR rapportages is beschreven hoe dergelijke hotspots in het distributiesysteem gevonden kunnen worden (Agudelo-Vera et al., 2020b) en wat voor beheersmaatregelen genomen kunnen worden om de drinkwatertemperatuur op dergelijke hotspotlocaties te verlagen (Agudelo-Vera, 2018; van Vossen et al., 2019). Het zal echter niet altijd mogelijk zijn om beheersmaatregelen te nemen om de drinkwatertemperatuur in de zomerperiode dusdanig laag te houden in het distributiesysteem, dat vermeerdering van opportunistische ziekteverwekkers als *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* niet op kan treden. Daarom is het wenselijk om andere effectieve beheersmaatregelen tegen groei van deze pathogenen in het distributiesysteem te nemen. Doordat de ecologie van deze opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwaterdistributiesysteem onvoldoende bekend is, is het ook onbekend wat voor andere beheersmaatregelen genomen kunnen worden. Het is daarom aanbevelingswaardig om onderzoek naar de ecologie van deze micro-organismen in het drinkwaterecosysteem uit te voeren en die resultaten te gebruiken om beheersmaatregelen te definiëren en de effectiviteit daarvan te testen.

5 Conclusies en aanbevelingen

5.1 Conclusies

Bij toenemende drinkwatertemperatuur neemt de biofilmconcentratie op leidingmateriaal onder semi-stagnante condities af.

Uit eerder onderzoek (van der Kooij et al., 2009b) werd geconcludeerd dat *L. pneumophila* zich pas in drinkwatergerelateerde biofilms weet te vermeerderen als de temperatuur wordt verhoogd tot boven de 30,0°C.

P. aeruginosa kan zich in ieder geval in drinkwatergerelateerde biofilms vermeerderen wanneer de drinkwatertemperatuur tussen de 15,0 en 30,0°C is. Bij toenemende incubatietemperatuur in deze range nemen de aantallen *P. aeruginosa* in de biofilm ook toe. Uit de resultaten is niet duidelijk geworden wat de minimum, optimum en maximale temperatuur is waarbij *P. aeruginosa* zich in drinkwatergerelateerde biofilms zich kan vermeerderen.

S. maltophilia was niet in staat om zich bij alle drinkwatertemperaturen de biofilm te koloniseren tot aantallen boven de detectielimiet. Uit de resultaten kan wel worden geconcludeerd dat *S. maltophilia* zich in ieder geval in drinkwatergerelateerde biofilms kan vermeerderen wanneer de drinkwatertemperatuur 17,5; 20,0 en 30,0°C is. Bij 15,0°C is het aannemelijk dat het organisme zich ook kan vermeerderen, maar dat afsterving en groei bij die temperaturen in evenwicht zijn. Uit de resultaten is niet duidelijk geworden wat het optimum en de maximale temperatuur is waarbij *S. maltophilia* zich in drinkwatergerelateerde biofilms zich kan vermeerderen.

M. kansasii kan zich in ieder geval in drinkwatergerelateerde biofilms vermeerderen bij drinkwatertemperaturen van 20,0°C of hoger, terwijl bij 15,0 en 17,5°C het aannemelijk is dat het organisme zich ook kan vermeerderen, maar dat afsterving en groei bij die temperaturen in evenwicht zijn. Van 20,0 tot 30,0°C neemt bij toenemende incubatietemperatuur ook de aantallen *M. kansasii* in de biofilm toe. Uit de resultaten is niet duidelijk geworden wat het optimum en de maximale temperatuur is waarbij *M. kansasii* zich in drinkwatergerelateerde biofilms zich kan vermeerderen.

A. fumigatus kan zich in ieder geval vermeerderen bij drinkwatertemperaturen boven de 25,0°C, terwijl bij 25,0°C of lagere temperaturen het aannemelijk is dat het organisme zich ook kan vermeerderen, maar dat afsterving en groei bij die temperaturen in evenwicht zijn. Tussen 25,0 en 30,0°C nemen de aantallen *A. fumigatus* toe bij toenemende incubatietemperatuur. Uit de resultaten is niet duidelijk geworden wat het optimum en de maximale temperatuur is waarbij *A. fumigatus* zich in drinkwatergerelateerde biofilms zich kan vermeerderen.

P. aeruginosa, *S. maltophilia* en *M. kansasii* zijn in staat om zich in het drinkwaterdistributiesysteem te vermeerderen bij de huidige norm van de drinkwatertemperatuur (25°C) die in het Drinkwaterbesluit is opgenomen. *L. pneumophila* en *A. fumigatus* zijn daartoe niet in staat.

Wanneer de norm voor de drinkwatertemperatuur in het distributiesysteem wordt verhoogd, dan kan dit leiden tot hogere aantallen *P. aeruginosa*, *M. kansasii*, *A. fumigatus* en *L. pneumophila* in het drinkwaterdistributiesysteem. Voor de eerste drie genoemde opportunistische ziekteverwekkers geldt dit bij verhoging vanaf 25°C, terwijl voor *L. pneumophila* pas hogere aantallen worden waargenomen bij een verhoging vanaf 28°C. Hogere aantallen van deze opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwater verhoogt het gezondheidsrisico voor mensen met een verzwakt immuunsysteem.

De resultaten van de studie beschreven in dit rapport laten zien dat groei van *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* relatief snel kan optreden (binnen zeven tot 14 dagen) bij drinkwatertemperaturen van 25°C en hoger, maar dat groei van *M. kansasii* en *A. fumigatus* soms pas optreedt na incubatie van 28 dagen of langer.

Wanneer de drinkwatertemperatuur in het drinkwaterdistributiesysteem en/of drinkwaterinstallatie toeneemt, neemt de kans op hogere aantallen van *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. kansasii* en *A. fumigatus* in drinkwaterbiofilms ook toe, mits de overige condities (bijvoorbeeld nutriëntenconcentratie, pH, hydraulica, samenstelling microbiële gemeenschap) ook gunstig zijn voor groei van deze opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwatersysteem.

Uit een eerdere studie (van der Kooij et al., 2009) is geconcludeerd dat de aantallen *Aeromonas* en *Legionella* zullen toenemen wanneer de drinkwatertemperatuur in het distributiesysteem boven de 25°C komt. De toename van *Legionella* is daarbij te wijden aan vermeerdering van *L. anisa* en niet *L. pneumophila* wanneer de temperatuur beneden de 30°C blijft. Deze toename in aantallen *Legionella* en *Aeromonas* zal leiden tot een toename in het aantal overschrijdingen van de wettelijke norm voor deze twee parameters. De verwachting is dat er geen toename zal optreden van de wettelijke overschrijdingen voor KG22 en bacteriën van de coligroep.

Gegevens over de invloed van de drinkwatertemperatuur op smaak-, geur-, kleur- en corrosieproblemen in het distributiesysteem ontbreken. In Nederland zijn het aantal smaak-, geur-, kleur- en corrosieproblemen echter relatief laag, waardoor verwacht wordt dat bij toenemende drinkwatertemperatuur het aantal smaak-, geur-, kleur- en corrosieklachten beheersbaar blijven. Een verhoging van de norm voor de drinkwatertemperatuur leidt dus waarschijnlijk niet tot oncontroleerbare toename van dergelijke consumentenklachten.

S. maltophilia is niet in staat om onder de gebruikte condities in de hier beschreven studie bij alle incubatietemperaturen de biofilm te koloniseren. Bij temperaturen van 15,0 t/m 20,0 en 30,0°C is het organisme in staat om de biofilm te koloniseren, maar in de tussenliggende range van 22,5 t/m 27,5°C niet. Hierdoor is het niet aannemelijk dat de incubatietemperatuur verantwoordelijk is dat *S. maltophilia* de biofilm niet kan koloniseren bij incubatietemperaturen van 22,5 t/m 27,5°C.

Aantallen van *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* pieken na relatief korte incubatietijden (7 tot 14 dagen), waarna de aantallen in de biofilm weer afnemen, terwijl de aantallen van *M. kansasii* en *A. fumigatus* pas na lange incubatietijden (>112 dagen) pieken. Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* eerste kolonistoren zijn van de biofilm die na langere incubatie worden vervangen door andere micro-organismen, zoals *M. kansasii* en *A. fumigatus*.

5.2 Aanbevelingen

Op basis van de hierboven beschreven discussie is het advies om de huidige drinkwaternorm van 25°C in het drinkwaterdistributiesysteem te handhaven. De belangrijkste reden daarvoor is dat met een drinkwaternorm van 25°C verhoogde groei van *A. fumigatus* wordt voorkómen en dat, wanneer de overige condities in het distributiesysteem toereikend zijn voor vermeerdering van *P. aeruginosa* en *M. kansasii*, de aantallen van *P. aeruginosa* en *M. kansasii* in het drinkwaterdistributiesysteem bij de norm van 25°C niet verder toenemen. Daardoor zal met de drinkwaternorm van 25°C het risico op infectie met deze vier opportunistische ziekteverwekkers via drinkwater niet verder toenemen, terwijl bij gebruik van een hogere drinkwaternorm dit risico wel kan toenemen. Met het handhaven van de drinkwaternorm op 25°C wordt tevens voorkómen dat het aantal overschrijdingen van de wettelijke parameters *Aeromonas* en *Legionella* zal toenemen.

Het is aanbevelingswaardig om de temperatuurgradiënt van de biofilm op de leidingwand in het distributiesysteem (traject leidingwand naar langsstromend drinkwater) te onderzoeken, evenals de locatie in de biofilm waar de meeste vermeerdering van de opportunistische ziekteverwekkers optreedt. De resultaten van dergelijke

onderzoeken kunnen dan mee worden gewogen in het advies ten aanzien van de norm voor de drinkwatertemperatuur in het distributiesysteem.

Het is raadzaam om te onderzoeken of een percentielwaarde van 25°C als norm kan worden opgenomen voor de watertemperatuur in het Drinkwaterbesluit in plaats van de huidige maximum waarde van 25°C. Op basis van de waargenomen incubatietijd voor groei van opportunistische ziekteverwekkers in drinkwatergerelateerde biofilms zou de watertemperatuur gedurende zeven dagen boven de 25°C kunnen zijn, zonder dat dit tot problematische groei van deze opportunistische ziekteverwekkers leidt. Een dergelijke periode komt overeen met 98-percentielwaarde (P98-waarde) van 25°C. Daarom wordt aanbevolen om te achterhalen of een dergelijke P98-waarde van 25°C (gebaseerd op periode en niet op locaties) betrouwbaar kan worden bepaald. Daarvoor zal (statistisch) moeten worden onderbouwd hoe vaak de drinkwatertemperatuur op bepaalde locaties in een distributiesysteem bepaald zou moeten worden om een P98-waarde van de temperatuur te verkrijgen die voorspellend is voor het overschrijden van de 25°C norm voor meer dan zeven dagen op een bepaalde locatie in het distributiesysteem.

In drinkwaterdistributiesystemen is de drinkwatertemperatuur niet constant gedurende een lange periode. Daarom is het aanbevelingswaardig om te onderzoeken wat de invloed van fluctuerende temperaturen zijn op de groei van opportunistische ziekteverwekkers die in het Nederlandse drinkwater kunnen voorkomen. De informatie van dergelijke experimenten kan ook gebruikt worden om te achterhalen in hoeverre de hierboven gestelde percentielwaarde moet worden aangepast en wat voor strategie nodig is om de drinkwatertemperaturen te monitoren in het distributiesysteem.

Doordat de aantallen van *P. aeruginosa* evenredig toenemen met een toenemende drinkwatertemperatuur vanaf 15°C, is het raadzaam om de drinkwatertemperatuur in het distributiesysteem zo laag mogelijk te houden in de zomerperiode. Daarom wordt aanbevolen om hotspots in het distributiesysteem actief op te sporen en maatregelen te nemen die de drinkwatertemperatuur op deze locaties zullen verlagen. Manieren om hotspots op te sporen en maatregelen die kunnen worden genomen om de drinkwatertemperaturen op dergelijke locaties te verlagen zijn in eerdere studies beschreven (Agudelo-Vera, 2018; van Vossen et al., 2019; Agudelo-Vera et al., 2020b).

Het is aan te bevelen om de minimumtemperatuur voor groei van *P. aeruginosa* in drinkwatergerelateerde biofilms te bepalen. Hiervoor zijn experimenten nodig, waarbij onder dezelfde condities als gebruikt in de hier beschreven studie de vermeerdering van *P. aeruginosa* wordt bepaald in het traject van 5,0 tot 15,0°C. Het is raadzaam om bij een dergelijk experiment ook de andere drie opportunistische ziekteverwekkers te onderzoeken. Daarmee wordt duidelijkheid gekregen bij welke temperatuur deze organismen afnemen. Informatie over de minimumtemperatuur van vermeerdering in het drinkwaterdistributiesysteem is van belang om te achterhalen wanneer in een jaar het risico op vermeerdering van deze opportunistische ziekteverwekkers optreedt.

Het is ook aan te bevelen om te achterhalen wat de optimum- en maximumtemperatuur voor groei van *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. kansasii* en *A. fumigatus* in drinkwatergerelateerde biofilms zijn. Met die gegevens kan worden vastgesteld bij welke temperaturen in de drinkwaterinstallatie van gebouwen de hoogste aantallen in de biofilm kunnen voorkomen en of bepaalde activiteiten (bijvoorbeeld douchen) leiden tot blootstelling aan hogere aantallen opportunistische ziekteverwekkers. Met die informatie wordt tevens meer duidelijkheid gekregen over het risico van het leveren van drinkwater waar *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. kansasii* en *A. fumigatus* in aanwezig zijn.

Het is raadzaam om onderzoek uit te voeren naar de mate van afsterving van *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *M. kansasii* en *A. fumigatus* in drinkwaterbiofilms bij drinkwatertemperaturen van 40 tot 80°C. Met de resultaten van een dergelijk onderzoek kan worden achterhaald in hoeverre de meest toegepaste beheersmaatregel voor *L. pneumophila* (thermische desinfectie bij 60°C) ook effectief is voor beheersing van andere opportunistische ziekteverwekkers die in het Nederlandse drinkwater kunnen voorkomen.

Het is belangrijk om te realiseren dat sommige opportunistische ziekteverwekkers in staat zijn zich te vermeerderen in het drinkwaterdistributiesysteem bij temperaturen onder de drinkwaternorm van 25°C. Dit betekent dat het beheersen van de drinkwatertemperatuur tot 25°C in het distributiesysteem onvoldoende is bij het beheersen van deze opportunistische ziekteverwekkers, zoals ook is gebleken uit het vóórkomen van deze opportunistische ziekteverwekkers in drinkwaterdistributiesystemen in Nederland bij temperaturen onder de 25°C (van der Wielen & van der Kooij, 2011). Hierdoor is het wenselijk om andere effectieve beheersmaatregelen tegen deze opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwaterdistributiesysteem te nemen. Doordat de ecologie van deze opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwaterdistributiesysteem onvoldoende bekend is, is het ook onbekend wat voor andere beheersmaatregelen genomen kunnen worden. Het is daarom aanbevelingswaardig om onderzoek naar de ecologie van deze micro-organismen in het drinkwaterecosysteem uit te voeren en die resultaten te gebruiken om beheersmaatregelen te definiëren en de effectiviteit daarvan te testen.

De resultaten van de hier beschreven studie hebben laten zien dat het mogelijk is dat bepaalde bacteriën in de biofilm de groei van *S. maltophilia* kunnen onderdrukken. Aanvullend onderzoek is echter nodig om te achterhalen of overeenkomstige fenomenen (onderdrukking of stimulering van bepaalde micro-organismen) ook in natuurlijke drinkwaterbiofilms optreden. Dergelijke informatie kan van belang zijn voor de drinkwatersector, omdat de resultaten van zo'n onderzoek laten zien of beheersing van opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwaterecosysteem kan plaatsvinden door de vorming van een natuurlijke protectieve microflora in de biofilm op de leidingwand en sediment.

6 Referenties

Agudelo-Vera, C. M. & Fujita, Y. (2017). Hotspots in het leidingnet. BTO 2017.023. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, Nederland.

Agudelo-Vera, C. M. (2018). Aanpak om de hotspots in het leidingnet terug te dringen. BTO 2018.024. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, Nederland.

Agudelo-Vera, C. M.; Avvedimento, S.; Boxall, J.; Creaco, E.; de Kater, H.; Di Nardo, A.; Djukic, A.; Douterelo, I.; Fish, E. K.; Iglesias Rey, L. P.; Jacimovic, N.; Jacobs, E. H.; Kapelan, Z.; Martinez Solano, J.; Montoya Pachongo, C.; Piller, O.; Quintiliani, C.; Ručka, J.; Tuhovčák, L.; Blokker, M., Drinking Water Temperature around the Globe: Understanding, Policies, Challenges and Opportunities. *Water* 2020, 12 (4).

Agudelo-Vera, C. M., Blokker, E. J. M. & Quintiliani, C. (2020b). Maatregelen tegen ongewenste opwarming van het drinkwater in het leidingnet. BTO 2020.015. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, Nederland.

Bédard, E., Prévost, M., & Déziel, E. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. *MicrobiologyOpen*, 5(6), 937–956. <https://doi.org/10.1002/mbo3.391>.

Bressler, D.; Balzer, M.; Dannehl, A.; Flemming, H. C.; Wingender, J., Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material. *Wat. Sci. Tech.* **2009**, 9 (1), 81-87.

Doğruöz, N.; Göksay, D.; İlhan-Sungur, E.; Cotuk, A., Pioneer colonizer microorganisms in biofilm formation on galvanized steel in a simulated recirculating cooling-water system. *J Basic Microbiol* **2009**, 49 (S1), S5-S12.

Engel, H. W.; Berwald, L. G.; Havelaar, A. H., The occurrence of *Mycobacterium kansasii* in tapwater. *Tubercle* **1980**, 61 (1), 21-26.

Farhat, N. M.; Vrouwenvelder, J. S.; Van Loosdrecht, M. C. M.; Bucs, S. S.; Staal, M., Effect of water temperature on biofouling development in reverse osmosis membrane systems. *Water Res* 2016, 103, 149-159.

Glasmacher, A.; Engelhart, S.; Exner, M., Infections from HPC organisms in drinking-water amongst the immunocompromised. In *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-Water Safety*, Bartram, J.; Cotruvo, J.; Exner, M.; Fricker, C.; Glasmacher, A., Eds. World Health Organization: Cornwall, UK, 2003; pp 137-145.

ILT (Inspectie Leefomgeving en Transport)(2019) Drinkwaterkwaliteit 2018. ILT, Den Haag, Nederland.

Lipson, D. A., The complex relationship between microbial growth rate and yield and its implications for ecosystem processes. *Frontiers in microbiology* 2015, 6, 615-615.

McDaniel, M. S.; Schoeb, T.; Swords, W. E., Cooperativity between *Stenotrophomonas maltophilia* and *Pseudomonas aeruginosa* during polymicrobial airway infections. *Infect Immun* **2020**, 88 (4), e00855-19.

Monod J. (1942). *Recherches Sur la Croissance des Cultures Bacteriennes*. Paris: Hermann et cie.

Oesterholt, F.I.H.M.; Veenendaal, H.R.; van der Kooij, D. (2006) Invloed van de watertemperatuur op de groei van *Legionella* in een proefleidinginstallatie met verschillende leidingmaterialen. KWR 06.110. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, Nederland.

Pompilio, A.; Crocetta, V.; De Nicola, S.; Verginelli, F.; Fiscarelli, E.; Di Bonaventura, G., Cooperative pathogenicity in cystic fibrosis: *Stenotrophomonas maltophilia* modulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in mixed biofilm. *Frontiers in Microbiology* **2015**, *6* (951).

Rasheduzzaman, M.; Singh, R.; Haas, N. C.; Tolofari, D.; Yassaghi, H.; Hamilton, A. K.; Yang, Z.; Gurian, L. P., Reverse QMRA as a Decision Support Tool: Setting Acceptable Concentration Limits for *Pseudomonas aeruginosa* and *Naegleria fowleri*. *Water* 2019, *11* (9).

Rusin, P. A.; Rose, J. B.; Haas, C. N.; Gerba, C. P., Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Rev Environ Contam Toxicol* 1997, *152*, 57-83.

van der Kooij, D.; Oranje, J. P.; Hijnen, W. A., Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in tap water in relation to utilization of substrates at concentrations of a few micrograms per liter. *Appl Environ Microbiol* **1982**, *44* (5), 1086-95.

van der Kooij, D.; Albrechtsen, H.-J.; Corfitzen, C. B.; Ashworth, J.; Parry, I.; Enkiri, F.; Hambsch, B.; Hametner, C.; Kloiber, R.; Veenendaal, H. R.; Verhamme, D.; Hoekstgra, E. J., Assessment of the microbial growth support potential of products in contact with drinking water (CPDW): Development of a harmonised test to be used in the European Acceptance Scheme concerning CPDW. 2003.

van der Kooij, D.; Wullings, B.A.; van der Wielen, P.W.J.J. (2009) Invloed van temperatuurstijging op nagroei van micro-organismen in het leidingnet. KWR 09.052. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, Nederland.

Van der Kooij, D.; Brouwer-Hanzens, A.; Veenendaal, H.R. (2009b) Invloed van de watertemperatuur op de groei van *Legionella pneumophila* en *Legionella anisa* in biofilms. KWR 09.056. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, Nederland.

Van der Kooij, D.; Brouwer-Hanzens, A.; Veenendaal, H.R. (2010) Invloed van de temperatuur op de groei van *Legionella pneumophila* in een vloeibaar medium en in biofilms. KWR 2010.057. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, Nederland.

van der Wielen, P.W.J.J. & van der Kooij, D. (2011) Opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater. BTO 2011.025. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, Nederland.

van der Wielen, P.W.J.J. & van der Kooij, D. (2013) Nontuberculous mycobacteria, fungi, and opportunistic pathogens in unchlorinated drinking water in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**(3): 825-834.

van der Wielen, P.W.J.J. & Uytewaal-Aarts, M. (2013) Non-tuberculeuze mycobacteriën in drinkwater. BTO 2013.054. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, Nederland.

van der Wielen, P.W.J.J. & Medema, G.J. (2014) Kwalitatieve microbiologische risicoanalyse watersysteem olifantenkas Dierenpark Emmen. KWR 2014.036. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, Nederland.

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

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

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 Water Research Institute, Nieuwegein, Nederland.

van der Wielen, P. W. J. J.; Wullings, B. A. *Genotype analyses of Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia and Aspergillus fumigatus isolates from drinking water reveal similar genotypes with patient strains.*, 20th International Symposium on Health Related Water Microbiology, Vienna, Austria, IWA: Vienna, Austria, 2019.

van Vossen, J., Stofberg, S. F. & Agudelo-Vera, C. M. (2019). Effectiviteit maatregelen tegen opwarming drinkwater in leidingen. KWR 2019.080. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, Nederland.

WHO. *Guidelines for Drinking-Water Quality*; WHO: Geneva, Switzerland, 2006.

Wullings, B.A. (2017) Genetische typering van drinkwaterstammen van opportunistische ziekteverwekkers. BTO 2017.065. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, Nederland.

I Bijlage – Data groeicurven

ATP-concentratie en aantallen opportunistische ziekteverwekkers op de verschillende monsterdagen en bij de verschillende incubatietemperaturen.

Adenosinetrifosfaat (pg/cm ²)														
Dag	15.0°C		17.5°C		20.0°C		22.5°C		25.0°C		27.5°C		30.0°C	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
0	0.5		0.5		0.5		0.5		0.5		0.5		0.5	
7	7.6E+03	7.1E+02	4.6E+03	9.8E+02	8.6E+03	3.6E+03	6.4E+03	2.5E+03	6.6E+03	7.4E+02	3.8E+03	3.2E+02	5.5E+03	2.1E+03
14	7.0E+03	8.3E+02	4.5E+03	4.8E+02	5.5E+03	1.6E+03	5.4E+03	7.2E+02	4.8E+03	5.5E+02	4.3E+03	6.4E+02	3.6E+03	6.7E+02
28	1.1E+04	5.0E+02	8.3E+03	1.4E+03	8.4E+03	2.0E+03	8.2E+03	9.2E+02	2.8E+03	1.1E+03	2.7E+03	4.9E+02	3.4E+03	9.2E+02
56	6.6E+03	1.1E+03	5.8E+03	8.6E+02	5.8E+03	1.3E+03	3.5E+03	1.2E+03	5.2E+03	2.5E+03	4.2E+03	3.1E+03	7.1E+03	2.0E+03
112	2.4E+04	7.4E+03	2.9E+04	3.6E+03	2.3E+04	6.4E+03	1.9E+04	5.0E+03	1.5E+04	4.5E+03	1.1E+04	2.7E+03	1.1E+04	2.4E+03
Pseudomonas aeruginosa (kve/cm ²)														
Dag	15.0°C		17.5°C		20.0°C		22.5°C		25.0°C		27.5°C		30.0°C	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
0	1		1		1		1		1		1		1	
7	5.2E+02	2.3E+02	1.3E+03	2.2E+02	1.4E+04	4.8E+03	1.5E+04		1.5E+04		1.5E+04		1.5E+04	
14	7.6E+02	1.7E+02	1.8E+03	5.6E+02	1.2E+04	3.3E+03	1.1E+05	1.7E+04	3.2E+05	2.3E+05	4.7E+05	1.6E+05	2.1E+06	6.8E+05
28	6.1E+02	1.4E+03	6.7E+03	6.2E+03	1.2E+04	3.6E+03	6.2E+04	2.7E+04	6.6E+04	5.6E+04	2.1E+05	8.7E+04	2.3E+05	1.1E+05
56	3.7E+02	1.8E+02	9.3E+02	2.9E+02	1.5E+03	1.2E+03	7.5E+03	4.4E+03	1.2E+03	1.0E+03	2.0E+03	1.5E+03	1.7E+04	1.8E+04
112	2.3E+02	1.6E+02	1.4E+02	1.1E+02	1.4E+02	6.4E+01	8.9E+02	1.1E+03	6.3E+01	2.6E+01	9.0E+01	4.1E+01	2.5E+03	1.2E+03
aantallen waren hoger dan 1.5 x 10 ⁴ kve/cm ²														
Pseudomonas aeruginosa (gk/cm ²)														
Dag	15.0°C		17.5°C		20.0°C		22.5°C		25.0°C		27.5°C		30.0°C	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
0	1		1		1		1		1		1		1	
7	3.5E+06	1.4E+06	7.0E+06	2.4E+06	7.1E+07	1.4E+07	3.3E+08	1.9E+08	7.1E+08	2.4E+08	2.9E+09	6.9E+08	1.1E+10	5.7E+09
14	3.6E+06	1.9E+06	1.1E+07	3.0E+06	6.2E+07	3.3E+07	5.9E+08	1.1E+08	8.2E+08	4.3E+08	1.8E+09	1.1E+09	5.5E+09	1.4E+09
28	3.4E+06	6.0E+05	7.5E+06	1.5E+06	6.8E+07	1.4E+07	3.5E+08	9.1E+07	5.1E+08	2.7E+08	1.3E+09	4.7E+08	4.5E+09	2.3E+09
56	1.2E+06	4.2E+05	3.8E+06	1.0E+06	1.2E+07	1.0E+07	1.0E+08	5.4E+07	3.2E+07	3.7E+07	1.2E+08	8.0E+07	3.2E+08	2.9E+08
112	1.2E+06	6.6E+05	2.2E+06	2.4E+06	1.9E+06	4.7E+05	1.9E+07	2.0E+07	4.0E+06	3.4E+06	3.2E+06	1.5E+06	2.0E+07	9.1E+06
Stenotrophomonas maltophilia (gk/cm ²)														
Dag	15.0°C		17.5°C		20.0°C		22.5°C		25.0°C		27.5°C		30.0°C	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
0	1		1		1		1		1		1		1	
7	2.8E+05	1.3E+05	2.9E+05	1.5E+05	3.0E+06	8.7E+04	4.0E+04		4.0E+04		4.0E+04		6.9E+05	1.5E+05
14	5.7E+04	2.4E+04	4.0E+04		1.4E+06	1.3E+05	4.0E+04		4.0E+04		4.0E+04		1.6E+05	1.1E+05
28	7.1E+04	2.3E+04	4.0E+04		1.0E+05	5.2E+04	4.0E+04		4.0E+04		4.0E+04		4.0E+04	
56	1.1E+05	4.5E+04	5.4E+05	3.9E+05	6.8E+05	6.9E+05	4.0E+04		4.0E+04		4.0E+04		4.0E+04	
112	4.0E+04		4.0E+04		4.0E+04		4.0E+04		4.0E+04		4.0E+04		4.0E+04	
Mycobacterium kansasii (gk/cm ²)														
Dag	15.0°C		17.5°C		20.0°C		22.5°C		25.0°C		27.5°C		30.0°C	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
0	1		1		1		1		1		1		1	
7	2.8E+06	9.9E+05	3.2E+06	1.3E+06	3.5E+06	1.2E+06	2.3E+06	8.2E+05	2.6E+06	7.5E+05	2.5E+06	1.2E+06	2.1E+06	5.9E+05
14	7.0E+06	1.7E+06	1.0E+07	4.9E+06	7.2E+06	2.2E+06	9.6E+06	1.8E+05	7.3E+06	2.7E+06	9.1E+06	4.0E+06	9.4E+06	2.1E+06
28	1.5E+07	3.4E+06	1.2E+07	7.1E+06	1.0E+07	2.4E+06	1.4E+07	9.2E+05	1.0E+07	4.5E+06	1.3E+07	9.3E+05	1.3E+07	5.1E+06
56	1.4E+07	4.8E+06	7.2E+06	1.7E+06	8.8E+06	2.6E+06	5.8E+06	1.6E+06	2.5E+07	1.3E+07	9.0E+06	2.2E+06	2.2E+07	3.7E+06
112	1.1E+07	6.0E+06	1.1E+07	5.9E+06	2.1E+07	6.4E+06	4.0E+07	6.8E+06	1.2E+08	6.6E+07	6.3E+07	5.5E+07	1.5E+08	1.7E+08
Aspergillus fumigatus (kve/cm ²)														
Dag	15.0°C		17.5°C		20.0°C		22.5°C		25.0°C		27.5°C		30.0°C	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
0	1		1		1		1		1		1		1	
7	1.2E+01	4.2E+00	9.1E+00	5.7E+00	1.5E+01	4.6E+00	1.2E+01	5.3E+00	1.4E+01	2.4E+00	1.0E+01	5.2E-01	8.7E+00	2.1E+00
14	3.8E+01	1.9E+01	3.7E+01	3.4E+01	3.3E+01	2.4E+01	2.4E+01	9.4E+00	2.6E+01	7.4E+00	2.9E+01	9.9E+00	8.2E+01	7.9E+01
28	5.4E+01	1.0E+01	4.8E+01	1.3E+01	3.8E+01	4.0E+00	4.4E+01	1.3E+01	4.2E+01	2.0E+01	3.6E+01	1.1E+01	1.9E+02	1.1E+02
56	6.0E+01	1.6E+01	5.4E+01	1.4E+01	4.8E+01	1.3E+01	3.1E+01	1.4E+01	6.8E+01	4.9E+01	8.1E+01	6.0E+01	2.7E+02	7.2E+01
112	6.0E+01	1.1E+01	8.0E+01	1.9E+01	5.6E+01	1.4E+01	6.6E+01	1.8E+01	9.9E+01	2.9E+01	2.6E+02	2.4E+02	5.4E+02	5.6E+02
Aspergillus fumigatus (gk/cm ²)														
Dag	15.0°C		17.5°C		20.0°C		22.5°C		25.0°C		27.5°C		30.0°C	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
0	1		1		1		1		1		1		1	
7	4.9E+06	2.3E+06	4.4E+06	2.6E+06	6.3E+06	3.4E+06	4.1E+06	1.8E+06	2.9E+06	1.0E+06	3.3E+06	2.8E+06	3.9E+06	4.2E+06
14	7.6E+06	3.5E+06	1.3E+07	5.5E+06	9.2E+06	6.2E+06	1.2E+07	2.1E+06	6.7E+06	2.1E+06	8.8E+06	3.6E+06	3.4E+07	2.8E+07
28	1.8E+07	4.1E+06	1.3E+07	3.7E+06	1.4E+07	1.5E+06	1.3E+07	1.4E+06	1.6E+07	9.9E+06	7.6E+07	8.0E+07	6.4E+07	4.6E+07
56	1.1E+07	4.0E+06	1.0E+07	3.2E+06	8.9E+06	2.0E+06	7.3E+06	2.1E+06	5.4E+07	7.1E+07	1.8E+08	2.4E+08	5.7E+07	1.3E+07
112	1.6E+07	2.7E+06	2.1E+07	4.8E+06	1.8E+07	9.6E+06	1.9E+07	4.2E+06	8.6E+07	3.7E+07	1.0E+09	1.1E+09	2.2E+08	2.3E+08

II Bijlage – Data groeiopbrengst

Gemiddelde en maximum groeiopbrengst van ATP en aantallen opportunistische ziekteverwekkers bij de verschillende incubatietemperaturen.

Adenosinetriphosfaat (pg/cm²)					Mycobacterium kansasii (gk/cm²)				
Temp	Average yield		Maximum yield		Temp	Average yield		Maximum yield	
(°C)	average	stdev	average	stdev	(°C)	average	stdev	average	stdev
15.0	1.1E+04	7.3E+03	2.4E+04	7.4E+03	15.0	1.0E+07	5.1E+06	1.5E+07	3.4E+06
17.5	1.0E+04	1.1E+04	2.9E+04	3.6E+03	17.5	8.7E+06	3.5E+06	1.2E+07	7.1E+06
20.0	1.0E+04	7.2E+03	2.3E+04	6.4E+03	20.0	1.0E+07	6.4E+06	2.1E+07	6.4E+06
22.5	8.5E+03	6.1E+03	1.9E+04	5.0E+03	22.5	1.4E+07	1.5E+07	4.0E+07	6.8E+06
25.0	6.8E+03	4.6E+03	1.5E+04	4.5E+03	25.0	3.2E+07	4.8E+07	1.2E+08	6.6E+07
27.5	5.2E+03	3.3E+03	1.1E+04	2.7E+03	27.5	1.9E+07	2.5E+07	6.3E+07	5.5E+07
30.0	6.1E+03	3.1E+03	1.1E+04	2.4E+03	30.0	4.0E+07	6.4E+07	1.5E+08	1.7E+08
Pseudomonas aeruginosa (kve/cm²)					Aspergillus fumigatus (kve/cm²)				
Temp	Average yield		Maximum yield		Temp	Average yield		Maximum yield	
(°C)	average	stdev	average	stdev	(°C)	average	stdev	average	stdev
15.0	5.0E+02	2.1E+02	7.6E+02	1.7E+02	15.0	4.5E+01	2.0E+01	6.0E+01	1.6E+01
17.5	2.2E+03	2.6E+03	6.7E+03	6.2E+03	17.5	4.6E+01	2.6E+01	8.0E+01	1.9E+01
20.0	7.9E+03	6.6E+03	1.4E+04	4.8E+03	20.0	3.8E+01	1.6E+01	5.6E+01	1.4E+01
22.5	3.9E+04	4.6E+04	1.1E+05	1.7E+04	22.5	3.5E+01	2.0E+01	6.6E+01	1.8E+01
25.0	8.1E+04	1.4E+05	3.2E+05	2.3E+05	25.0	5.0E+01	3.4E+01	9.9E+01	2.9E+01
27.5	1.4E+05	2.0E+05	4.7E+05	1.6E+05	27.5	8.3E+01	1.0E+02	2.6E+02	2.4E+02
30.0	4.7E+05	9.0E+05	2.1E+06	6.8E+05	30.0	2.2E+02	2.1E+02	5.4E+02	5.6E+02
Pseudomonas aeruginosa (gk/cm²)					Aspergillus fumigatus (gk/cm²)				
Temp	Average yield		Maximum yield		Temp	Average yield		Maximum yield	
(°C)	average	stdev	average	stdev	(°C)	average	stdev	average	stdev
15.0	2.6E+06	1.3E+06	3.6E+06	1.9E+06	15.0	1.2E+07	5.6E+06	1.8E+07	4.1E+06
17.5	6.3E+06	3.4E+06	1.1E+07	3.0E+06	17.5	1.2E+07	6.2E+06	2.1E+07	4.8E+06
20.0	4.3E+07	3.3E+07	7.1E+07	1.4E+07	20.0	1.1E+07	4.8E+06	1.8E+07	9.6E+06
22.5	2.8E+08	2.3E+08	5.9E+08	1.1E+08	22.5	1.1E+07	5.9E+06	1.9E+07	4.2E+06
25.0	4.1E+08	3.8E+08	8.2E+08	4.3E+08	25.0	3.3E+07	3.6E+07	8.6E+07	3.7E+07
27.5	1.2E+09	1.2E+09	2.9E+09	6.9E+08	27.5	2.6E+08	4.4E+08	1.0E+09	1.1E+09
30.0	4.3E+09	4.6E+09	1.1E+10	5.7E+09	30.0	7.5E+07	8.2E+07	2.2E+08	2.3E+08
Stenotrophomonas maltophilia (gk/cm²)									
Temp	Average yield		Maximum yield		Temp	Average yield		Maximum yield	
(°C)	average	stdev	average	stdev	(°C)	average	stdev	average	stdev
15.0	1.1E+05	9.8E+04	2.8E+05	1.3E+05					
17.5	1.9E+05	2.2E+05	5.4E+05	3.9E+05					
20.0	1.1E+06	1.2E+06	3.0E+06	8.7E+04					
30.0	1.9E+05	2.8E+05	6.9E+05	1.5E+05					