

A network diagram consisting of various sized light blue circles connected by thin white lines, set against a solid blue background. The circles vary in size, with some being significantly larger than others, and they are interconnected in a complex, non-linear fashion.

Bedrijfstakonderzoek
BTO 2022.031 | Juni 2022

**Bepalen van niche in
het distributiesysteem
van *Aeromonas*,
Legionella en
bacteriën van de
coligroep**

Bedrijfstakonderzoek

KWR

Bridging Science to Practice

Rapport

Bepalen van niche in het distributiesysteem van *Aeromonas*, *Legionella* en bacteriën van de coligroep

BTO 2022.031 | Juni 2022

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

Opdrachtnummer

402045-250

Projectmanager

Michiel Hootsmans

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische veiligheid

Auteurs

Kimberly Learbuch MSc., dr. ir. Nikki van Bel

Kwaliteitsborger

Dr. Paul van der Wielen

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Keywords

Aeromonas, *Legionella*, bacteriën van de coligroep, normoverschrijdingen, BTO

Jaar van publicatie
2022

Meer informatie
Dr.ir. Nikki van Bel
T 030-6069516
E Nikki.van.Bel@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

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

KWR

Juni 2022 ©

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

Niches in distributiesysteem voor *Aeromonas*, *Legionella* en coligroep onderzocht

Auteurs Kimberly Learbuch MSc, dr. ir. Nikki van Bel

Nagroeï in het distributienet beheersen vergt kennis over de niche waarin micro-organismen voorkomen. Dat is onderzocht voor drie wettelijke parameters: *Legionella*, *Aeromonas* en bacteriën van de coligroep. Bekend was al dat *Aeromonas* bacteriën voornamelijk in sediment voorkomen en dat *Legionella pneumophila* groeit in biofilm en vrijkomt in drinkwater. Buisuitnamen en spuiacties gaven onvoldoende informatie om te bepalen in welke niche van het distributienet (drinkwater, [biofilm op] sediment of buiswandbiofilm) andere *Legionella* soorten en bacteriën van de coligroep voorkomen. Deze bacteriën werden maar in weinig monsters aangetroffen, wat leidt tot de conclusie dat bacteriën van de coligroep zowel hun niche in de buiswandbiofilm als in de sedimentbiofilm kunnen hebben. De niche van *Aeromonas* kon wel worden bepaald: *Aeromonas* is voornamelijk aanwezig in biofilm op sediment en in drinkwater. Omdat meer dan 90 tot 99% van de actieve biomassa zich bevindt in de biofilm op de leidingwand of op het sediment, overeenkomstig met eerder onderzoek, hoeft drinkwater geen goede indicator te zijn van de microbiële activiteit in drinkwaterdistributiesystemen. Andere onderzoeksmethoden worden voorgesteld om de aanwezigheid in niches verder te onderzoeken.



Spuiacties en buisuitnamen zijn uitgevoerd om te bepalen in welke niche (drinkwater, buiswandbiofilm, sediment) de bacteriesoorten *Aeromonas*, *Legionella* en bacteriën van de coligroep vóórkomen.

Belang: nagroeï controleren vergt kennis over de niche waarin micro-organismen voorkomen

Het Drinkwaterbesluit hanteert bedrijfstechnische parameters waaraan drinkwaterdistributiesystemen moeten voldoen. De microbiologische parameters voor *Aeromonas* (<1000 kve/100 ml) en voor bacteriën van de coligroep (<1 kve/100 ml) hebben geen directe gezondheidskundige achtergrond, maar

worden gebruikt om de integriteit en werking van de drinkwaterproductie en het distributienet te monitoren. De parameter voor *Legionella* heeft indirect een gezondheidskundige achtergrond: naast minder gevaarlijke kweekbare *Legionella*-soorten als *L. anisa* wordt ook de veroorzaker van veteranenziekte *L. pneumophila* bepaald. Het

Drinkwaterbesluit schrijft voor dat <100 kve/l *Legionella* aanwezig mag zijn in drinkwater.

De norm voor *Legionella* werd in 2020 in 5,2% van de watermonsters overschreden, de norm voor *Aeromonas* in 1,90% en de norm voor bacteriën van de coligroep in 0,10%. Absoluut gezien wordt de norm voor *Aeromonas* het vaakst overschreden, gevolgd door *Legionella* en bacteriën van de coligroep. De mate van nagroei en/of aanwezigheid van deze bacteriegroepen is daarmee op enkele locaties in Nederland onvoldoende onder controle.

Om grip te krijgen op nagroei, is het belangrijk te weten in welke niche van het distributiesysteem (water, sediment en buiswandbiofilm) deze micro-organismen aanwezig zijn. Bekend is dat *Aeromonas*-bacteriën voornamelijk in sediment voorkomen en dat *Legionella pneumophila* groeit in biofilm en vrijkomt in drinkwater, maar van andere *Legionella*-soorten en de bacteriën van de coligroep is minder bekend over in welke niche ze voorkomen.

Aanpak: Bepalen bacteriesoorten bij buisuitnamen en spuiacties

Het onderzoek naar de niches maakte gebruik van spuiacties, leidinguitnames en typering met MALDI-TOF van de aangetroffen bacteriën van de coligroep. Ook is nagegaan of de aangetroffen bacteriën van de coligroep vermoedelijk van fecale herkomst of een andere besmettingsbron komen en of de stammen kunnen nagroeien in drinkwater.

Resultaten: Niche niet volledig te bepalen

Meer dan 90 tot 99% van de actieve biomassa (in de vorm van ATP) bevindt zich in de biofilm op de leidingwand of het sediment, conform eerder onderzoek. Drinkwater kent dus de laagste microbiële activiteit en is daarom waarschijnlijk geen goede indicator voor microbiële activiteit in een drinkwaterdistributiesysteem.

De *Aeromonas*-aantallen in drinkwater zijn hoger dan in buiswandbiofilm. *Aeromonas* heeft dus geen niche in buiswandbiofilm, conform eerdere studies.

Omdat in slechts één monster *Legionella* en/of bacteriën van de coligroep zijn aangetroffen, kan geen betrouwbare uitspraak worden gedaan over de niche(s) van deze micro-organismen. De aangetroffen legionellabacteriën behoren tot de minder gevaarlijke soort *L. anisa*. De hoog virulente *L. pneumophila*, maar ook andere niet-gevaarlijke soorten, zijn niet aangetroffen.

De **bacteriën van de coligroep** zijn in slechts drie monsters aangetroffen: twee keer in de buiswandbiofilm en één keer in het sediment. Van de aangetroffen bacteriën van de coligroep horen maar 2 soorten tot de 10% meest voorkomende soorten in Nederlands en Vlaams drinkwater. Van de gevonden bacteriën van de coligroep worden bovendien alleen *Escherichia coli* en *Citrobacter gillenii* beschouwd als van fecale herkomst, de andere soorten komen van nature voor in waterige milieus.

Toepassing: herhaal onderzoek met andere methode

Het is niet volledig gelukt te bepalen welke niches *Aeromonas*, *Legionella* en/of bacteriën van de coligroep bezetten. Er zijn verschillende opties om deze niches alsnog te bepalen:

- Doseer bacteriesoorten in een pilot distributiesysteem (met sediment en biofilm) en bemonster de niches.
- Doe groeiproeven met drinkwater, biofilm op leidingmateriaal en op sediment. Doseer bacteriën van de coligroep en *Legionella* en meet in de tijd in welke niche ze groeien.
- Bepaal de bacteriesoorten op meer buisuitnames en analyseer grotere volumes spuiwater en buiswandoppervlakte (kostbaar, vraagt veel mankracht en kleine 'pakkans').

Het Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Bepalen van niche in het distributiesysteem van Aeromonas, Legionella en bacteriën van de coligroep* (BTO 2022.031).

Inhoud

Rapport	2
<i>Managementsamenvatting</i>	3
Inhoud	6
1 Aanleiding	7
2 Materiaal en methoden	8
2.1 Monsterlocaties	8
2.2 Monstername	8
2.2.1 Drinkwatermonsters	8
2.2.2 Biofilmmonsters	8
2.3 Analyses	9
2.3.1 Adenosinetrifosfaat (ATP)	9
2.3.2 <i>Aeromonas</i>	9
2.3.3 <i>Legionella</i>	10
2.3.4 Bacteriën van de coligroep	10
2.3.5 MALDI-TOF typering	10
2.4 Berekeningen	10
3 Resultaten	12
3.1 ATP	12
3.2 <i>Aeromonas</i>	12
3.3 Bacteriën van de coligroep	12
3.4 <i>Legionella</i>	14
4 Discussie	15
4.1 Niche <i>Aeromonas</i> , <i>Legionella</i> en bacteriën van de coligroep in het distributiesysteem	15
4.2 Typering bacteriën van de coligroep	17
5 Conclusies en aanbevelingen	19
5.1 Conclusies	19
5.2 Aanbevelingen	19
6 Referenties	21
I Bemonsteringsprotocol	22
Watermonsters (voor het spuien nemen)	22
Spuimonster: door KWR monsternemer (voor buiswand uitname)	22
Buiswand uitname: door waterbedrijf/aannemer	22

1 Aanleiding

De microbiologische parameters *Aeromonas* en bacteriën van de coligroep zijn opgenomen in het Drinkwaterbesluit als bedrijfstechnische parameter. Ze hebben geen directe gezondheidskundige achtergrond, maar worden gebruikt als indicator voor de microbiologische waterkwaliteit van het drinkwater. *Aeromonas* wordt daarbij gebruikt als indicator voor nagroei in het distributiesysteem. Bij aanwezigheid van nutriënten in drinkwater, die bacteriën kunnen gebruiken voor groei, kan *Aeromonas* toenemen in het distributiesysteem en de wettelijke norm voor drinkwater (<1000 kve/100 ml) overschrijden. De bacteriën van de coligroep zijn niet alleen aanwezig in de darm van mensen en dieren, maar ook in het milieu en sommige fecale en milieusoorten kunnen zich, indien voldoende nutriënten aanwezig zijn, vermeerderen in het drinkwatersysteem. Daarmee zijn bacteriën van de coligroep een brede indicator voor de microbiologische waterkwaliteit. De wettelijke norm voor bacteriën van de coligroep in drinkwater is 0 kve/100 ml. De parameter *Legionella* kan een gezondheidskundige achtergrond hebben omdat, naast minder gevaarlijke kweekbare *Legionella*-soorten zoals *Legionella anisa*, ook *Legionella pneumophila* (de veroorzaker van de veteranenziekte) wordt bepaald. De wettelijke norm in het Drinkwaterbesluit is <100 kve/l.

Uit de jaarlijkse ILT-rapporten over de drinkwaterkwaliteit in Nederland volgt dat de wettelijke parameter *Legionella* procentueel gezien het vaakst wordt overschreden van alle wettelijke parameters die worden bepaald van het gedistribueerde drinkwater (5,2% in 2020), gevolgd door *Aeromonas* (1,90% in 2020) (1). Overschrijdingen van de norm voor bacteriën van de coligroep zijn daarentegen relatief laag (0,10% in 2020). Absoluut gezien wordt de norm voor *Aeromonas* het vaakst overschreden (154 van 8089 metingen in 2020) van alle wettelijke parameters, gevolgd door *Legionella* (82 van 1572 metingen in 2020) en bacteriën van de coligroep (50 van 49859 metingen in 2020). De overschrijdingen van *Legionella* worden overigens in vrijwel alle gevallen veroorzaakt door *L. nonpneumophila*-soorten. Uit deze resultaten blijkt dat op basis van de door de overheid aangewezen wettelijke parameters voor de microbiologische kwaliteit van het drinkwater in het distributiesysteem, deze microbiologische waterkwaliteit op enkele locaties in Nederland onvoldoende onder controle is. Deze wettelijke microbiologische parameters zijn voornamelijk gerelateerd aan nagroei van micro-organismen in het distributiesysteem.

Om grip op nagroei en/of aanwezigheid van deze bacteriegroepen te krijgen, is het belangrijk om te weten in welke niche van het distributiesysteem (water, biofilm op het sediment en/of biofilm op de buiswand) ze aanwezig zijn. Van *Aeromonas*-bacteriën is bekend dat deze dominant aanwezig zijn in het sediment en in mindere mate in het drinkwater of de biofilm op de leidingwand (2). *L. pneumophila* groeit in eencellige dierlijke organismen die op de biofilm grazen en na vrijkomen uit deze eencellige dierlijke organismen ook in het drinkwater terechtkomen. Van de andere kweekbare legionellasoorten (zoals *L. anisa*) en de (kweekbare) bacteriën van de coligroep is minder goed bekend in welke niche (drinkwater, sediment en/of biofilm op de buiswand) deze voorkomen. Door middel van spuiacties en leidinguitnames is geprobeerd te bepalen in welke niche deze bacteriën aanwezig zijn. De aangetroffen bacteriën van de coligroep worden daarbij ook getypeerd met MALDI-TOF. Van deze bacterie-isolaten wordt nagegaan of ze vermoedelijk van fecale herkomst, of een andere besmettingsbron, afkomstig zijn of dat het stammen zijn die zich in het drinkwatersysteem kunnen vermeerderen.

2 Materiaal en methoden

2.1 Monsterlocaties

In de zomer en najaar van 2021 zijn op drie locaties, in drie verschillende voorzieningsgebieden, drinkwater- en sedimentmonsters genomen. Daarnaast zijn buisuitnamen uitgevoerd om zo ook de biofilm op de leidingwand te kunnen bemonsteren. In Tabel 1 zijn de monsternamelocaties gegeven.

In sommige distributiegebieden komen *Aeromonas*-bacteriën relatief vaak en in relatief hoge aantallen voor. Bacteriën van de coligroep en legionellabacteriën worden meestal echter niet of in relatief lage aantallen gedetecteerd in drinkwater. Om de kans op het aantreffen van de drie bacteriegroepen, en met name de bacteriën van de coligroep en *Legionella*, zo groot mogelijk te maken, zijn voor de monstername locaties gekozen waar in het recente verleden deze bacteriën vaker in drinkwatermonsters zijn aangetroffen. Deze locaties zijn in overleg met de drinkwaterbedrijven geselecteerd. Omdat *Aeromonas*-bacteriën regelmatig aangetroffen worden én daarvan al bekend is in welke niche die voornamelijk aanwezig is, namelijk sediment (2), is hiermee geen rekening gehouden bij het selecteren van de monsternamelocaties.

Tabel 1. Overzicht locaties bemonsteringen.

Waterbedrijf	Productielocatie	Locatie	Leiding	Monsterdatum
PWN	Andijk	Geldelozepead, Medemblik	110 PVC	22 juni 2021
		Hemsterhuisweg, Middenbeemster	110 PVC	27 september 2021
Evides	Kralingen	Bandahof, Capelle a/d IJssel	160 PVC	15 september 2021
Vitens	Noordbergum	Paulus Akkermanwei, Leeuwarden	110 PVC	1 november 2021
		Nijlansdyk, Bitgummole	107 PVC	1 november 2021

2.2 Monstername

2.2.1 Drinkwatermonsters

Bij de monsternamen van Evides en Vitens zijn drinkwatermonsters uit het distributiesysteem aan de keukenkraan bij consumenten genomen. Daarbij is het drinkwatermonster genomen nadat de drinkwatertemperatuur 30 seconden constant was. Op 22 juni 2021, in Medemblik (PWN), is het drinkwatermonster via een monsterpunt (watermeterput), na doorstroming, buiten genomen en voor de monstername van 27 september 2021 is een extra aansluiting op de hoofdleiding gemaakt. Ook hier is na doorstroming bemonsterd.

Tijdens monstername in Capelle a/d IJssel op 15 september 2021 bleek dat het tappunt in een bejaardentehuis ligt. Door de hogere temperatuur in het bejaardentehuis is het zeer waarschijnlijk dat het regelmatig aantreffen van *Legionella* op deze locatie wordt veroorzaakt door het monsterpunt en niet doordat er in het distributienet een legionellabron aanwezig is.

2.2.2 Biofilmmonsters

2.2.2.1 Sediment

Sedimentmonsters zijn genomen door te spuien met 1 m/s, hierbij is alleen de 30 – 500 µm fractie verzameld.

De biofilm is van het sediment losgetrild door vier keer 2 minuten LES (Low Energy Sonification bij 40 KHz) toe te passen. Na bezinking van het sediment is het bovenstaande water, met losgetrilde biofilm, gebruikt om onderstaande analyses (paragraaf 2.3) in te zetten.

In dit onderzoek is ervoor gekozen om sediment te bemonsteren en te analyseren in plaats van spuiwater aangezien er in spuiwater minder sediment aanwezig is dan wanneer dit geconcentreerd wordt in planktonnetten. Hiermee wordt de kans vergroot dat één van de bacteriegroepen (*Aeromonas*, *Legionella*, bacteriën van de coligroep) worden gevonden.

2.2.2.2 Leidingwand

Op elke monsternamelocatie in het distributiesysteem is een stuk PVC-U leiding uitgenomen. Een uitgebreid protocol hoe deze leidinguitnames zijn verricht is te vinden in Bijlage I. Kort samengevat wordt de leiding uitgegraven en rondom vrijgemaakt van de bodem en wordt een ontwateringspomp gebruikt om de gegraven put vrij te houden van water. De leiding wordt ontwaterd door eerst een klein sleufje te zagen. Vervolgens wordt met twee zaagsneden het stuk leiding uitgezaagd. Deze wordt vervolgens verpakt in steriele zakken en koel (4°C) vervoerd naar het KWR-laboratorium.

Op het microbiologische laboratorium van KWR is de biofilm van de uitgenomen leidingen op twee manieren bemonsterd: swabben met een wattenstaafje en 'tandenborstelen' met een elektrische tandenborstel. Voor het swabben is een ring van 1 cm breed rondom de buis met een steriel wattenstaafje afgenomen. Het wattenstaafje werd vervolgens in 10 ml steriel leidingwater gedaan en behandeld met vier keer 2 minuten LES (Low Energy Sonification bij 40 KHz) om de biofilm los te maken. Na iedere behandeling werd het volume opgevangen gevolgd door het opnieuw toevoegen van 10 ml steriel leidingwater. Van de buiswand van Medemblik is zo in totaal 40 ml verkregen. Bij de andere locaties zijn er meer swabs gebruikt en is er een totaal volume van 160 ml verkregen. Op deze losgetrilde biofilm is het ATP-gehalte bepaald. Na het swabben is de leiding doormidden gezaagd en is van de helft de biofilm verzameld met een steriele tandenborstel in ±500ml steriel leidingwater. Dit volume is gebruikt om de kweekanalyses van *Aeromonas*, *Legionella* en bacteriën van de coligroep in te zetten.

2.3 Analyses

2.3.1 Adenosinetrifosfaat (ATP)

ATP is aanwezig in alle levende organismen en is een maat voor de hoeveelheid actieve biomassa. De ATP-bepaling berust op de luciferine-luciferase reactie, waarbij ATP onder vorming van licht (één foton per molecuul ATP) overgaat in adenosinedifosfaat (ADP). Met behulp van lichtgevoelige apparatuur kan de lichtproductie nauwkeurig worden gemeten. De werkwijze levert binnen enkele minuten een resultaat op. De detectiegrens van de bepaling bij direct onderzoek van drinkwater bedraagt ca. 1 ng ATP/l. De ATP-bepaling wordt gebruikt voor de bepaling van de biomassaconcentratie in leidingwater en van de hoeveelheid biomassa in de biofilm op sediment en op de buiswand. De ATP-concentratie van de biofilm op de buiswand wordt weergegeven in pg ATP/cm², terwijl de concentratie van drinkwater en van de biofilm op het sediment wordt weergegeven in ng/l. Om de ATP-concentratie van water, sediment en biofilm met elkaar te kunnen vergelijken zijn de resultaten omgerekend naar ng ATP per meter buislengte met een diameter van 110 mm.

De ATP-analyse is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-002.

2.3.2 *Aeromonas*

Detectie van *Aeromonas*-bacteriën is uitgevoerd met behulp van de kweekmethode conform NEN 6263 en beschreven in KWR-huisvoorschrift LMB-022. De bepalingsgrens van de methode komt overeen met 1 kolonievormende eenheid per 100 ml (1 kve/100 ml). Voor het kwantificeren van de *Aeromonas*-bacteriën zijn

watermonsters en gesuspendeerde biofilmmonsters gefiltreerd over een membraanfilter (0,45 µm), of uitgespateld, op Ampicilline Dextrine Agar (ADA) en vervolgens 24 uur geïncubeerd bij 30°C. Kolonies met een kenmerkende morfologie (geel) zijn geteld. De resultaten voor water, sediment en biofilm zijn wederom omgerekend naar kve per meter buislengte met een diameter van 110 mm.

2.3.3 *Legionella*

Het aantal *Legionella*bacteriën is bepaald met de kweekmethode op Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE) met antibiotica conform NEN 6265 en beschreven in KWR-huisvoorschrift LMB-027. Na 7 dagen incubatie bij 37 °C zijn morfologisch typische kolonies geteld. Hierbij kon onderscheid worden gemaakt tussen kolonies van *L. anisa* en kolonies van *L. pneumophila*. Bevestiging van de kolonies is uitgevoerd op BCYE-medium met en zonder cysteïne. De resultaten voor water, sediment en biofilm zijn wederom omgerekend naar kve per meter buislengte met een diameter van 110 mm.

2.3.4 Bacteriën van de coligroep

Het aantal bacteriën van de coligroep is bepaald met de kweekmethode volgens LMB-042, conform NEN-EN-ISO 9308-1. Hiervoor is het watermonster gefiltreerd over een membraanfilter (0,45 µm), of uitgespateld, en vervolgens geïncubeerd op Lauryl Sulfate Agar (LSA-platen) bij 36°C gedurende 24 uur. De resultaten voor water, sediment en biofilm zijn wederom omgerekend naar kve per meter buislengte met een diameter van 110 mm.

In de norm staat vermeld dat alleen lactose-positieve kolonies, te zien aan de gele kleur van een kolonie, moeten worden reingestroken om deze vervolgens te bevestigen met een oxidasebepaling. Bacteriën van de coligroep zijn lactose-positief en oxidase-negatief in de bepaling. Kolonies die lactose-negatief zijn, of lactose- en oxidase-positief, worden niet tot bacteriën van de coligroep gerekend.

2.3.5 MALDI-TOF typering

Alle aangetroffen kolonies (27 kolonies, waarvan 22 bacteriën van de coligroep en 5 *Legionella*) zijn met MALDI-TOF getypeerd. Hiervoor zijn de kolonies reingestroken op Trypton Soja Agar (TSA) agar en vervolgens opgestuurd naar Aqualab Zuid waar de MALDI-TOF analyse is uitgevoerd.

2.4 Berekeningen

Om de ATP-concentratie en aantallen *Aeromonas*, bacteriën van de coligroep en *Legionella* in de verschillende niches met elkaar te vergelijken zijn de resultaten in drinkwater en buiswandbiofilm omgerekend naar ng/m leiding (ATP) of kve/m leiding (*Aeromonas*, bacteriën van de coligroep en *Legionella*). Hierbij is uitgegaan van een leiding met 110 mm diameter. De resultaten van het sediment kunnen niet omgerekend worden aangezien het totaal volume gespuid sediment, of de duur van de spuiactie, niet bekend is. Hiervoor zijn de volgende formules en waarden gebruikt:

- Volume 1 meter 110 mm leiding: 9,5 liter
- Binnenoppervlakte van 1 meter 110 mm leiding: $2\pi r h = 0,3366 \text{ m}^2$
- Waarbij r = straal van de binnenkant van de leiding = 53,6 mm = 0,0536 m
- h = lengte van de leiding = 1 meter (voor deze berekeningen)
- Omrekening cm^2 naar m^2 : factor 10000

Voorbeeld ATP in drinkwater:

$$ng/l * volume\ per\ meter = ng/l * 9,5 = ng/m$$

Dat geeft:

$$ng/l * volume\ per\ meter = 8,7 * 9,5 = 82,65\ ng/m$$

Voorbeeld ATP in buiswandbiofilm:

$$\frac{pg}{cm^2} * correctiefactor\ cm^2\ naar\ m^2 = pg/m^2$$

$$\frac{pg}{m^2} * oppervlakte\ 1m\ leiding = pg/m$$

Dat geeft:

$$84 * 10000 = 840000\ pg/m^2$$

$$840000 * 0,3366 = 282750\ pg/m$$

$$\frac{282750}{1000} = 272,8\ ng/m$$

3 Resultaten

3.1 ATP

De ATP-resultaten van de verschillende bemonsterde locaties en niches (water, sediment, buiswandbiofilm) zijn weergegeven in Tabel 2. De ATP-concentratie van het drinkwater van de verschillende locaties lagen tussen de 4,1 en 12 ng ATP/l, wat normale ATP-gehaltenes voor drinkwater zijn (3). De ATP-concentratie in het sediment van de verschillende locaties was $3,3 \times 10^2$ en $1,9 \times 10^4$ pg/ml. De ATP-concentratie in de biofilm van de verschillende uitgenomen leidingen lagen tussen de 68 en 770 pg/cm².

Tabel 2. De ATP-concentraties in het drinkwater, sediment en buiswand van de verschillende bemonsterde locaties.

	Drinkwater (ng/l)	Sediment 30 - 500 µm (ng/l)	Buiswand (pg/cm ²)
Medemblik	8,7	$4,90 \times 10^3$	84
Middenbeemster	12	$1,90 \times 10^4$	770
Capelle a/d IJssel	9,8	$2,90 \times 10^3$	360
Leeuwarden	4,1	$9,2 \times 10^2$	210
Nijlansdyk	4,6	$3,3 \times 10^2$	68

3.2 Aeromonas

De *Aeromonas*-aantallen van de verschillende bemonsterde locaties en niches zijn weergegeven in Tabel 3. In elk monster is *Aeromonas* aangetroffen, op één monster na (buiswand van Medemblik). De *Aeromonas*-aantallen van het drinkwater van de verschillende locaties lagen tussen de $4,8 \times 10^2$ en $7,9 \times 10^3$ kve/100 ml, bij Capelle a/d IJssel waren de *Aeromonas*-aantallen $>1,0 \times 10^4$ kve/100 ml. Op vier van de vijf locaties wordt daarmee de norm van > 1000 kve/100 ml overschreden.

De *Aeromonas*-aantallen in het sediment van de verschillende locaties lagen tussen de $5,2 \times 10^5$ en $1,3 \times 10^7$ kve/l. De *Aeromonas*-aantallen in de buiswandbiofilm van de verschillende locaties lagen tussen de $<0,05$ en 27 kve/cm².

Tabel 3. De *Aeromonas* aantallen in het drinkwater, sediment en buiswand van de verschillende bemonsterde locaties.

	Drinkwater (kve/100 ml)	Sediment 30 - 500 µm (kve/l)	Buiswand (kve/cm ²)
Medemblik	1.900	$3,20 \times 10^6$	$<0,05$
Middenbeemster	7.900	$1,3 \times 10^7$	27
Capelle a/d IJssel	> 10.000	$1,50 \times 10^6$	0,5
Leeuwarden	1.900	$6,50 \times 10^6$	0,67
Nijlansdyk	480	$5,20 \times 10^5$	0,31

3.3 Bacteriën van de coligroep

De aantallen bacteriën van de coligroep van de verschillende bemonsterde locaties zijn weergegeven in Tabel 4. Er zijn op drie verschillende locaties bacteriën van de coligroep aangetroffen: in de buiswandbiofilm van

Middenbeemster (0,18 kve/cm²) en van Leeuwarden (0,007 kve/cm²) en in het sediment van Nijlansdyk (1,8 x 10⁴ kve/l).

Tabel 4. De aantallen bacteriën van de coligroep in het drinkwater, sediment en buiswand van de verschillende bemonsterde locaties.

	Drinkwater (kve/l)	Sediment 30 - 500 µm (kve/l)	Buiswand (kve/cm ²)
Medemblik	<10	<1,0 x 10 ³	<0,05
Middenbeemster	<100	<1,0 x 10 ³	0,16
Capelle a/d IJssel	<1,0 x 10 ³	<1,0 x 10 ³	<0,003
Leeuwarden	<10	<1,0 x 10 ³	0,007
Nijlansdyk	<10	1,8 x 10 ⁴	<0,002

Van de buiswandmonsters van Middenbeemster en het sedimentmonster van Nijlansdyk zijn ieder tien kolonies met MALDI-TOF getypeerd. Van het positieve buiswandmonster van Leeuwarden zijn twee kolonies met MALDI-TOF getypeerd (Tabel 5).

Negen van de tien kolonies van Middenbeemster zijn gespecificeerd als *Kluyvera ascorbata*, één kolonie is getypeerd als *Aeromonas veronii* en niet als bacterie van de coligroep. De resultaten in Tabel 4 zijn hier op aangepast. De twee kolonies van Leeuwarden zijn gespecificeerd als *Citrobacter gillenii*. Vijf van de kolonies van Nijlansdyk zijn gespecificeerd als *Escherichia coli*, twee als *Citrobacter braakii* en de andere drie als *Buttiauxella agrestis*, *Rahnella aquatilis* en *Kluyvera intermedia*.

Tabel 5. Resultaten MALDI-TOF analyse van de drie positieve locaties met coliformen.

Locatie	MALDI-TOF resultaat	Aantal kolonies
Middenbeemster (buiswand)	<i>Kluyvera ascorbata</i>	9
	<i>Aeromonas veronii</i>	1
Leeuwarden (buiswand)	<i>Citrobacter gillenii</i>	2
Nijlansdyk (sediment)	<i>Escherichia coli</i>	5
	<i>Citrobacter braakii</i>	2
	<i>Buttiauxella agrestis</i>	1
	<i>Rahnella aquatilis</i>	1
	<i>Kluyvera intermedia</i>	1

3.4 Legionella

De *Legionella*-aantallen van de verschillende bemonsterde locaties en matrices zijn weergegeven in Tabel 6. Er is op één locatie in één niche *Legionella* aangetroffen: 1000 kve/l in het drinkwater van Nijlansdyk. In de rest van de monsters lagen de legionella-aantallen onder de detectielimiet.

Tabel 6. De *Legionella* aantallen in het drinkwater, sediment en buiswand van de verschillende bemonsterde locaties.

	Drinkwater (kve/l)	Sediment 30 - 500 µm (kve/l)	Buiswand (kve/cm ²)
Medemblik	<33	<250	<0,31
Middenbeemster	<25	<500	<0,07
Capelle a/d IJssel	<25	<170	<0,18
Leeuwarden	<25	<100	<0,17
Nijlansdyk	1000	<100	<0,15

Van het positieve drinkwatermonster van Nijlansdyk zijn alle vijf kolonies met MALDI-TOF getypeerd als *Legionella anisa*.

4 Discussie

4.1 Niche *Aeromonas*, *Legionella* en bacteriën van de coligroep in het distributiesysteem

Het doel van deze studie was om te bepalen in welke niche van het distributiesysteem *Aeromonas*, *Legionella* en bacteriën van de coligroep aanwezig zijn. Om de resultaten van de verschillende niches goed met elkaar te kunnen vergelijken zijn de concentraties en aantallen omgerekend naar het aantal bacteriën, of hoeveelheid ATP, per m² buis (Tabel 7, Tabel 8). Omdat van de sedimentmonsters geen gegevens beschikbaar zijn over het totaal gespuide sedimentvolume zijn deze resultaten niet omgerekend naar per m² buis. Aangezien in vrijwel geen van de sedimentmonsters bacteriën van de coligroep of *Legionella* gevonden zijn, is het niet kunnen omrekenen van de resultaten niet problematisch. ATP en *Aeromonas* zijn wel aangetroffen in de sedimentmonsters, maar hoeveel dit is in verhouding tot de andere twee niches (drinkwater en buiswandbiofilm) kan niet berekend worden door het ontbreken van informatie over het sedimentvolume. Van ATP en *Aeromonas* is echter wel al het meest bekend in de literatuur (Tabel 7).

De ATP-concentratie in de buiswandbiofilm (229 - 2592 ng/m, Tabel 7) is hoger dan in het drinkwater en de concentratie voor de grondwatergebieden (Leeuwarden, Nijlansdyk) ligt in dezelfde range als in een eerdere studie in het distributiegebied van Oasen (582 – 1800 ng/m², (2)). Voor de oppervlaktewatergebieden (Medemblik, Middenbeemster, Capelle a/d IJssel) is de ATP-concentratie in de biofilm hoger dan de literatuur. In referentie (2) was de concentratie in het sediment min of meer vergelijkbaar met, of zelfs hoger dan in, de buiswandbiofilm. Deze studie en de eerdere studies bevestigen dus dat veruit de meeste actieve biomassa in de biofilm op de buiswand en sediment aanwezig is en dat de hoeveelheid actieve biomassa in het drinkwater slechts < 1 tot 10% van de totale biomassa in het distributiesysteem is.

Tabel 7. ATP concentraties in drinkwater, sediment en buiswandbiofilm van de verschillende bemonsterde locaties in ng/m² buisoppervlak. Ter vergelijking zijn resultaten uit de literatuur (distributiegebieden van Oasen) gegeven.

	ATP		
	Drinkwater (ng/m)	Buiswand (ng/m)	Sediment < 500 µm (ng/m)
Medemblik	83	283	
Middenbeemster	114	2592	
Capelle a/d IJssel	93	1212	
Leeuwarden	39	707	
Nijlansdyk	44	229	
van der Wielen, et al. 2016 (2)	38 - 47,5	196 - 606	
Liu, et al. 2014 (4)	28	454	
Liu, et al. 2014 (4)	27,55	529	
Liu, et al. 2014 (4)	23,75	545	
Liu, et al. 2017 (5)	82	808 - 2558	1900

Ook de *Aeromonas*-resultaten zijn zoals verwacht (2, 6): in het drinkwater zijn de aantallen ongeveer 1 – 3 Log₁₀ hoger dan in de biofilm (Tabel 8). Eerder onderzoek heeft echter wel laten zien dat in het distributiesysteem van een productielocatie van Oasen de *Aeromonas*-aantallen in het sediment, per meter buis, 2 Log₁₀ hoger ligt dan in

het drinkwater (5). Uit de resultaten van deze en die eerdere studie kan dus worden geconcludeerd dat meer dan 90 tot 99% van de *Aeromonas*-aantallen in het sediment aanwezig is, terwijl de aantallen in de biofilm op de leidingwand verwaarloosbaar zijn ten opzichte van de aantallen in sediment en drinkwater.

Tabel 8. Aantallen *Aeromonas*-bacteriën, bacteriën van de coligroep en *Legionella*-bacteriën in drinkwater, sediment en buiswandbiofilm van de verschillende bemonsterde locaties in kve/m² buisoppervlak.

	<i>Aeromonas</i>		Bacteriën van de coligroep		<i>Legionella</i>	
	Drinkwater (kve/m ²)	Buiswand (kve/m ²)	Drinkwater (kve/m ²)	Buiswand (kve/m ²)	Drinkwater (kve/m ²)	Buiswand (kve/m ²)
Medemblik	5,4x10 ⁵	<5,0x10 ²	<282	<500	<931	<3100
Middenbeemster	2,2x10 ⁶	2,7x10 ⁵	<2822	1800	<706	<700
Capelle a/d IJssel	>2,8x10 ⁶	5,0x10 ³	<28223	<30	<706	<1800
Leeuwarden	5,4x10 ⁵	6,7x10 ³	<282	70	<706	<1700
Nijlansdyk	1,5x10 ⁴	3,1x10 ³	<282	<20	28223	<1500

Er waren slechts een paar monsters positief voor bacteriën van de coligroep. Daarbij waren er twee van de vijf biofilmmonsters van de leidingwand positief en één sedimentmonster. De drinkwatermonsters waren alle vijf negatief. De locaties waar de buiswandbiofilm positief waren, waren andere locaties dan die waar het sediment positief was. Het lijkt er dus op dat bacteriën van de coligroep zowel in de buiswandbiofilm als sedimentbiofilm aanwezig kunnen zijn. Een betrouwbare uitspraak over de dominante niche(s) van bacteriën van de coligroep kan echter niet worden gedaan, omdat slechts een paar monsters positief waren.

Legionella (anisa) is slechts op één locatie aangetroffen, namelijk alleen in drinkwater. Op basis van dat ene positieve monster kan geen uitspraak worden gedaan over de dominante niche(s) voor *Legionella (anisa)*.

Door het lage aantal positieve monsters, kan niet betrouwbaar worden achterhaald wat de niche van *Legionella* en bacteriën van de coligroep in het distributienet is. Hoewel de afwezigheid van deze bacteriën gewenst is voor het distributiesysteem, maakt de huidige detectielimiet van de methoden het lastig om de niche van deze bacteriesoorten te bepalen. Bij het opzetten van het onderzoek is geprobeerd om de kans op positieve monsters te vergroten door monsternamelocaties te kiezen waar in het verleden vaker bacteriën van de coligroep en/of *Legionella* zijn aangetroffen. Helaas zijn deze bacteriën, ondanks de voorzorgsmaatregelen in dit onderzoek, niet of nauwelijks aangetroffen.

Om toch betrouwbaardere resultaten te krijgen over de niche van de bacteriën van de coligroep en *Legionella* in het distributienet zijn er een aantal mogelijkheden:

- Een groter volume aan spuiwater filtreren en analyseren alsook een groter oppervlakte van de buiswand swabben, zodat de detectiegrens van de methoden lager wordt. Daarmee is het misschien mogelijk om meer positieve monsters te krijgen. Een nadeel hiervan is echter dat buisuitnamen kostbaar zijn en veel mankracht vragen. Daarnaast bestaat er nog steeds een gerede kans dat de aantallen bacteriën van de coligroep en *Legionella* onder de detectiegrens blijven.
- Binnen een bepaalde periode op alle buisuitnamen van een productielocatie bacteriën van de coligroep, *Legionella* en eventueel *Aeromonas* te meten. Hierdoor komt er meer informatie beschikbaar over de natuurlijke aanwezigheid van deze bacteriën in de buiswandbiofilm. Echter, zoals eerder gemeld, buisuitnamen zijn kostbaar en vragen veel mankracht. Daarnaast worden ze niet altijd gecombineerd met spuiacties en drinkwaterbemonstering. Dit is wel nodig om de aantallen in de biofilm met de twee andere

niches te vergelijken. Nadeel van deze aanpak is ook dat er nog steeds een gereede kans is dat bacteriën van de coligroep en *Legionella* niet worden gedetecteerd.

- Een pilot distributiesysteem, inclusief sediment en een biofilm, gebruiken, waaraan verschillende soorten bacteriën van de coligroep en *Legionella* worden gedoseerd, waarbij het water wordt gerecirculeerd. Door de verschillende niches te bemonsteren kan in kaart worden gebracht waar de verschillende bacteriesoorten aanwezig zijn. Een dergelijk experiment zou bijvoorbeeld in het KWR In Vitro Distributiesysteem (KIVODIS) kunnen worden uitgevoerd, mits er ook sediment wordt toegevoegd aan het systeem.
- Groeiproeven met drinkwater en biofilm op leidingmateriaal, in een vergelijkbare opzet als met de BPP materialentest b.v. PVC of PE of met water en sediment in één fles. Door verschillende soorten bacteriën van de coligroep en *Legionella* te doseren, kan in de tijd worden gemeten of, en in welke niche, deze bacteriën groeien. In deze experimenten is geen continue verversing van het water en is er ook geen (door)stroming. Dit soort experimenten zijn in het verleden al met *Aeromonas*-bacteriën uitgevoerd en worden nu gedeeltelijk uitgevoerd in een ander deel van het project waartoe dit rapport behoort.

4.2 Typering bacteriën van de coligroep

In 2019 en 2020 is binnen de Contactgroep Biologie (COBIO) een lijst opgesteld met soorten van de bacteriën van de coligroep die zijn aangetroffen in drinkwatermonsters. In Tabel 9 zijn de 10% meest voorkomende soorten genoemd. Van de in deze studie aangetroffen bacteriesoorten staan er slechts twee (*Buttiauxella agrestis* en *Citrobacter gillanii*) op deze lijst. De andere soorten (*Citrobacter braakii*, *Escherichia coli*, *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera intermedia* en *Rahnella aquatilis*) staan niet op deze lijst.

Tabel 9. Bacteriesoorten van bacteriën van de coligroep die het vaakst in watermonsters zijn aangetroffen. Gegeven zijn de 10% meest aangetroffen soorten tijdens reguliere monsternamen of tijdens monsternamen na een verstoring. Tabel overgenomen uit (6).

	Regulier	Verstoring	Deze studie
<i>Buttiauxella agrestis</i>	X		X
<i>Citrobacter gillanii</i>	X	X	X
<i>Citrobacter freundii</i>	X	X	
<i>Enterobacter spp</i>	X		
<i>Enterobacter cloacae</i>		X	
<i>Hafnia alvei</i>	X	X	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	X	X	
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	X	X	
<i>Lelliottia amnigena</i>	X	X	
<i>Raoultella ornithinolytica</i>		X	
<i>Serratia spp</i>	X		
<i>Serratia ficaria</i>		X	
<i>Serratia fonticola</i>	X	X	
<i>Serratia liquefaciens</i>	X		
<i>Serratia marcescens</i>	X		

Van de in deze studie aangetroffen bacteriën van de coligroep worden *Citrobacter gillenii* en *Escherichia coli* beschouwd als van fecale herkomst. Daarbij wordt *C. gillenii* vaak aangetroffen in vissen, terwijl *E. coli* in feces van verschillende warmbloedige dieren voorkomt. De andere bacteriesoorten (*Buttiauxella agrestis*, *Kluyvera ascorbata* en *Kluyvera intermedia* en *Rahnella aquatilis*) zijn niet of heel sporadisch aangetroffen in humane feces en worden beschouwd als soorten die van nature in waterige milieus voorkomen (7-9). *Citrobacter braakii* komt zowel voor in het milieu als in humane feces, en is de enige van de aangetroffen bacteriesoorten die als beide kan worden beschouwd. Van al deze soorten is alleen van *E. coli* bekend dat bepaalde stammen pathogeen zijn, de andere soorten zijn slechts zeer sporadisch aangetroffen in patiënten of er is geen klinische informatie beschikbaar. Tot slot wordt *E. coli* tijdens drinkwatermonitoring gebruikt als indicator voor een fecale verontreiniging, aangezien dit organisme niet in staat is zich te vermeerderen in het Nederlandse drinkwatersysteem. Het aantreffen van *E. coli* in het sediment op locatie Nijlansdyk duidt er dus op dat hier een fecale verontreiniging heeft plaatsgevonden. Om na te gaan of de andere aangetroffen bacteriesoorten van de coligroep in staat zijn zich te vermeerderen in het drinkwatersysteem, zouden groeiproeven kunnen worden uitgevoerd.

5 Conclusies en aanbevelingen

5.1 Conclusies

De resultaten van dit onderzoek bevestigen de conclusie dat meer dan 90 tot 99% van de actieve biomassa zich in de biofilm op de leidingwand of het sediment bevinden, die op basis van eerder onderzoek is getrokken. De laagste microbiële activiteit vindt dus plaats in het drinkwater, waardoor het drinkwater geen goede indicator hoeft te zijn van de microbiële activiteit in een drinkwaterdistributiesysteem.

De resultaten van dit onderzoek bevestigen ook de conclusie dat *Aeromonas* geen niche heeft in de biofilm op de buiswand, vergelijkbaar met wat eerder is gevonden in een andere studie.

Door het lage aantal monsters waarin *Legionella* en/of bacteriën van de coligroep zijn aangetroffen, kan geen betrouwbare uitspraak worden gedaan over de niche van deze bacteriegroepen in het distributienet. Het lijkt er wel op dat bacteriën van de coligroep zowel hun niche in de buiswandbiofilm als in de sedimentbiofilm kunnen hebben.

De aangetroffen legionellabacteriën behoren tot de minder gevaarlijke soort *L. anisa*. De hoog virulente *L. pneumophila*, maar ook andere niet-gevaarlijke soorten, zijn niet aangetroffen.

Slechts twee soorten van de aangetroffen bacteriën van de coligroep (*Buttiauxella agrestis* en *Citrobacter gillenii*) staan in de 10% meest voorkomende soorten van de COBIO-lijst. Van de aangetroffen bacteriën van de coligroep worden alleen *Escherichia coli* en *Citrobacter gillenii* beschouwd als van fecale herkomst. De aanwezigheid van *E. coli* in het sediment van één van de onderzochte locaties duidt erop dat daar een recente fecale verontreiniging heeft plaatsgevonden.

5.2 Aanbevelingen

Het doel van het onderzoek (bepalen van de niche van *Aeromonas*, *Legionella* en/of bacteriën van de coligroep) in het distributienet is niet behaald. Er zijn verschillende opties om alsnog de niche te bepalen, elk met eigen voor- en nadelen:

- Een groter volume aan spuiwater en buiswandbiofilm analyseren, om zo mogelijk meer positieve monsters te krijgen. Een nadeel hiervan is echter dat buisuitnamen kostbaar zijn en veel mankracht vragen. Daarnaast bestaat er nog steeds een gerede kans dat de aantallen bacteriën van de coligroep en *Legionella* onder de detectiegrens blijven.
- Binnen een bepaalde periode op alle buisuitnamen van een productielocatie bacteriën van de coligroep, *Legionella* en eventueel *Aeromonas* meten. Hierdoor komt er meer informatie beschikbaar over de natuurlijke aanwezigheid van deze bacteriën in de buiswandbiofilm. Echter, zoals eerder gemeld, buisuitnamen zijn kostbaar en vragen veel mankracht. Daarnaast worden ze niet altijd gecombineerd met spuiacties en drinkwaterbemonstering. Dit is wel nodig om de aantallen in de biofilm met de twee andere niches te vergelijken. Nadeel van deze aanpak is ook dat er nog steeds een gerede kans is dat bacteriën van de coligroep en *Legionella* niet worden gedetecteerd.

- Een pilot distributiesysteem, inclusief sediment en een biofilm, gebruiken, waaraan verschillende soorten bacteriën van de coligroep en *Legionella* worden gedoseerd, waarbij het water wordt gerecirculeerd. Door de verschillende niches te bemonsteren kan in kaart worden gebracht waar de verschillende bacteriesoorten aanwezig zijn. Een dergelijk experiment zou bijvoorbeeld in het KWR In Vitro Distributiesysteem (KIVODIS) kunnen worden uitgevoerd, mits er ook sediment wordt toegevoegd aan het systeem.
- Groeiproeven met drinkwater en biofilm op leidingmateriaal, in een vergelijkbare opzet als met de BPP materialentest b.v. PVC of PE of met water en sediment in één fles. Door verschillende soorten bacteriën van de coligroep en *Legionella* te doseren, kan in de tijd worden gemeten of, en in welke niche, deze bacteriën groeien. In deze experimenten is geen continue verversing van het water en is er ook geen (door)stroming. Dit soort experimenten zijn in het verleden al met *Aeromonas*-bacteriën uitgevoerd en worden nu gedeeltelijk uitgevoerd in een ander deel van het project waartoe dit rapport behoort.

6 Referenties

1. Drinkwaterkwaliteit 2020. Inspectie Leefomgeving en Transport; Toezicht publieke instellingen/Bedrijven; 2020.
2. van der Wielen PWJJ, Lut MC. Distribution of Microbial Activity and Specific Microorganisms across Sediment Size Fractions and Pipe Wall Biofilm in a Drinking Water Distribution System. *Water Science and Technology: Water Supply*. 2016;16(4):896-904.
3. van der Wielen PW, van der Kooij D. Effect of water composition, distance and season on the adenosine triphosphate concentration in unchlorinated drinking water in the Netherlands. *Water Res*. 2010;44(17):4860-7.
4. Liu G, Bakker GL, Li S, Vreeburg JH, Verberk JQ, Medema GJ, et al. Pyrosequencing Reveals Bacterial Communities in Unchlorinated Drinking Water Distribution System: an Integral Study of Bulk Water, Suspended Solids, Loose Deposits, and Pipe Wall Biofilm. *Environ Sci Technol*. 2014;48(10):5467-76.
5. Liu G, Tao Y, Zhang Y, Lut M, Knibbe W-J, van der Wielen P, et al. Hotspots for Selected Metal Elements and Microbes Accumulation and the Corresponding Water Quality Deterioration Potential in an Unchlorinated Drinking Water Distribution System. *Water Res*. 2017;124:435-45.
6. van Bel N, Learbuch KLG. Bureaustudies naar de (groepen van) stoffen waarop *Aeromonas*, *Legionella* en coliformen groeien en parameters van biofilm groei. Nieuwegein: KWR; 2022. Report No.: BTO 2022.007.
7. Bergey. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*: Wiley Online Library; 2015.
8. Farmer JJ, Fanning GR, Huntley-Carter GP, Holmes B, Hickman FW, Richard C, et al. *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family Enterobacteriaceae: identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov. and *Kluyvera cryocrescens* sp. nov. in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1981;13(5):919-33.
9. Suleiman AKA, Medema GJ. Coliformen in drinkwater. Nieuwegein: KWR; 2020. Report No.: KWR 2020.093.

I Bemonsteringsprotocol

Monster	Bemonsteren	Opmerkingen
Watermonster bij de consument	4-5 liter	Nemen voor het spuien
Spuimonster	4-5 liter	Nemen voor buiswand uitname
Buissegment	0,5 meter	

Watermonsters (voor het spuien nemen)

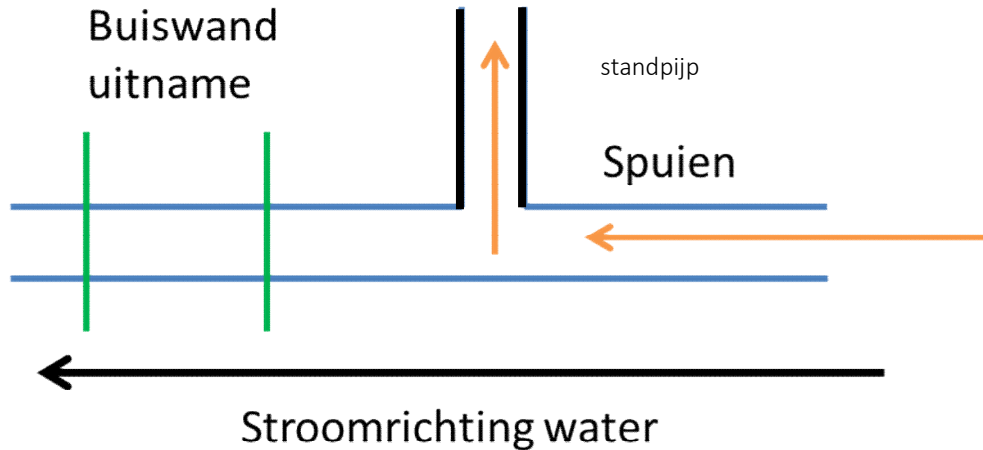
- Watermonster bij de consument (4-5 liter): als reguliere monstername, na doorstroming totdat de temperatuur 30 seconden stabiel is (temperatuur meten).
- Alle watermonsters gekoeld bewaren en vervoeren.

Spuimonster: door KWR monsternemer (voor buiswand uitname)

Let op: Standpijp en netten reinigen tussen monsternames

Spuisnelheid: 1 m/s

- Spuien volgens voorschrift.
- Zonder schoonwaterfront (= reinwater naar je toe trekken).
- Volumestroombepaling op 10% uitgang.
- Troebelheidsmeter en flowmeter gegevens aan KWR sturen.



Buiswand uitname: door waterbedrijf/aannemer

In principe is dit een standaardprocedure leidingreparatie. Het voornaamste verschil is het uitgebreider schoonmaken en schoonhouden van de leidingdelen. Dus extra voorzichtig werken en zorgen dat het uitgenomen leidingdeel de bodem niet raakt en niet in water ligt.

- Leiding wordt uitgegraven en rondom vrijgemaakt van de bodem.;
- Plastic bescherming plaatsen in de put, om de put schoon te houden.;
- Ontwateren: wanneer de leiding onder de grondwaterspiegel ligt wordt een ontwateringspomp gebruikt om de put vrij te houden van water.;
- Afsluiters voor en na uitnamepunt dicht/ druk eraf.;
- Buitenkant leiding wordt goed schoongemaakt.;
- Even aftekenen met een watervaste marker: wat is de stroomrichting of noord-zuid en wat is de bovenkant?;

- Zaag voor gebruik schoonmaken.;
- Leiding wordt ontwaterd door een sleufje te zagen in de buiswand. Zorg er voor dat de put vrij blijft van water.;
- Nadat het meeste water is weggelopen uit de leiding, wordt met twee zaagsneden, het stuk leiding van 0,5 m (maximaal de breedte van de koelbox!) uitgezaagd. Vermijd tijdens het verwijderen van het stuk leiding sterke mechanische trillingen en schokken. Ook mag het stuk leiding in- en uitwendig niet in aanraking komen met het bodemmateriaal of met het grondwater.
 - o Als de leiding water of de bodem heeft geraakt, is dit geen bruikbaar monster meer en zal de leidinguitname opnieuw dienen te gebeuren.
- Het leidingstuk wordt (zonder water) in een steriele zak gedaan en met een kabelbinder (tyrap) dichtgemaakt. Vervolgens wordt het geheel in nog een steriele zak gedaan en ook weer dicht gemaakt met een kabelbinder (tyrap). Dit is zodat er geen water van het ijs bij de leiding kan komen. Vervolgens wordt het geheel in de koelbox met ijs geplaatst.



Foto 1: Markering 110PVC

Foto 2: Sleufje om water weg te laten lopen. Dompelpomp in put en plastic bescherming om put schoon te houden.



Foto 3: Leiding wordt gezaagd, zorg voor ondersteuning zodat hij niet in het water valt.

Foto 4: Met moffen wordt het stuk leiding weer gerepareerd.



Foto 5: Buis in plastic in koelbox met ijs.