

**Bureaustudies naar de (groepen van) stoffen waarop  
*Aeromonas*, *Legionella* en coliformen groeien en parameters  
van biofilm groei**

BTO 2022.007

**Datum**

20 januari 2022

**Opdrachtgever**

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische  
Veiligheid

**Meer informatie**

Kimberly Learbuch MSc.  
T 030-6069599

**Auteurs**

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

**Opdrachtnummer**

402045-250

E [kimberly.learbuch@kwrwater.nl](mailto:kimberly.learbuch@kwrwater.nl)

**Kwaliteitsborger**

Paul van der Wielen

**Projectmanager**

Michiel Hootsmans

**Pagina**

1/32

## Inhoud

<b>1</b>	<b>Aanleiding</b>	<b>4</b>
1.1	Normoverschrijdingen van <i>Aeromonas</i> , bacteriën van de coligroep en <i>Legionella</i>	4
1.2	Conditie voor groei <i>Aeromonas</i> , bacteriën van de coligroep, <i>Legionella</i> en biofilmvorming	4
<b>2</b>	<b>Invloed van nutriënten op biofilmgroei</b>	<b>6</b>
2.1	Ontwikkeling biofilm	6
2.2	Nutriënten	7
2.2.1	Koolstof	7
2.2.2	Stikstof en fosfaat	8
2.2.3	Sporenelementen	8
2.3	Leidingmaterialen	8
2.4	Rol van biologische stabiliteit	9
2.5	Sediment	11
2.6	Conclusie	11
<b>3</b>	<b>Invloed van nutriënten op groei van bacteriën van de coligroep in drinkwatermilieus</b>	<b>12</b>
3.1	Soorten bacteriën van de coligroep in Nederlands en Vlaams drinkwater	12
3.2	Nutriëntengebruik door de vaakst voorkomende soorten van bacteriën van de coligroep	13
3.3	<i>Enterobacter cloacae</i>	15
3.4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
3.5	<i>Lelliottia amnigena</i>	15
3.6	<i>Citrobacter freundii</i>	16
3.7	<i>Serratia ficaria</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Serratia fonticola</i> en <i>Serratia marcescens</i>	16
3.8	Conclusies	17
<b>4</b>	<b>Invloed van nutriënten op groei van <i>Legionella</i> in drinkwatermilieus</b>	<b>18</b>
4.1	Levenscyclus en interactie protozoa	18
4.2	AOC	18
4.3	Leidingmateriaal	19
4.4	Metaalionen	19
4.5	Conclusie	20

<b>5</b>	<b>Invloed van nutriënten op groei van <i>Aeromonas</i> in drinkwatermilieus</b>	<b>21</b>
5.1	Opzet veelgebruikte experimenten	21
5.2	Groei in drinkwater, sediment en spuiwater	22
5.3	Koolstofbronnen	22
5.4	Stikstofbron: aminozuur, nitraat of ammonium	23
5.5	Groei in/op dierlijke organismen	24
5.6	Conclusie	26
<b>6</b>	<b>Referenties</b>	<b>27</b>

# 1 Aanleiding

## 1.1 Normoverschrijdingen van *Aeromonas*, bacteriën van de coligroep en *Legionella*

In het Drinkwaterbesluit in Nederland zijn diverse microbiologische parameters opgenomen om de microbiologische drinkwaterkwaliteit te borgen. Een deel van de microbiologische parameters zijn gerelateerd aan fecale verontreiniging en een ander deel aan microbiële groei in het drinkwatersysteem. Ten aanzien van de parameters die de microbiële groei in het drinkwatersysteem borgen, zijn de microbiologische parameters *Aeromonas* en bacteriën van de coligroep opgenomen in het Drinkwaterbesluit als bedrijfstechnische parameter. Ze hebben geen directe gezondheidskundige achtergrond, maar worden gebruikt om de integriteit en werking van de drinkwaterproductie en het distributienet te monitoren. *Aeromonas* wordt 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 vermeerderen in het drinkwatersysteem. De wettelijke norm voor bacteriën van de coligroep in drinkwater is 0 kve/100 ml.

Naast deze twee bedrijfstechnische microbiologische parameters, is ook *Legionella* als microbiologische parameter opgenomen in het Drinkwaterbesluit. De parameter *Legionella* heeft indirect een gezondheidskundige achtergrond omdat, naast minder gevaarlijke kweekbare *Legionella*soorten zoals *Legionella anisa*, ook *Legionella pneumophila* (de veroorzaker van de veteranenziekte) wordt bepaald. De wettelijke norm voor *Legionella* in het Drinkwaterbesluit is <100 kve/l.

Uit het laatst gepubliceerde jaarlijkse ILT-rapport 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 (5,1% in 2019), gevolgd door *Aeromonas* (1,5% in 2019). Overschrijdingen van de norm voor bacteriën van de coligroep zijn daarentegen relatief laag (0,06% in 2019). Absoluut gezien wordt de norm voor *Aeromonas* het vaakst overschreden van alle wettelijke parameters (120 in 2019), gevolgd door *Legionella* (86 in 2019) en bacteriën van de coligroep (35 in 2019). Uit deze resultaten blijkt dat op basis van de door de overheid aangewezen indicatorparameters voor de microbiologische kwaliteit van het drinkwater in het distributiesysteem, de mate van nagroei op enkele locaties in Nederland onvoldoende onder controle is.

## 1.2 Conditie voor groei *Aeromonas*, bacteriën van de coligroep, *Legionella* en biofilmvorming

Naast overschrijding van de wettelijke norm van de microbiologische parameters voor nagroei, is ook overmatige biofilmvorming op buiswand of sediment, of een biofilm met negatieve bijeffecten in het distributiesysteem onwenselijk. Biofilms spelen bijvoorbeeld een belangrijke rol bij nagroeiproblemen, zoals groei van opportunistische ziekteverwekkers (*L. pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus*) en esthetische klachten (waterpissebedden, geur/smaak, bruinwater). Daarnaast zou de biofilm ook indirect een rol kunnen spelen bij de overschrijdingen van bepaalde wettelijke parameters voor nagroei, omdat organismen zoals *Legionella* zich vermeerderen in protozoa die op de biofilm grazen of omdat ze kunnen groeien op hogere

organismen, zoals door Evides is aangetoond voor *Aeromonas* (1). Om de oorzaak van biofilmvorming en de normoverschrijding van de wettelijke parameters aan te kunnen pakken is het belangrijk om te achterhalen welke condities in het distributiesysteem verantwoordelijk zijn voor groei en biofilmvorming.

Voor *Legionella (pneumophila)* is bekend wat de minimale hoeveelheid biologisch afbreekbare stoffen (AOC;  $\geq 1 \mu\text{g C/l}$ ) moet zijn om groei plaats te kunnen laten vinden (2). *Aeromonas* en bacteriën van de coligroep groeien ook alleen bij voldoende nutriënten, waarbij er indicaties zijn dat hogere concentraties van afbreekbare stoffen nodig zijn voor groei van deze twee bacteriegroepen dan voor *Legionella*. Voor alle drie de microbiologische parameters is echter in meer of mindere mate onbekend op welke stoffen zij in het distributienet kunnen groeien.

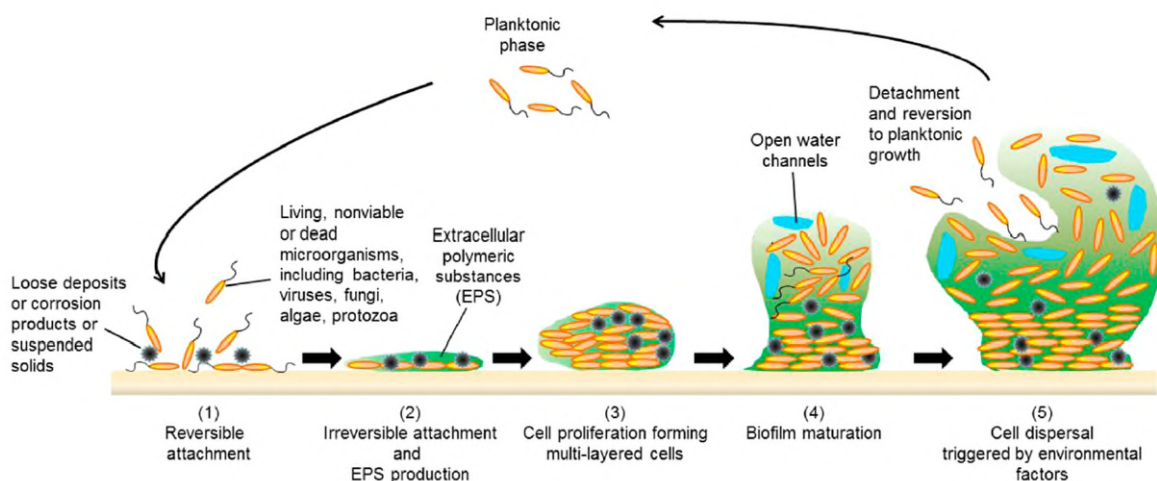
Het doel van deze bureaustudie is daarom om te achterhalen wat voor kennis in de wetenschappelijke literatuur aanwezig is over de invloed van nutriënten op biofilmgroei (op leidingwand en sediment) en groei van *Aeromonas*, *Legionella*, bacteriën van de coligroep in het drinkwatersysteem beïnvloeden.

## 2 Invloed van nutriënten op biofilmgroei

Biofilms spelen een belangrijke rol bij nagroeioproblemen, zoals groei van opportunistische ziekteverwekkers (*L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, *A. fumigatus*) en esthetische klachten (waterpissebedden, geur/smaak, bruinwater). Daarnaast zou de biofilm ook indirect een rol kunnen spelen bij overschrijdingen van bepaalde wettelijke parameters voor nagroei, omdat organismen zoals *Legionella* zich vermeerderen in protozoa die op de biofilm grazen (zie hoofdstuk 4) of omdat ze groeien op (stoffen vrijgekomen uit) ongewervelde dieren, zoals is aangetoond voor *Aeromonas* (zie hoofdstuk 5). Om de oorzaak van biofilmvorming en de normoverschrijding van de wettelijke parameters aan te kunnen pakken is het belangrijk om te achterhalen welke condities in het distributiesysteem verantwoordelijk zijn voor groei en biofilmvorming. Daarom is een bureaustudie uitgevoerd voor de parameters die biofilmgroei (op de buiswand en sediment) in het distributienet veroorzaken. We hebben hierbij gekeken naar studies in gechloreerd en niet gechloreerd drinkwater om een zo volledig mogelijk beeld te krijgen. Er is vooral gekeken naar (groepen van) stoffen die biofilmgroei op leidingwand en sediment veroorzaken.

### 2.1 Ontwikkeling biofilm

Groei van biofilm in een drinkwaterdistributiesysteem is een complex fenomeen, bestaande uit een aantal opeenvolgende fases (Figuur 1). Biofilmontwikkeling start over het algemeen met de formatie van een laagje bestaande uit macromoleculen (zoals polysachariden, lipiden, eiwitten en humuszuren die uit het drinkwater komen, uitgescheiden door micro-organismen of beide) op oppervlakten en achtereenvolgend initiële bevestiging en hechting van micro-organismen op het laagje (zie stap 1 in Figuur 1) (3). Dit wordt gevolgd door de vorming van microkolonies en de ontwikkeling van EPS (extracellulaire polymere substantie) (zie stap 2 in Figuur 1). Wanneer de biofilm volwassen is, kunnen stukken biofilm loslaten om ergens anders neer te strijken als microkolonie en zo begint de cyclus opnieuw (zie stap 5 in Figuur 1) (3). Ook kunnen losliggende planktonische cellen uit de biofilm losraken en weer opnieuw neerstrijken, wat ook leidt tot een nieuwe cyclus.



Figuur 1. Biofilm levenscyclus in drinkwaterdistributiesysteem (3)

## 2.2 Nutriënten

Cellen van (micro-)organismen bestaan voornamelijk uit macromoleculen (polymeren van monomeren) en water. De monomeren die cellen nodig hebben voor groei worden nutriënten genoemd. Verschillende organismen hebben verschillende nutriënten nodig, vaak in specifieke vorm. Niet alle nutriënten zijn nodig in dezelfde hoeveelheden. Nutriënten zoals koolstof, stikstof en fosfaat zijn essentieel voor microbiële groei en over het algemeen genomen hebben bacteriën van deze drie nutriënten dezelfde hoeveelheid nodig (4). Naast deze drie nutriënten, hebben bacteriën dus ook andere nutriënten nodig, bijvoorbeeld ijzer, mangaan, calcium, natrium, magnesium, koper, molybdeen, vitamines (5). Het verschilt echter per bacteriesoort hoeveel van deze zogenoemde sporenelementen het organisme nodig heeft. Zo is bijvoorbeeld waargenomen dat ijzer een belangrijk nutriënt is voor groei van *Legionella* (zie hoofdstuk 4).

### 2.2.1 Koolstof

Koolstof is essentieel voor alle micro-organismen, voor het maken van nieuw celmateriaal (5). In het drinkwaterdistributiesysteem wordt organisch koolstof dat door micro-organismen kan worden afgebroken normaal gekarakteriseerd als AOC (assimilable organic carbon), voor biologisch stabiel water wordt een AOC-concentratie aangehouden van < 10 µg/l (6). De AOC-P17/NOX methode bepaald deze hoeveelheid gemakkelijk afbreekbare organisch koolstof (AOC) in drinkwater. De *P. fluorescens* strain P17 stam is qua voeding een zeer veelzijdige bacterie en is in staat gebruik te maken van een breed scala van verbindingen bij zeer lage concentraties, en *Spirillum* sp. stam NOX is gespecialiseerd in het gebruik van carbonzuren (7). Naast de traditionele AOC-P17/NOX methode is recent de AOC-A3 methode ontwikkeld die de hoeveelheid biopolymeren in water bepaalt. De AOC-A3 methode maakt gebruik van *Flavobacterium johnsoniae* stam A3, die gespecialiseerd is in het omzetten van polysachariden en eiwitten (8-10).

Toevoeging van acetaat, een carbonzuur die gemakkelijke afbreekbaar is, aan het drinkwater van productielocatie Tull en 't Waal (1 µg C/L) laat zien dat de biofilmvorming sneller verliep en tot meer biofilm leidde dan bij drinkwater zonder toegevoegd acetaat (11). Deze waarneming is bevestigd in een latere studie (12). Sack et al. (12) heeft tevens gekeken naar de invloed van verschillende specifieke stoffen op biofilmgroei, door deze stoffen toe te voegen aan het drinkwater van productielocatie Tull en 't Waal en daarmee biofilmmonitoren te voeden. Uit deze studie volgde dat verschillende stofgroepen (carbonzuren, sachariden, polysachariden en eiwitten) biofilmvorming bevorderden en dat iedere stofgroep leidde tot een eigen specifieke soortensamenstelling in de biofilm. Meer specifiek werden acetaat als carbonzuur, maltose als sacharide, laminarine en amylopectine als polysachariden en gelatine en caseïne als eiwitten gedoseerd in de experimenten. Acetaat, maltose, laminarine, gelatine en caseïne werden door bacteriën in de biofilm omgezet en leidde dus tot biofilmgroei. Amylopectine werd door bacteriën in de biofilm gebruikt tijdens de stationaire [steady-state] fase alleen wanneer ook tegelijkertijd maltose werd toegevoegd, zonder maltosedosering leidde amylopectine niet tot biofilmgroei. Deze laatste waarneming laat zien dat de invloed van nutriënten op biofilmgroei complex kan zijn en dus niet alleen afhankelijk is van welk specifiek nutriënt aanwezig is, maar ook wat de gehele nutriëntensamenstelling in het water is. Naast de studie van Sack et al. (12) zijn er niet veel andere studies gevonden waarin de invloed van organische stoffen op biofilmvorming in drinkwatersystemen is onderzocht.

In andere ecosystemen (oppervlaktewater en bodems) is ook de invloed van andere stofgroepen op groei van micro-organismen onderzocht. Over het algemeen is daarbij gevonden dat onverzadigde alifatische verbindingen, zoals makkelijk afbreekbare koolhydraten, laag-moleculgewicht eiwitten en organische zuren, meer beschikbaar zijn voor microbiële degradatie dan de meer hydrofobe aromatische verbindingen (aromatische carbonzuren, fenolische stoffen en humuszuren) (3, 13-17). Het is aannemelijk dat dit ook geldt voor drinkwater.

### 2.2.2 Stikstof en fosfaat

Stikstof is een andere belangrijke nutriënt en is aanwezig in eiwitten, aminozuren en andere celbestanddelen. Het merendeel van de beschikbare stikstof voor micro-organismen in het milieu is aanwezig in een anorganische vorm: ammonium of nitraat. De meeste bacteriën zijn in staat om nitraat als enige stikstofbron te gebruiken, maar sommige bacteriën (bijvoorbeeld *Aeromonas*) gebruiken bij voorkeur ammonium (5, 18).

Fosfaat is ook een essentieel nutriënt in alle micro-organismen en is bijvoorbeeld nodig voor de synthese van aminozuren, fosfolipiden (onderdeel van het membraan van cellen), DNA, RNA en ATP (4, 5).

Over de invloed van verschillende organische en anorganische stikstof- en fosfaatverbindingen op biofilmgroei in drinkwatersysteem zijn geen gepubliceerde studies gevonden.

### 2.2.3 Sporenelementen

Ook beïnvloeden bepaalde sporenelementen zoals ijzer, mangaan en/of koper de biofilmontwikkeling in het drinkwaterdistributiesysteem (18, 19). IJzer speelt een belangrijke rol in de celademhaling (5). Bij de bereiding van drinkwater uit zuurstofloos grondwater wordt gereduceerd ijzer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) door beluchting omgezet in Fe-hydroxide.  $\text{Fe}^{3+}$ -zouten worden onder vorming van Fe-hydroxide gebruikt voor het coagulatieproces bij de bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater (20). In het distributiesysteem kan Fe-hydroxide worden gevormd bij de corrosie van gietijzeren leidingen. Fe-hydroxide is aanwezig in alle drinkwatertypen, maar in uiteenlopende concentraties ( $> 0,01$  mg Fe/L). De oplosbaarheid van Fe-hydroxide in water met een pH van ca. 8 is echter zeer gering ( $<< 1$   $\mu\text{g}$  Fe/L). Het colloïdaal opgeloste positief geladen Fe-hydroxide adsorbeert op de buiswand, associeert met negatief geladen NOM en biomassa, en vormt vlokjes die bezinken. Door deze eigenschappen speelt Fe-hydroxide in het drinkwater bij distributie een geheel andere rol dan Ca-, Mg- en Al-verbindingen, die beter oplosbaar zijn (20).

Onderzoek met CBM's heeft aangetoond dat de aanwezigheid van Fe-hydroxide de accumulatie van biomassa in de biofilm versterkt, waarschijnlijk omdat positief geladen ijzer bindt aan de negatief geladen biofilm en vervolgens moeilijk afbreekbare organische verbindingen (die ook negatief geladen zijn) aan de biofilm bindt. De in de biofilm gebonden moeilijk afbreekbaar organische verbindingen vormen vervolgens een extra nutriënt voor biofilmgroei. Aannemelijk is daarom dat verlaging van de Fe-concentratie in het drinkwater zal bijdragen aan een beperking van biofilmvorming in het distributiesysteem (20).

Volgens Slaats et al. (2004), is de opstapeling van ijzer en mangaan in distributiesystemen één van de belangrijkste oorzaken van verkleurd water (21). Onderzoek van Ginige et al. (19) heeft laten zien dat biofilm de neerslag van ijzer en mangaan op de wand van het leidingmateriaal vergemakkelijkt en dat een verhoging van de biofilmhoeveelheid wordt geassocieerd met een verhoging in de ijzer- en mangaanaccumulatie, in zowel het lab als in de praktijk. Dit is recent ook vastgesteld in Nederland voor drinkwater bereid uit grondwater en waaraan een lage concentratie mangaan is gedoseerd (22).

De invloed van andere sporenelementen op biofilmgroei in het drinkwaterdistributiesysteem is voor zover bekend (nog) niet onderzocht.

## 2.3 Leidingmaterialen

Naast stoffen die in water aanwezig zijn en biofilmgroei veroorzaken kunnen materialen ook een rol spelen bij biofilmgroei. De mate waarin groeibevorderende stoffen in materialen biofilmvorming veroorzaken wordt bepaald met de biomassaproductiepotentie (BPP)-test voor materialen. In de BPP-test wordt onder andere onderzocht hoeveel biofilm op materiaal wordt gevormd gedurende 16 weken incubatie onder semi-stagnante condities in



drinkwater. Van de resultaten van de BPP-test op materialen is bekend dat er verschillen zijn tussen de BPP van verschillende materialen (Tabel 1) (23, 24).

Bepaalde plastic en rubber materialen bevorderen biofilmgroei door de afgifte van biologisch afbreekbare stoffen zoals monomeren van het plastic of toevoegingen/additieven aan het plastic zoals weekmakers, antioxidanten (25). De concentratie afbreekbare stoffen zijn het hoogst in PVC-P, dan volgt PE en dan PVC-U (Tabel 1) (23, 24). Het is niet bekend op welke specifieke stoffen uit het plastic materiaal de bacteriën van de biofilm precies op groeien. Dergelijke informatie zou meer duidelijkheid geven over de precieze oorzaak van biofilmgroei door materialen en biedt mogelijkheden om (leiding)materialen te verbeteren. In een Deense studie is getracht deze specifieke stoffen te identificeren en in die studie zijn specifieke bestanddelen bestudeerd die uit PEX-materialen migreren door te achterhalen of die bestanddelen worden afgebroken in het drinkwater (26). Er konden negen specifieke stoffen worden geïdentificeerd die migreren van PE en PEX naar drinkwater. Slechts één van deze negen stoffen (4-ethylfenol) wordt echter significant afgebroken door micro-organismen in water gedurende het onderzochte tijdsbestek (2-4 weken), de overige acht stoffen werden nauwelijks afgebroken (26).

Tabel 1. De BPP-waarden van verschillende materialen getest met de BPP-test voor materialen bij KWR van 2006-2017.

Materiaal	n	Gemiddelde $\pm$ SD (pg ATP/cm <sup>2</sup> )
Glas	11	76 $\pm$ 29
Koper	4	254 $\pm$ 129
PVC-U/C	6	160 $\pm$ 104
PE-100	17	779 $\pm$ 327
PE-Xc	1	357 $\pm$ 136
PVC-P	11	19,865 $\pm$ 8,909

Naast de plastic en rubberen materialen kan ook leidingmateriaal van koper een invloed hebben op de biofilmgroei in een drinkwaterdistributiesysteem. Koper kan namelijk toxisch zijn voor micro-organismen (27), en studies die onderzocht hebben wat het effect is van koper op microbiële groei hebben aangetoond dat koperen materialen biofilmgroei kan onderdrukken (28, 29). Yu et al. (28) heeft dit gedaan door kopermateriaal in aanwezigheid van verschillende watertypes op labschaal te onderzoeken en het biofilmvormingspotentiaal te bepalen. Morvay et al. heeft de biofilm bepaald op koper in een systeem die de drinkwaterinstallatie van een gebouw simuleert (29). In de BPP-test voor materialen is ook koper onderzocht (Tabel 1) (23, 24), waaruit bleek dat biofilmvorming hoger lag dan met een inert materiaal, maar lager dan plastic en rubber materialen zoals PE/PEX en PVC-P. De verhoogde biofilmvorming kan worden veroorzaakt doordat koper positief geladen is en organisch stof bindt, dat als extra nutriënten voor micro-organismen in de biofilm zou kunnen dienen. Tot slot is gesuggereerd dat het toxische effect van koperen leidingmateriaal tijdelijk is, omdat na verloop van tijd een oxidatielaag van koper ontstaat, waardoor bacteriën niet/minder in contact komen met de vrije koperionen (23).

## 2.4 Rol van biologische stabiliteit

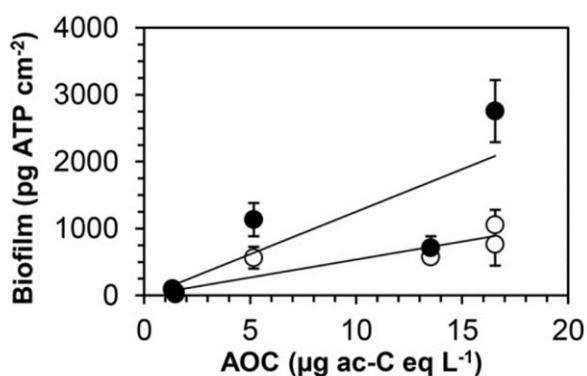
Naast stoffen die biofilmgroei veroorzaken zijn er ook nog andere factoren die van invloed zijn op biofilmgroei, zoals de biologische stabiliteit van het drinkwater (30). In 2017 is in samenspraak met de Nederlandse drinkwaterbedrijven een gezamenlijke definitie van biologische stabiliteit vastgesteld: 'Biologische stabiliteit beschrijft een drinkwatersysteem dat tot een zo min mogelijke biologische verandering leidt, zodat

gezondheidsrisico's en/of consumentenklachten, gerelateerd aan groei van (micro-)organismen, niet kunnen optreden.'

Een aantal methodes worden gebruikt om de biologische stabiliteit van drinkwater te bepalen. Oorspronkelijk waren het de volgende methoden: 1. Bepalen van de concentratie van gemakkelijke afbreekbaar organisch koolstof (AOC); en 2. De bepaling van de biofilmvormingssnelheid (BVS) met een biofilmmonitor. AOC-concentraties in het Nederlandse drinkwater variëren van  $< 1 \mu\text{g C/l}$  voor bepaalde drinkwatertypen bereid uit grondwater tot waarden van  $\sim 50 \mu\text{g C/l}$  voor drinkwatertypen geproduceerd door zuiveringen waar ozonatie gevolgd door actieve-koolfiltratie wordt gebruikt (6, 7, 31). BVS-waarden variëren van  $< 1 \text{ pg ATP cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (voor drinkwater bereid uit sommige oxische grondwatertypen) tot  $30 \text{ pg ATP cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (drinkwater bereid uit sommige anoxische grondwatertypen) (6, 7, 31). Met de biofilmmonitor kan naast de BVS ook de biofilmvormingspotentie (BVP) worden bepaald (10). De BVP ( $\text{pg ATP/cm}^2$ ) van water wordt gedefinieerd als de het 90-percentiel bepaald van de biofilmconcentraties gedurende de testperiode van ongeveer 150 dagen (10).

Uit onderzoek blijkt dat een significante correlatie wordt waargenomen tussen het AOC-gehalte en de BVP van het drinkwater (Figuur 2) (32). Op basis van de relatie tussen AOC en BVP kan worden geconcludeerd dat AOC in drinkwater een belangrijk nutriënt is voor biofilmvorming in het distributiesysteem. Het AOC-gehalte en samenstelling van het AOC-gehalte worden beïnvloed door de herkomst van het drinkwater (aard ruw water, type water behandeling en verblijftijd in het distributiesysteem) (32). De specifieke samenstelling van het AOC is echter moeilijk vast te stellen met de beschikbare methoden, omdat de concentraties van afzonderlijke organische stoffen in drinkwater zeer laag ( $\mu\text{g C/l}$  niveau) zijn. De bronnen van drinkwater in Nederland zijn wel onder te verdelen in vijf categorieën met bijbehorende AOC- en BVS-waarden: oxisch grondwater (AOC  $< 3 \mu\text{g C/l}$ , BVS  $< 3 \text{ pg ATP cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ), anoxisch grondwater (AOC  $< 5-7 \mu\text{g C/l}$ , BVS  $< 20 \text{ pg ATP cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ), oevergrondwater (AOC  $< 10 \mu\text{g C/l}$ , BVS  $< 20 \text{ pg ATP cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ), oppervlaktewater na duinfiltratie (AOC  $< 5 \mu\text{g C/l}$ , BVS  $< 10 \text{ pg ATP cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) en oppervlaktewater na reservoir (AOC  $< 20 \mu\text{g C/l}$ , BVS  $< 20 \text{ pg ATP cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) (7).

Uit de relatie tussen AOC en BVP blijkt tevens dat een bepaald AOC-gehalte op PVC-C ongeveer twee keer meer biofilmvorming geeft dan op glas (Figuur 2). Dit resultaat laat wederom zien dat afbreekbare stoffen in plastic materialen ook tot biofilmgroei leidt.



Figuur 2. Relatie tussen biofilmconcentraties op glas (open symbool) en PVC-C (gesloten symbool) in een biofilmmonitor en de AOC-concentratie. Error bars geven SD aan. Figuur afkomstig uit (33).

## 2.5 Sediment

Micro-organismen in het drinkwatersysteem zijn aanwezig in het drinkwater en in de biofilm op de leidingwand, maar ook op sedimentdeeltjes. De studie van Liu et al. (34) heeft laten zien dat de bacteriën in het drinkwater (inclusief opgeloste deeltjes) minder dan 2% bijdragen aan het totaal aantal bacteriën in het distributiesysteem. De bacteriën die zijn geassocieerd met biofilm op de leidingwand maken ongeveer 10 tot 40% van het totaal aantal bacteriën uit en de bacteriën geassocieerd met losse deeltjes maken ongeveer 50 tot 90% uit. Ook de studie van van der Wielen & Lut (35) heeft laten zien dat de meeste actieve biomassa voorkomt in de biofilm op de wand en de kleinste sediment fractie (<10 µm). Dit betekent dus dat sedimentdeeltjes ook een belangrijke niche zijn voor micro-organismen in het drinkwaterdistributiesysteem.

In onderzoek van Prest et al. (36) werd de invloed van de verblijftijd en hydraulica van drinkwater op verandering in waterkwaliteit onderzocht. Zij vonden dat het aantal deeltjes toenam met de afstand van de zuivering, evenals de grootte van de deeltjes. In de literatuur worden ook oorzaken besproken die een bron zijn voor sedimentvorming; zoals precipitatie van opgeloste componenten, resuspensie van eerder neergeslagen sediment, microbiële groei van de biofilm, corrosie van leidingmateriaal (37, 38). Andere oorzaken voor de vorming van sediment of neerslag van deeltjes zijn: onvolledige verwijdering van deeltjes uit het ruw water (39, 40), of het loslaten van fijne materialen uit filters in de zuivering (41-43), post coagulatie-flocculatie in het distributiesysteem (44, 45) en precipitatie van metaaloxides (46) of calciumcarbonaat (47).

In de literatuur zijn geen verdere studies aangetroffen waarin is beschreven welke stoffen of groepen van stoffen groei van biofilm op sediment veroorzaken. De hierboven genoemde mechanismen die tot deeltjesvorming in drinkwater kan leiden, hebben echter waarschijnlijk allemaal een andere invloed op de nutriëntenconcentratie en -samenstelling in de deeltjes/sediment. Het is dus te verwachten dat het achterhalen van de oorzaak van nutriënten in sediment een complex fenomeen is.

## 2.6 Conclusie

Uit de bureaustudie naar de invloed van nutriënten op de biofilmgroei volgt dat er niet veel bekend is over de invloed van verschillende organische en anorganische stikstof- en fosfaatverbindingen; de invloed van sporenelementen; welke specifieke stoffen uit plastic materiaal invloed hebben op biofilm groei. Wel is de invloed van toevoeging van het nutriënt acetaat onderzocht en dit liet zien dat de biofilmvorming sneller verliep en tot meer biofilm leidde. Naast stoffen die biofilmgroei veroorzaken (nutriënten, sporenelementen stoffen uit leidingmaterialen) zijn er ook nog andere factoren die van invloed zijn op biofilmgroei, zoals de biologische stabiliteit van het drinkwater.

Ook zijn er in de literatuur geen studies aangetroffen waarin is beschreven welke stoffen of groepen van stoffen groei van biofilm of sediment veroorzaken.

## 3 Invloed van nutriënten op groei van bacteriën van de coligroep in drinkwatermilieus

### 3.1 Soorten bacteriën van de coligroep in Nederlands en Vlaams drinkwater

Binnen de Contactgroep Biologie (COBIO) is een lijst opgesteld met soorten van bacteriën van de coligroep die in 2019 en 2020 in drinkwatermonsters zijn aangetroffen. Hierbij gaat het om soorten van bacteriën van de coligroep die in reguliere watermonsters (normale monitoringsprogramma, normale bedrijfsvoering) zijn aangetroffen en soorten die zijn aangetroffen bij verstoringen (werkzaamheden, ingrepen, calamiteiten, nieuwe leiding, etc.). De gegevens zijn afkomstig van De Watergroep, Water-link, Pidpa, PWN, WbG, WMD, Vitens en Oasen en zijn verzameld door HWL. Binnen de hier gerapporteerde bureaustudie zijn op basis van deze lijst de tien procent vaakst aangetroffen soorten van de bacteriën van de coligroep gekozen voor verder onderzoek naar welke nutriënten deze soorten gebruiken (Tabel 2). Vijftien verschillende soorten van bacteriën van de coligroep (zie Tabel 2) behoorden tot deze tien procent vaakst aangetroffen soorten. Voor deze vijftien soorten is dus gezocht in de literatuur naar informatie over groei van deze soorten in drinkwater en nutriënten waarop deze bacteriesoorten groeien.

Tabel 2. 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.

	Regulier	Verstoring
<i>Buttiauxella agrestis</i>	X	
<i>Citrobacter gillenii</i>	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	

### 3.2 Nutriëntengebruik door de vaakst voorkomende soorten van bacteriën van de coligroep

In het algemeen geldt dat de aantallen bacteriën van de coligroep in (gechloreerd) drinkwater stijgen als het AOC-gehalte toeneemt. Aanbevolen is daarom om het AOC-gehalte onder 50 µg/l te houden (48), een waarde die in Nederland nagenoeg altijd wordt gehaald. Andere studies in drinkwater met vrij chloor of monochloramine geven hetzelfde beeld, waarbij er meer positieve monsters voor en hogere aantallen van bacteriën van de coligroep worden aangetroffen bij AOC-gehalten boven 100 µg/liter (49). Daarnaast leidt het zo veel mogelijk vermijden van gietijzeren leidingen of gebruik van een fosfaatgebaseerde corrosieremmer ook tot lagere aantallen bacteriën van de coligroep.

Een algemene informatiebron over nutriënten waar specifieke bacteriesoorten op kunnen groeien, is Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (50). Van elf van de 15 soorten uit Tabel 2 is informatie over nutriëntenomzetting gevonden in Bergey's Manual en deze is verzameld en samengevat in Tabel 3. Over het algemeen is de groei op de geteste nutriënten vergelijkbaar tussen deze elf verschillende bacteriesoorten, waarbij is aangetoond dat bepaalde koolhydraten, aminozuren en suikeralcoholen door deze bacteriesoorten kunnen worden omgezet. Als in Tabel 3 staat aangegeven dat een bacteriesoort op een bepaald nutriënt kan groeien, betekent dit echter niet dat dit ook in drinkwater gebeurt. In het drinkwatermilieu spelen veel factoren een rol (bijvoorbeeld competitie met andere bacteriën, temperatuur, lage nutriëntconcentraties), waardoor het ook mogelijk is dat de bacteriesoort in een drinkwaterdistributienet niet of niet optimaal op deze nutriënt kan groeien. De overige vier soorten (*B. agrestis*, *L. adecarboxylata*, *R. ornithinolytica*, *H. alvei*) staan niet beschreven in Bergey's Manual en hier is verder geen informatie over gevonden.

Tabel 3. Groei van elf verschillende soorten bacteriën van de coligroep die het vaakst zijn aangetroffen in Nederlands drinkwater op verschillende nutriënten. Informatie is afkomstig uit (50). Tenzij anders aangegeven is het resultaat afkomstig van groei-experimenten bij 36°C gedurende 48 uur. Van elke bacteriesoort zijn meerdere stammen getest, dit wordt weergegeven met het resultaat.

	<i>B. agrestis</i>	<i>C. freundii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>H. alvei</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>L. adecarboxylata</i>	<i>L. amnigena</i> bg 1	<i>L. amnigena</i> bg 2	<i>S. ficaria</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. fonticola</i>	<i>S. marcescens</i>
5-Ketogluconate					+		-					
Adonitol										--		
Arginine dihydrolase	--	+-	++	--	--	--	--	+	--	--	--	--
Ascorbate (7 dagen)	--											
Benzoate										--		
Citrate	++	++	++	--	++	--	+-	++	++	++	++	++
Deoxyribonuclease, 25°C	--	--	--	--	--	--	--	--	++	+	--	++
D-Glucose, gas productie	++	++	++	++	++	++	++	++	--	+	+	+-
D-Lyxose					--		--					
D-Malate										++		
D-Sorbose					++		--					
Gentisate										--		
Gluconate			++								++	
KCN, groei	+	++	++	++	++	++	++	++	+-	++	+-	++
Lactose, zuur	++				++							
L-Fucose					++		--					

Tartraat	+-	++	+-	+-	++	+	--	--	-	+	+-	+
<u>Zuur productie:</u>												
α-Methyl-D-glucoside	--	--	+	--	++	--	+-	++	--	--	++	--
β-gentibiose					++							
Cellobiose	++	+-	++	-	++	++	++	++	++	--	--	--
D-Adonitol	--	--	-	--	++	++	--	--	--	--	++	+-
D-Glucose	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
D-melezitose					+-							
D-Mannitol	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
D-Mannose	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
D-Sorbitol	--	++	++	--	++	--	--	++	++	++	++	++
Dulcitol	--	+-	-	--	+-	+	--	--	--	--	++	--
D-Xylose	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	--
Glycerol	+-	++	+-	++	++	--	--	--	--	++	+	++
Lactose	++	+-	++	--	++	++	+-	+-	-	--	++	--
L-Arabinose	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	--
L-Rhamnose	++	++	++	++	++	++	++	++	+-	-	+	--
Maltose	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Melibiose	++	+-	++	--	++	++	++	++	+-	+	++	--
Mucate	++	++	+	--	++	+-	+-	++	--	--	--	--
myo-Inositol	--	--	-	--	++	--	--	--	+-	+-	+-	+
Raffinose	++	+-	++	--	++	+-	++	--	+-	+	++	--
Sallicin	++	--	+	-	++	++	++	++	++	++	++	++
Sucrose	--	+-	++	--	++	+-	++	--	++	++	-	++
Trehalose	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<u>Gebruik koolstofbron:</u>												
4-Aminobutyrate			+-									--
5-Aminovalerate			--									--
Acetaat	--	+	+	-	++	-	--	--	+-	+-	-	+-
Arginine			--									--
Capraat			--									--
Capronzuur			--									--
Caprylzuur/Octaanzuur			--									--
D-Dulcitol/D-Galactitol			--									++
Gentisate					++							
L-Fucose			--									--
Malonzuur	+-	-	+	+-	++	++	++	++	--	--	+	--
m-Hydroxybenzoate					++							
Pelargonzuur/Nonaanzuur			--									--
Tagatose			--									++
Tyrosine			--									a

--: 0 – 10% positief, -: 11-25% positief, +: 26-75% positief, ++: 76-89% positief, +++: 90-100% positief, blanco: geen informatie beschikbaar in (3).

Naast de gegevens uit Bergey's Manual is in enkele andere studies ook onderzocht wat de invloed van nutriënten was op groei van bepaalde soorten bacteriën van de coligroep in een aquatisch milieu. Hieronder worden de belangrijkste uitkomsten van die studies per soort/genus besproken.

### 3.3 Enterobacter cloacae

In een Duitse studie zijn groei-experimenten uitgevoerd in (ongechloreerd) drinkwater, synthetisch water (drinkwater gefiltreerd door een 0,2 µm filter met daaraan anorganische nutriënten, acetaat en een natuurlijke microbiële flora gedoseerd) en spuiwater (51). Aan deze watertypen is vervolgens onder andere *E. cloacae* toegevoegd. Bij 22°C kon *E. cloacae* groeien in drinkwater en synthetisch water, maar alleen in afwezigheid van andere (autochtone) micro-organismen. *E. cloacae* verloor dus de competitie om nutriënten van de natuurlijke bacteriepopulatie in drinkwater. Hetzelfde beeld is zichtbaar bij groeiproeven in spuiwater (inclusief meegekomen sedimentdeeltjes): in aanwezigheid van de natuurlijke bacteriepopulatie trad geen groei van *E. cloacae* op, na afdoding van de natuurlijke bacteriepopulatie was wel groei mogelijk tot ongeveer  $1 \times 10^7$ - $10^8$  kve/100 ml. Dezelfde resultaten werden ook gevonden voor andere bacteriën van de coligroep (waaronder *C. freundii*) en daarom werd geconcludeerd dat bacteriën van de coligroep niet in staat zijn te competieren om nutriënten in het drinkwater. Verder werd waargenomen dat een hogere acetaatconcentratie in het synthetische water de groei van *E. cloacae* verhoogde tot  $10^7$  kve/liter, maar deze aantallen werden ook bereikt in drinkwater zonder acetaatdosering. In de studie is ook gekeken naar groei van *E. cloacae* in een natuurlijke drinkwaterbiofilm (met continue doorstroming). *E. cloacae* werd in de biofilm aangetroffen wanneer de bacteriën ook aan het water werden gedoseerd. Na het stoppen van dosering van *E. cloacae* werden ze ook niet langer in de biofilm gedetecteerd.

In een andere studie werd waargenomen dat *E. cloacae* kan groeien in gedestilleerd water met 0,1 – 1,0 mg/l gistextract (groeisnelheid *E. cloacae*: 0,08 – 0,30 h<sup>-1</sup>). De hoogste groeisnelheid en celantallen werden bereikt met 1,0 mg/l gist extract (52).

### 3.4 Klebsiella pneumoniae

*Klebsiella pneumoniae* staat niet in de top 10% van de meest voorkomende soorten bacteriën van de coligroep, maar staat wel in de COBIO-lijst. Omdat met deze bacterie wel enkele relevante experimenten in drinkwatermilieus zijn uitgevoerd wordt *K. pneumoniae* hier toch kort besproken.

Groeixperimenten zijn uitgevoerd in filtraat van langzame zandfilters waaraan verschillende koolstofbronnen zijn gedoseerd ((53) en reviewed in (54)). Hieruit bleek dat *K. pneumoniae*, bij 15°C, alleen groeit op een mengsel van 18 koolhydraten of een mengsel van 18 aminozuren (1 µg-C/l per stof, in totaal 18 µg-C/l). Op individuele koolhydraten of aminozuren trad bij deze concentratie en omstandigheden geen groei op, net als op een mengsel van carbonzuren of aromatische zuren. Dosering van 25 µg-C/l van 23 individuele koolhydraten of aminozuren aan gepasteuriseerd filtraat laat wel groei zien (groeisnelheid: 0,04 – 0,145 h<sup>-1</sup>).

### 3.5 Lelliottia amnigena

Tijdens de isolatie en karakterisering van *L. amnigena* uit drinkwater in Duitsland is van meerdere stammen met biochemische testen bepaald welke nutriënten ze wel en niet om kunnen zetten (stammen 1-6 in). Voor een groot deel komt het nutriëntverbruik van de verschillende stammen van *L. amnigena* overeen, er zijn alleen enkele verschillen in het gebruik van lactose, salicine, maltitol, cis-aconitaat, L-fenylalanine, fenylacetaat, L-glutamaat-γ-3-carboxy-pNA, leucine arylamidase en fenylacetaatzuur (55). Deze testen zijn echter, net als in Bergey's Manual, niet uitgevoerd in een drinkwatermilieu. Daarnaast zijn sommige testen uitgevoerd om te achterhalen of fermentatie (anaerobe afbraak) van bepaalde verbindingen optreedt (wanneer wordt aangegeven dat is onderzocht of zuurvorming optreedt).

Tabel 4. Resultaten van fysiologische en biochemische testen op *L. amingena* (stammen 1-6) en *L. nimipressuralis* (stam 7) stammen. Tabel afkomstig uit Kämpfer, et al., 2018, (55).

Strains: 1, 6331-17<sup>T</sup>; 2, 6332-17; 3, 6333-17; 4, 6334-17; 5, 9827-07; 6, *L. amingena* CIP 104980<sup>T</sup>; 7, *L. nimipressuralis* CIP 103169<sup>T</sup>. All data from this study. All strains were positive for acid production from glucose, D-mannitol, salicin, L-arabinose, rhamnose, maltose, D-xylose, trehalose, cellobiose, melibiose and D-mannose; all strains are positive for the assimilation of trehalose, D-xylose, N-acetyl-D-galactosamin, N-acetyl-D-glucosamin, L-arabinose,  $\rho$ -arbutin, cellobiose, D-fructose, D-galactose, gluconate, D-glucose, D-mannose, maltose, melibiose, L-rhamnose, D-ribose, D-mannitol, acetate, citrate, fumarate, DL-lactate, L-malate, pyruvate, L-alanine, L-aspartate, L-proline and L-serine. All strains are positive for the hydrolysis of aesculin, pNP- $\beta$ -D-galactopyranoside, pNP- $\beta$ -D-glucopyranoside, pNP- $\beta$ -D-xylopyranoside, bis-pNP-phosphate, pNP-phenyl-phosphonate, pNP-phosphorylcholine and L-alanine-pNA. All strains are negative for acid production from dulcitol, adonitol, inositol, erythritol and D-arabitol. All strains are negative for the assimilation of adonitol, i-inositol, putrescine, propionate, trans-aconitate, adipate, 4-aminobutyrate, azelate, glutarate, DL-3-hydroxybutyrate, itaconate, mesaconate, oxoglutarate, suberate,  $\beta$ -alanine, L-leucine, L-ornithine, L-tryptophane, 3-hydroxybenzoate, 4- and hydroxybenzoate; all strains are negative for the hydrolysis of pNP- $\beta$ -D-glucuronide, 2-deoxythymidine-5'-pNP-phosphate and L-proline-pNA. All strains are positive for alkaline phosphatase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\beta$ -galactosidase, potassium nitrate, D-glucose, L-arginine, urea, aesculin ferric citrate, 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, N-acetyl-glucosamine, maltose, potassium gluconate, malic acid and trisodium citrate. All strains are negative for esterase (C4), esterase lipase (CB), lipase (C14), valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\alpha$ -fucosidase, L-tryptophane, gelatin (bovine origin), capric acid adipic acid. +, Positive; -, negative; v, variable among the strains; (+) weakly positive.

Characteristic	1-4	5	6	7
Acid produced from:				
Lactose	(+)*	-	-	-
Sucrose	-	-	-	+
Sorbitol	+	+	+	-
Raffinose	-	-	-	+
Methyl D-glucoside	+	+	+	-
Assimilation of:				
Sucrose	-	-	-	+
Salicin	+	-	+	+
Maltitol	+	-	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	-
cis-Aconitate	(+)	-	-	-
L-Histidine	+	+	+	-
L-Phenylalanine	+	+	-	-
Phenylacetate	+	+	-	-
Hydrolysis of:				
L-Glutamate- $\gamma$ -3-carboxy-pNA	+	+	-	+
Leucine arylamidase	v	+	+	(+)
Phenylacetic acid	+	+	-	-

\*Acid production of the four strains was weak and occurred after a prolonged incubation of 7 days.

### 3.6 Citrobacter freundii

De waarnemingen die voor *E. cloacae* werden gedaan met drinkwater in de Duitse studie (zie hoofdstuk 3.3 en referentie (51)), werden ook gedaan voor *C. freundii*. Dus ook *C. freundii* lijkt zich niet in drinkwater te kunnen vermeerderen wanneer een autochtone microflora aanwezig is. Daarnaast hebben andere studies laten zien dat *C. freundii* nitraat tot nitriet kan afbreken (onder anoxische condities in de bodem) (56) en dat het organisme glycerol kan omzetten (57), zoals ook is weergegeven in Bergey's Manual (zie Tabel 3). Deze laatste studie liet ook zien dat *C. freundii* niet in staat was om gelatine, zetmeel of lipiden af te breken.

### 3.7 Serratia ficaria, Serratia liquefaciens, Serratia fonticola en Serratia marcescens

Een studie heeft laten zien *S. marcescens* kan groeien onder aerobe condities in gedemineraliseerd water waaraan plastic is toegevoegd (maar zonder andere toevoegingen) maar waarin geen autochtone microflora aanwezig was (58). Tijdens de isolatie en karakterisering van meerdere *Serratia*-soorten uit drinkwater is met biochemische testen bepaald welke nutriënten de geïsoleerde *Serratia*-soorten wel en niet om kunnen zetten (Tabel 5). Voor deze bureaustudie gaat het alleen om de soorten *S. fonticola* (stam 2), *S. ficaria* (stam 3), *S. liquefaciens* (stam 5) en *S. marcescens* (stam 6). Voor een deel komt het nutriëntverbruik van de verschillende soorten overeen, er zijn wel



verschillen in het gebruik van L-ornithine, pyruvaat, inositol, L-rhamnose, sucrose, arbutine, cellobiose, D-galactose en D-xylose (Tabel 5 en (59)). Deze testen zijn echter, net als in Bergey's Manual, niet uitgevoerd in een drinkwatermilieu.

Tabel 5. Resultaten van fysiologische en biochemische testen op verschillende *Serratia*-stammen. Tabel afkomstig uit Kämpfer, et al., 2016 (10).

**Table 1.** Physiological/biochemical test results for strain 2015-2462-01<sup>T</sup> and closely related species of the genus *Serratia*

Strains: 1, 2015-2462-01<sup>T</sup>; 2, *S. fonticola* DSM 4576<sup>T</sup>; 3, *S. ficaria* CCUG 14507<sup>T</sup>; 4, *S. grimesii* CCUG 15721<sup>T</sup>; 5, *S. liquefaciens* CCUG 9285<sup>T</sup>; 6, *S. marcescens* CCUG 1647<sup>T</sup>; 7, *S. plymuthica* CCUG 14509<sup>T</sup>; 8, *S. proteamaculans* CCUG 14510<sup>T</sup>; 9, *S. quinivorans* CCUG 14187<sup>T</sup>; 10, *S. ureilytica* CCUG 50595<sup>T</sup>; 11, *S. entomophila* CCUG 55496<sup>T</sup>; 12, *S. odorifera* CCUG 14508<sup>T</sup>; 13, *S. rubidaea* CCUG 9286<sup>T</sup>. Data for taxa 1, 2, 3 and 6 are from this study, and are in agreement with those reported by Geiger et al. (2010). All other data are from Geiger et al. (2010). All strains were positive for utilization of D-glucose, D-mannitol, D-fructose, D-mannose and trehalose and were β-galactosidase-positive. All strains were negative for utilization of L-arginine, sodium thiosulfate, L-tryptophan, erythritol, glycogen and L-sorbose and were oxidase-negative. +, Positive; w, weakly positive; -, negative.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Urease	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Catalase	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Acetoin production	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Utilization of:													
L-Ornithine	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
Citrate	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Pyruvate	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Inositol	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
L-Rhamnose	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Sucrose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Arbutin	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Cellobiose	w	-	w	+	-	-	+	-	+	+	w	+	+
Aesculin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
D-Galactose	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+

### 3.8 Conclusies

Uit de bureaustudie naar de invloed van nutriënten op de groei van bacteriën van de coligroep in drinkwatermilieus volgt dat een (bepaald deel van) deze bacteriën in potentie een grote variëteit aan verschillende stoffen (koolhydraten, aminozuren, vetzuren) kan afbreken, maar dat slechts zeer beperkt onderzoek is gedaan naar vermeerdering in het drinkwaterecosysteem. De weinige gegevens die beschikbaar zijn over vermeerdering in het drinkwatermilieu laten zien dat onder normale condities vermeerdering in het drinkwater, spuiwater (sediment) of biofilm op de wand waarschijnlijk niet optreedt, omdat ze niet kunnen concurreren met de autochtone microflora (samengevat in Tabel 6, paragraaf 5.6). Het is daarbij echter belangrijk om op te merken dat dit niet is bepaald voor alle 15 soorten van de bacteriën van de coligroep die het vaakst worden aangetroffen in het Nederlandse en Vlaamse drinkwater. Doordat soorten van de bacteriën van de coligroep wel in lage aantallen worden aangetroffen in het drinkwater, zou groei misschien wel kunnen optreden bij verstoringen in het drinkwatermilieu.

## 4 Invloed van nutriënten op groei van *Legionella* in drinkwatermilieus

Er zijn meer dan 60 verschillende *Legionella*-soorten beschreven in literatuur, waarvan ongeveer 70 verschillende serotypen. In drinkwater komen meerdere Legionellasoorten voor (review in (60)). Aangezien *L. anisa* bij lagere temperaturen in drinkwatersystemen kan groeien dan *L. pneumophila* (61-63), wordt in drinkwater meestal *L. anisa* aangetroffen en in mindere mate de gevaarlijkere soort *L. pneumophila* (64). Onder de juiste omstandigheden kan ongeveer de helft van deze soorten een Legionellapneumonie (ook wel veteranenziekte genoemd) veroorzaken. De meeste ziektegevallen worden echter veroorzaakt door *L. pneumophila* (reviewed in (65)) en daarom is het grootste deel van het wetenschappelijke Legionellaonderzoek op deze soort gericht. Vanwege dit gebrek aan beschikbare informatie over andere Legionellasoorten wordt in onderstaande beknopte bureaustudie naar nutriënten die *Legionella* voor groei kan gebruiken vooral *L. pneumophila* beschreven en niet of nauwelijks andere Legionellasoorten.

Nutriënten voor groei van *Legionella* in het drinkwatermilieu kunnen van verschillende bronnen afkomstig zijn, bijvoorbeeld uit het ruw water of sediment, of stoffen kunnen beschikbaar komen uit het leidingmateriaal. Daarnaast is gebleken dat het risico op aantreffen van *Legionella* hoger is bij hogere temperaturen en stilstaand water. Bij stilstaand water in de binnenhuisinstallatie of distributienet stijgt de concentratie stoffen die uit de leiding in het water lekt en is de kans groot dat de temperatuur stijgt. Daarnaast krijgen bacteriën meer tijd om de nutriënten die in drinkwater aanwezig zijn af te breken, dan wanneer het water met deze nutriënten langs stroomt.

### 4.1 Levenscyclus en interactie protozoa

Legionellabacteriën komen in het algemeen vooral voor in nutriëntrijk water. In de nutriëntarme omgeving van drinkwater kan *L. pneumophila* niet als losse bacteriecel succesvol de competitie aangaan met andere oligotrofe bacteriën (66). In plaats daarvan vermenigvuldigt *Legionella* zich in verschillende soorten protozoa (67), waaronder *Vermamoeba* en *Acanthamoeba* (68-70). Zo overleeft *L. pneumophila* langer in steriel drinkwater als ook de protozo *Acanthamoeba polyphage* aanwezig is (65) en zijn *L. bozemanii*, *L. anisa*, *L. pneumophila* en *L. longbeachae* aangetroffen in de protozo *Tetrahymena pyriformis* (71). In amoeben is de concentratie nutriënten hoog waardoor *Legionella* zich goed kan vermenigvuldigen in gastheerprotozoa, omdat het de afbraakmechanismen van sommige gastheerprotozoa kan omzeilen. Door deze vermenigvuldiging in bepaalde amoeben, nemen de Legionellacellen in een gastheerprotozo toe tot op een gegeven moment het aantal Legionellabacteriën te hoog is, waardoor de protozo openbarst en de Legionellabacteriën vrijkomen in het drinkwater. *Legionella* kan vervolgens weer aan de biofilm binden waar ook de protozoa zijn die op biofilm en bacteriën grazen en zo *Legionella* binnenkrijgen, waarmee de cirkel rond is. Omdat *Legionella* opgelost organisch koolstof in drinkwater meestal niet direct als voedingsstof gebruikt, maar nagenoeg altijd in protozoa groeit, is voor groei van *Legionella* ook van belang of, welke en hoeveel protozoa aanwezig zijn in het distributienet.

### 4.2 AOC

In experimenten bij KWR met de biofilmmonitor is gebleken dat het aantal (kweekbare) *L. pneumophila* bacteriën gecorreleerd is aan de biofilmconcentratie (2, 72). En aangezien de biofilmconcentratie gecorreleerd is aan de AOC-

concentratie van drinkwater (2) is het aantal Legionellabacteriën indirect gecorreleerd aan de AOC-concentratie van het drinkwater. Op basis van experimenten waarvoor RO-water is gebruikt waaraan AOC is gedoseerd, is bepaald dat voor groei van *L. pneumophila* in het drinkwatermilieu (geproduceerd uit oppervlaktewater via oeverfiltratie en reverse osmose) minimaal een biofilm van 50 µg ATP/cm<sup>2</sup> nodig is en AOC-concentraties boven de 1 µg C/l moeten zijn. In de meeste distributienetten is de AOC-concentratie van het drinkwater hoger dan deze drempelwaarde, waardoor de eerste vereiste voor groei van *Legionella* vaak al aanwezig is. In een studie waarin warmtewisselaars werden gesimuleerd was het aantal *L. pneumophila* echter niet gecorreleerd met de TOC-concentratie (TOC in de vorm van geozoniseerde fulvinezuren [een belangrijk bestanddeel van humus]). Naast het gehalte en de samenstelling van het organisch koolstof zijn ook andere omgevingsfactoren (stilstaand water, aanwezigheid protozoa, leidingmateriaal, etc) belangrijk voor groei van *Legionella* (73).

### 4.3 Leidingmateriaal

De rol van stilstaand water en leidingmateriaal blijkt ook uit onderzoek waarin een drinkwaterinstallatie van een gebouw werd nagebootst (23). Hierin werd o.a. gevarieerd met leidingmateriaal, stilstand en doorstroming. Bij lage AOC-concentraties (<10 µg C/l, temperatuur: 25 – 35°C) nam *Legionella spp.* toe tot 1500 kve/l (mediaan, koperen leidingen) of 4300 kve/l (mediaan, RVS of PE-X leidingen). De aantallen Legionellabacteriën in de biofilm komen overeen met de hoeveelheid biofilm: de hoogste biofilmconcentratie (PE-X, mediaan 1810 pg ATP/cm<sup>2</sup>) had ook de hoogste *Legionella*-aantallen (mediaan: 3700 kve/cm<sup>2</sup>). De ATP-concentraties waren vergelijkbaar tussen RVS (mediaan: 635 pg ATP/cm<sup>2</sup>) en koper (mediaan: 720 pg ATP/cm<sup>2</sup>), maar de antimicrobiële werking van koper op *Legionella* blijkt uit de lagere *Legionella*-aantallen op koperen leidingen (mediaan: 40 kve/cm<sup>2</sup>) vergeleken met RVS (mediaan: 1020 kve/cm<sup>2</sup>). Daarnaast bleek het spoelen van de leidingen met 70°C tijdelijk voor een sterke toename in ATP en *Legionella* (>10<sup>7</sup> kve/l) te zorgen. Na start van doorstroming met normaal drinkwater daalde de *Legionella*-aantallen weer. *Legionella* kan dus groeien in drinkwater, of de biofilm, bij een lage AOC-concentratie. De dode biomassa die ontstaat door het spoelen met heet water zorgt voor een grote hoeveelheid beschikbare nutriënten wat (indirect) tot groei van *Legionella* kan leiden.

### 4.4 Metaalionen

De relatie tussen groei van *L. pneumophila* en metaalionen (bijvoorbeeld magnesium, mangaan, koper ijzer, zink, calcium) is meestal niet duidelijk, of resultaten van verschillende studies spreken elkaar tegen. Voor veel metaalionen lijkt het dat lage concentraties (< 1 – 10 mg/l) groei van *Legionella* stimuleren, maar dat te hoge concentraties (> 1 – 10 mg/l) toxisch zijn en juist groei tegengaan of *Legionella* afdoden (74).

Het enige metaalion waarvan uit de meeste studies blijkt dat het nodig is voor groei van *L. pneumophila* is ijzer. Zo correleert de concentratie ijzer in warmwatersystemen (hotels en private woningen) met *L. pneumophila* aantallen (75), al is tijdens onderzoek bij 15 verschillende ziekenhuizen geen relatie tussen ijzer en *L. pneumophila* aangetroffen (76). Hogere ijzerconcentraties verhogen de infectiviteit (77, 78), groei (tot 25 – 50 mg ijzer/l in warmwater tanks (74)) en virulentie (74, 79) van *Legionella*.

Net als andere micro-organismen heeft *Legionella* ijzer nodig voor de opbouw van celmateriaal. Normaliter produceren micro-organismen chelatoren (eiwitten die ijzer kunnen binden) zodat ze voldoende ijzer uit de omgeving kunnen opnemen. Bij *Legionella* lijkt het erop dat ze deze chelatoren niet kunnen produceren en daardoor meer afhankelijk zijn van de vrije ijzerconcentratie in de omgeving. Daarom zijn in vergelijking met andere organismen mogelijk hogere ijzerconcentraties nodig voor groei van *Legionella*.

In groeiproeven met *L. pneumophila* in synthetisch medium was een lage ijzerconcentratie van 0,3 – 1,0  $\mu\text{M}$  voldoende om *L. pneumophila* te kweken en de kweek in stand te houden, het aantal Legionellacellen daalt echter wel met ongeveer 40% (74). Bij lage ijzerconcentraties neemt de efficiëntie van het ijzermetabolisme toe. Voor optimale groei was 3,3  $\mu\text{M}$  ijzer nodig, al varieerde dit tussen de 3 en 20  $\mu\text{M}$  ijzer afhankelijk van de gebruikte *L. pneumophila* stam en de studieopzet (80, 81). Onder groeicondities met een lage ijzerconcentratie was het aminozuur serine de voornaamste koolstof- en energiebron (13,85 mM), maar ook andere aminozuren werden in beperkte mate gebruikt. Bij hogere ijzerconcentratie werd serine geheel verbruikt, maar werden ook andere aminozuren gebruikt. Tyrosine was hierbij het volgende groeilimiterende nutriënt (74). Alleen proline (0,9 mM) werd volledig gebruikt en de concentratie daalde tot onder de detectielimiet. *L. pneumophila* is dus in staat zich direct te vermeerderen op een aantal aminozuren, maar alleen wanneer de concentraties hoog zijn. In drinkwater worden dergelijke hoge concentraties niet waargenomen, waardoor groei van *L. pneumophila* vrijwel alleen plaatsvindt in protozoa.

Koper is voor de meeste micro-organismen toxisch, wat ook geldt voor Legionellabacteriën zoals hierboven is beschreven. *L. pneumophila* stammen die uit de biofilm van een warmwatersysteem van een ziekenhuis zijn geïsoleerd waren echter minder gevoelig voor koper (82). *L. pneumophila* kan zich dus aanpassen aan hogere koperconcentraties en zo minder gevoelig worden voor de toxische effecten.

Voor groei van *L. anisa* in nagebouwde binnenhuisinstallaties zorgt de aanwezigheid van klein stukjes roest (concentratie ijzer in water: gemiddeld 0,09 – 0,12 mg/l) voor hogere *Legionella*-aantallen in het water met een kraan van RVS of messing (legering van koper en zink) dan wanneer er geen roest aanwezig is (83). Daarnaast zijn de aantallen, en vooral het percentage positieve monsters, hoger bij messing dan op RVS. Zowel het materiaal van de kraan als de aanwezigheid van roest beïnvloedt dus de aantallen *Legionella* in het water.

## 4.5 Conclusie

De invloed van verschillende nutriënten op groei van *L. pneumophila* in het drinkwatersysteem is redelijk goed bekend en daarbij is duidelijk dat vermeerdering in protozoën het belangrijkste is (samengevat in Tabel 6, paragraaf 5.6). Doordat deze protozoën op biofilm grazen, lijkt het dus voor *L. pneumophila* eerder van belang om vast te stellen wat de invloed van nutriënten is op biofilmvorming, wat is beschreven in hoofdstuk 2. Nederlandse drinkwatermonsters die genomen zijn aan de koudwaterkraan in de keuken en die positief zijn voor kweekbare *Legionella* zijn echter meestal positief voor andere *Legionella*-soorten dan *L. pneumophila*. Gegevens over de invloed van nutriënten en/of protozoën op de vermeerdering van die *Legionella*-soorten in het drinkwatermilieu zijn echter maar zeer sporadisch beschikbaar.

## 5 Invloed van nutriënten op groei van *Aeromonas* in drinkwatermilieus

De watertemperatuur en het soort en de hoeveelheid nutriënten in het drinkwater van het distributienet spelen een belangrijke rol bij de toename van *Aeromonas*-aantallen in het drinkwater. Zo is uit verschillende distributiegebieden bekend dat de *Aeromonas*-aantallen (langzaam) stijgen als de temperatuur boven de 7 à 8°C uitkomt, dit is ongeveer vanaf april/mei. Maar in de nazomer zijn de watertemperaturen nog gedurende lange tijd boven de 15°C, terwijl de *Aeromonas*-aantallen dan al dalen in distributiesystemen die worden gevoed met drinkwater bereid uit oppervlaktewater (persoonlijke communicatie Evides en Waternet). Niet alleen de watertemperatuur beïnvloedt dus groei van *Aeromonas*, maar ook andere factoren (waaronder nutriënten) spelen een rol en de invloed daarvan varieert gedurende het jaar.

Groei van *Aeromonas* in (Nederlandse) drinkwatermilieus is de laatste jaren uitgebreid onderzocht door Evides en KWR. Internationaal is echter niet tot nauwelijks onderzoek beschikbaar over de groeikarakteristieken van *Aeromonas* in drinkwater, omdat *Aeromonas* in andere landen geen wettelijke parameter voor de microbiologische waterkwaliteit is. In deze beknopte bureaustudie zijn voornamelijk studies gebruikt waar de groei van *Aeromonas*-bacteriën is onderzocht in niet-gechloreerde drinkwatermilieus, zoals we die in Nederland hebben.

### 5.1 Opzet veelgebruikte experimenten

De meeste informatie over de groeikarakteristieken van *Aeromonas* en gebruik van nutriënten door *Aeromonas* is afkomstig uit *Aeromonas*-groeiproeven die in het laboratorium zijn uitgevoerd. In deze groeiproeven wordt aan drinkwater een fosfaatbron (1,6 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/liter), stikstofbron (0,1 mg NO<sub>3</sub>-N/liter eventueel gecombineerd met 0,1 mg NH<sub>4</sub>-N/liter) en een variërende koolstofbron toegevoegd. Dit zijn zuivere oplossingen van bijvoorbeeld aminozuren, vetzuren, suikers of andere moleculen met koolstofatomen. Maar er zijn ook niet nader gedefinieerde koolstofbronnen toegevoegd, waaronder bijvoorbeeld sediment en ongewervelde dieren. Hierbij wordt dus niet alleen een soort koolstofbron gedoseerd, maar juist meerdere gemakkelijk en moeilijk afbreekbare koolstofbronnen. Daarnaast worden bijvoorbeeld ook stikstof, fosfor en andere potentiële nutriënten gedoseerd.

Vervolgens wordt een ent van *Aeromonas*-bacteriën (één enkele soort of een mengsel van soorten geïsoleerd uit drinkwaterdistributiegebieden) toegevoegd en wordt in de tijd gemeten hoeveel *Aeromonas*-bacteriën er aanwezig zijn in het water. Het drinkwater kan hierbij afkomstig zijn van verschillende distributienetten waar tussen de watersamenstelling verschilt. Door het drinkwater wel of niet te pasteuriseren kan worden bepaald of *Aeromonas* onder ideale omstandigheden in staat is een bepaalde stof als koolstof- en energiebron te gebruiken (competerende micro-organismen afwezig) of dat het dit ook kan als er wel competerende micro-organismen aanwezig zijn. Voor de eerste vraag wordt het drinkwater gepasteuriseerd om de autochtone microbiële populatie af te doden. Voor de tweede vraag wordt het drinkwater niet gepasteuriseerd zodat er een diverse microbiële populatie aanwezig is. Deze microbiële populatie verbruikt mogelijk dezelfde nutriënten als *Aeromonas* waardoor ze om dezelfde koolstof- en energiebronnen competeren en zo elkaars groei kunnen beïnvloeden.

De samenstelling van het drinkwater en daarmee soort en concentratie van aanwezige voedingsstoffen staat onder invloed van het seizoen (9, 84). Dit speelt vooral bij productielocaties die oppervlaktewater gebruiken als ruwwaterbron voor de drinkwaterbereiding. Het seizoen beïnvloedt overigens niet alleen de watersamenstelling,

maar ook de microbiële populatie. Experimenten met ongepasteuriseerd drinkwater afkomstig uit verschillende distributiegebieden, waaronder *Aeromonas*-groeiproeven, kunnen daarom voor wisselende resultaten zorgen. Seizoensvariatie en andere condities kunnen bijvoorbeeld de watersamenstelling of andere factoren beïnvloeden waardoor *Aeromonas* in het voordeel is, terwijl op een ander moment *Aeromonas* in het nadeel is en niet of nauwelijks zal kunnen groeien.

## 5.2 Groei in drinkwater, sediment en spuiwater

In het distributienet komen *Aeromonas*-bacteriën voornamelijk voor in het sediment en in mindere mate in drinkwater. *Aeromonas* is nagenoeg afwezig in de buiswandbiofilm (85, 86). De *Aeromonas*-populatie verschilt in soortensamenstelling tussen verschillende distributiegebieden, maar dit is niet te relateren aan de AOC-concentratie of aan het aantal normoverschrijdingen van dat gebied (87). Testen laten zien dat de verschillende soorten grotendeels dezelfde nutriënten gebruiken voor groei (87).

Naast drinkwater komen *Aeromonas*-bacteriën ook voor in mineraalwater (fleswater) en kunnen hierin groeien (in competitie met de autochtone microbiële populatie) bij 10 en 20°C, maar groei is traag (88). In 28 dagen groeien ze 1-2 log bij beide temperaturen, waarna de bacteriën weer afsterven. Na dosering van *Aeromonas hydrophila* is de groei hoger (2-3 log toename). Deze groei kan echter niet worden gecorreleerd aan een bepaalde koolstofbron aangezien in deze studie alleen informatie is gegeven over de mineralensamenstelling en -concentratie, maar niet over de koolstofconcentratie. Een te hoge mineraalconcentratie (2297 mg/liter) geeft in deze studie minder *Aeromonas*-groei dan lagere mineraalconcentratie (133 en 597 mg/liter).

*Aeromonas*-groeiproeven in drinkwater zonder extra koolstofbron, maar wel in competitie met de autochtone microbiële populatie, laten zien dat *Aeromonas* hierin meestal niet kan groeien. In biologisch stabiel drinkwater van Tull en 't Waal (geproduceerd uit grondwater, (87)) en Scheveningen (geproduceerd uit oppervlaktewater na duinpassage, (89)) vindt geen groei van *Aeromonas* plaats. In minder biologische stabiel drinkwater van Berenplaat, Kralingen, Braakman en Baanhoek (op deze vier locaties geproduceerd uit oppervlaktewater na verblijf in reservoir) groeit *Aeromonas* slechts in 10 – 15% van de groeiproeven en is de groei beperkt (87). Ondanks de lagere biologische stabiliteit van het drinkwater en dus de aanwezigheid van hogere concentratie nutriënten lijkt het dat *Aeromonas* meestal niet of amper kan groeien in drinkwater, dus in aanwezigheid van een competerende autochtone flora, en zonder toevoeging van een koolstofbron.

In spuiwater, of drinkwater waaraan sediment is toegevoegd, neemt *Aeromonas* in alle gevallen wel toe (1, 90). De mate waarin verschilt wel per distributiegebied: in spuiwater uit het distributiegebied van Berenplaat en Kralingen is de groei beperkt (0 - 1,5 log), terwijl in spuiwater uit het distributiegebied van Braakman *Aeromonas* met 1,5 - 3 log kan toenemen (1). Hierbij is soms een onderscheid zichtbaar in de groeirespons op niet gefiltreerd spuiwater, waarin deeltjes van alle grootten aanwezig zijn, en gefiltreerd spuiwater waarin alleen deeltjes kleiner dan 30 µm aanwezig zijn. Omdat de sedimenthoeveelheden varieerden tussen de verschillende spui fracties is niet goed te achterhalen of de verschillen in groei veroorzaakt worden door i) variatie in de hoeveelheid sediment in het spuiwater, of ii) door de samenstelling van de verschillende sedimentfracties. In deze studie is niet verder onderzocht welke stoffen verantwoordelijk zijn voor groei van *Aeromonas*.

## 5.3 Koolstofbronnen

Een aantal studies heeft gekeken naar de groei van *Aeromonas* op individuele of mengsels van koolstofbronnen in gepasteuriseerd drinkwater (1, 89, 91, 92).

In gepasteuriseerd drinkwater met een hoge substraatconcentratie (1 mg substraat-C/liter) kan *Aeromonas* groeien op glucose, acetaat, glutamaat en succinaat (89). Op lactaat is nauwelijks tot geen groei gemeten en zonder toegevoegde koolstofbron was helemaal geen groei mogelijk. Tevens werd waargenomen dat *Aeromonas* al groeit bij lage glucoseconcentraties (2,5 µg-C/l) en de  $N_{max}$  neemt nagenoeg recht evenredig toe met de glucoseconcentratie (2,5 µg-C/l tot 1 mg-C/l, experiment bij 12°C uitgevoerd). De minimumconcentratie acetaat voor groei van *Aeromonas* is vele malen hoger: 25 µg-C/l geeft nog geen *Aeromonas*-groei (bij 12°C), terwijl dit wel bij 100 µg-C/l mogelijk is. Met zetmeel als koolstofbron kan *Aeromonas* (bij 15°C) alleen groeien met een concentratie van 100 µg-C/l. Als glucose als tweede koolstofbron wordt toegevoegd kan *Aeromonas* ook groeien, maar het is de vraag of *Aeromonas* dan alleen glucose of ook zetmeel gebruikt voor groei (89).

Uit een andere vervolgstudie blijkt dat *Aeromonas* groeit op lage concentraties koolstofbronnen: een mengsel van 10 langeketenvetzuren (totaal 1 µg-C/l, waarvan 0,1 µg-C/l per individuele stof) en een mengsel van 21 aminozuren (totaal 2,1 µg-C/l) (91). Voor *Aeromonas*-groei op mengsels van 18 koolhydraten of 18 carbonzuren was een concentratie van 1 µg-C/l per individuele stof (totaal 18 µg-C/l) nodig als minimale concentratie. Bij deze mengsels is het zeer waarschijnlijk dat *Aeromonas* niet alle individuele stoffen kan gebruiken, maar slechts een aantal en dat de daadwerkelijk gebruikte hoeveelheid koolstof dus lager is dan wat is gedoseerd. Dit blijkt uit verdere experimenten waarin een groot aantal koolstofbronnen (63 stoffen, 10 µg-C/l) individueel is getest. Op 39 van deze 63 stoffen was *Aeromonas*-groei zichtbaar, maar van slechts 17 stoffen was de groeisnelheid > 0,1/uur:

- Serine en glutamine (aminozuren);
- Arabinose, galactose, glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, mannitol (koolhydraten);
- Linolaat, linoleaat, myristaat, oleaat, palmitaat, palmitoleaat (langeketenvetzuren).

Groei-experimenten met dezelfde koolstofbronnen, maar uitgevoerd in gepasteuriseerd (autochtone populatie afgedood) en ongepasteuriseerd (autochtone populatie aanwezig) drinkwater, laten de invloed van de autochtone populatie in drinkwater op *Aeromonas*-groei zien (87). In gepasteuriseerd drinkwater groeit *Aeromonas* bij dosering van 0,5 µg-C/l aminozurenmengsel, terwijl in ongepasteuriseerd drinkwater pas *Aeromonas*-groei wordt waargenomen bij concentraties hoger dan 5 tot 10 µg-C/l. Daarnaast zijn de  $N_{max}$ -waarden in ongepasteuriseerd water waar *Aeromonas*-groei optrad ongeveer 2 log lager dan in gepasteuriseerd water. Beide resultaten laten zien dat de autochtone microbiële populatie dus inderdaad succesvol competeert met *Aeromonas* voor de aanwezige nutriënten. Per distributiegebied verschillen de minimale koolstofconcentraties voor groei, de groeisnelheid en  $N_{max}$  die worden bereikt in drinkwater afkomstig uit dat distributiegebied. In het distributienet is het voor *Aeromonas* dus waarschijnlijk lastig om te concurreren met de autochtone bacteriën voor voedingsstoffen. Of *Aeromonas* deze competitie met autochtone bacteriën wint of niet, hangt echter af van veel factoren, waaronder temperatuur, nutriëntensamenstelling, nutriëntenconcentratie, microbiële populatie, verblijftijd.

#### 5.4 Stikstofbron: aminozuur, nitraat of ammonium

Groei-experimenten met *Aeromonas* in gepasteuriseerd drinkwater waarbij de stikstofbron (ammonium versus nitraat) werd gevarieerd, laten zien dat de meeste *Aeromonas*-stammen hogere maximale aantallen bereiken als ammonium werd gedoseerd (100 mg-N/liter), vergeleken met dosering van alleen nitraat (87, 91, 92). De voorkeur van ammonium boven nitraat als stikstofbron wordt bij de meeste andere drinkwatergerelateerde bacteriën niet waargenomen; de meeste drinkwaterbacteriesoorten gebruiken dus voornamelijk nitraat als stikstofbron.

De meeste *Aeromonas*-stammen kunnen dus niet of nauwelijks groeien zonder ammonium, vooral in aanwezigheid van een moeilijk afbreekbare koolstofbron (92). In een experiment waarbij twaalf *Aeromonas*-soorten werden getest, bleken elf soorten beter te groeien als ammonium aanwezig was. De twaalfde soort, *A. rivuli*, bereikte met ammoniumdosering lagere  $N_{\max}$ -waarden dan wanneer ammonium niet werd gedoseerd (87, 92). Het belang van ammonium als stikstofbron voor de meeste *Aeromonas*-soorten is vooral duidelijk als chitine of een mengsel van biopolymeren als koolstofbron wordt gebruikt. Zonder ammonium kan *Aeromonas* niet groeien op deze stoffen. In de aanwezigheid van ammonium is er groei, maar zijn de groeisnelheden en  $N_{\max}$ -waarden nog altijd lager dan wanneer andere koolstofbronnen (bijvoorbeeld arginine of oleaat) worden gebruikt.

Een andere interessante observatie is dat bij gebruik van het aminozuur arginine als koolstofbron de toevoeging van ammonium geen effect had op de groeisnelheid of  $N_{\max}$  van *Aeromonas*. Arginine bevat echter naast koolstof ook stikstofatomen, welke blijkbaar goed door *Aeromonas* als stikstofbron gebruikt kunnen worden (92). Het is niet bekend wat de minimale ammoniumconcentratie is voor groei van *Aeromonas*, zoals hierboven beschreven is dit onder andere afhankelijk van de koolstofbron. Omdat er geen effect is van ammoniumdosering op groei van *Aeromonas* op 10  $\mu\text{g-C/l}$  arginine, suggereert dit dat een lage ammoniumconcentratie voldoende is.

## 5.5 Groei in/op dierlijke organismen

Bepaalde soorten ongewervelde dierlijke organismen in het drinkwatersysteem kunnen de toename van *Aeromonas* in drinkwater beïnvloeden (1). Draadwormen zorgen daarbij voor een snelle afsterving van *Aeromonas*-bacteriën, terwijl waterpissebedden (*Asellus*) en borstelwormen de groei van *Aeromonas* bevorderen. Roeipootkreeften daarentegen lijken geen effect op *Aeromonas*-groei te hebben. Deze resultaten suggereren dat de stoffen die uit borstelwormen en *Asellus* vrijkomen, zorgen voor een verhoogde groeirespons van *Aeromonas*. Indien *Asellus* in het distributienet aanwezig is, dan bestaat het grootste deel van de biomassa van ongewervelde dieren uit *Asellus*-biomassa. De biomassa van één *Asellus* is namelijk vele malen groter dan de biomassa van één exemplaar van de andere dierlijke organismen die in drinkwater aanwezig kunnen zijn. Het is daardoor waarschijnlijk dat *Asellus* meestal de *Aeromonas*-groei meer zal beïnvloeden dan borstelwormen (93).

Uit *Aeromonas*-groeiproeven, waarbij een *Asellus* aan het water is gedoseerd, blijkt dat het aantal *Aeromonas*-bacteriën vaak toeneemt na het afsterven van een *Asellus*, maar dat de mate van groeirespons van *Aeromonas* sterk kan verschillen (Tabel 55). Vaak stijgen de *Aeromonas*-aantallen sterk binnen een dag na overlijden, maar deze stijging kan ook enkele dagen duren en soms treedt een toename helemaal niet op. De groei van *Aeromonas* in aanwezigheid van een *Asellus* zou kunnen plaatsvinden op stoffen die vrijkomen uit een levende of dode *Asellus*, of door het vrijkomen van *Aeromonas* zelf uit de *Asellus*. De benoemde groeiproeven zijn echter wel uitgevoerd met een verhouding *Asellus* staat tot water van 1 *Asellus* in 600 ml water, wat wel vele malen hoger tot dan wat in het distributienet met spuiacties wordt gevonden (range 0 – 1000 *Asellus*/1000 l water), waardoor het effect van *Asellus* in een distributienet minder groot zal zijn.



Tabel 5. *Aeromonas*-groeirespons op aanwezigheid van een *Asellus*. Gegeven is of de *Asellus* levend of dood was bij de start van het experiment, op welke dag de *Asellus* dood is gegaan en wanneer het maximale *Aeromonas*-aantal is bereikt ( $N_{max}$ ).

Watertype	<i>Asellus</i>	Overlijden <i>Asellus</i> (dag)	$N_{max}$ (dag)	Opmerking	Referentie
Drinkwater	Levend	1	3	Binnen 1 dag sterke stijging <i>Aeromonas</i>	(94)
Drinkwater	Levend	1	4	<i>Aeromonas</i> nam al sterk toe voor overlijden	(94)
Drinkwater	Levend	5	4	Maximale <i>Aeromonas</i> -groei voor overlijden <i>Asellus</i>	(1)
Drinkwater	Levend	2	7	Na 1-2 dagen sterke stijging <i>Aeromonas</i>	(1)
Drinkwater	Dood	-	4	Binnen 1 dag sterke stijging <i>Aeromonas</i>	(94)
Drinkwater	Dood	-	3	Binnen 1 dag sterke stijging <i>Aeromonas</i>	(1)
Drinkwater	Dood	-	3	Binnen 1 dag sterke stijging <i>Aeromonas</i>	(1)
Drinkwater + sediment	Levend	24	52	Na overlijden meteen stijging <i>Aeromonas</i>	(95)
Spuiwater	Levend	2	4	Binnen 1 dag ong. 0,5 log stijging <i>Aeromonas</i> tot $N_{max}$	(94)
Spuiwater	Levend	6	10	Na 2-3 dagen ong. 0,5 log stijging <i>Aeromonas</i> . Verhoging tot $N_{max}$ is slechts één meting.	(94)
Spuiwater	Levend	5	7	Binnen 1 dag ong. 0,5 log stijging <i>Aeromonas</i> tot $N_{max}$	(1)
Spuiwater	Levend	10	12	Binnen 1 dag sterke stijging <i>Aeromonas</i> . Verhoging tot $N_{max}$ is slechts één meting.	(1)
Spuiwater	Dood	-	2	Meteen stijging <i>Aeromonas</i>	(94)
Spuiwater	Dood	-	3	Meteen stijging <i>Aeromonas</i>	(1)
Spuiwater	Dood	-	3	Meteen stijging <i>Aeromonas</i>	(1)

Eén van de hypothesen is dus dat *Aeromonas* zou kunnen groeien op stoffen die uit *Asellus* vrijkomen. Van *Asellus* is de samenstelling, en dus stoffen, die uit *Asellus* kunnen vrij kunnen komen bekend. De samenstelling verschilt tussen dode en levende *Asellus*-exemplaren en wordt beïnvloed door het milieu waarin de organismen zijn opgegroeid. Analyse van het gehalte vrije vetzuren van *Asellus* afkomstig uit het distributiegebied bij 's Gravendeel (productielocatie Berenplaat, drinkwater uit oppervlaktewater) en Tholen/Halsteren (productielocatie Halsteren, drinkwater uit grondwater) geeft een vetzuurconcentratie van 15,9 µg per mg drooggewicht van een dode *Asellus*. De vetzuurconcentratie in een levende *Asellus* is echter veel lager (3,7 µg/mg drooggewicht)(94). De vetzuren met de hoogste concentraties zijn cis-vacceenzuur, oliezuur, palmitinezuur en stearinezuur. Van in ieder geval oliezuur is bekend dat *Aeromonas*-bacteriën dit als voedingsstof voor groei kunnen gebruiken. *Asellus* afkomstig uit oppervlaktewater of uit een kweekstelsel met bladeren als voedselbron hebben echter een andere vetzuursamenstelling (96). Hierin zijn vooral palmitinezuur, palmitoleïnezuur, cis-vacceenzuur, oliezuur, linolzuur en eicopentaeenzuur aanwezig en is de concentratie vetzuur per mg drooggewicht *Asellus* hoger (36 – 43 µg/mg drooggewicht).

De aminozuurconcentratie is in levende *Asellus* uit het distributienet (28 – 34 µg/mg drooggewicht) hoger dan in dode *Asellus* (< 3 µg/mg drooggewicht). De aminozuursamenstelling is op hoofdlijnen echter wel gelijk tussen levende en dode exemplaren. De vijf aminozuren die in de hoogste concentraties aanwezig zijn, zijn arginine,

histidine, lysine, ornithine en leucine (94). Van arginine is bekend dat *Aeromonas* hier goed op kan groeien, terwijl van de andere aminozuren geen gegevens over groei van *Aeromonas* bekend zijn.

Naast dat sommige ongewervelde dieren *Aeromonas*-groei kunnen stimuleren zijn *Aeromonas*-bacteriën ook aanwezig in verschillende soorten ongewervelde dieren zoals draadwormen, borstelwormen, roeipootkreeften (97) en *Asellus* (1, 98). Er zijn nauwelijks vergelijkbare *Aeromonas*-groeioproeven met andere ongewervelde dieren uitgevoerd, waardoor weinig bekend is over het effect van deze andere invertebraten op groei van *Aeromonas*. Hierbij is het moeilijk om onderscheid te maken tussen groei van *Aeromonas* in ongewervelde dieren of dat ongewervelde dieren *Aeromonas*-bacteriën binnenkrijgen via bijvoorbeeld het sediment en via de faeces het lichaam weer verlaten (zogenoemde passanten).

Uit niet-drinkwatermilieus is bekend dat *Aeromonas* voor kan komen in protozoa (99), waaronder *Acanthamoeba castellani* (100, 101), *Vermamoeba vermiformis* (102) en *Tetrahymena pyriformis* (103). Ze kunnen soms goed overleven in deze protozoa en soms ook in aantallen toenemen. Overleving lijkt wel af te hangen van het soort protozo, zo lijkt *Aeromonas* in *Acanthamoeba polyphaga* afgebroken en verteerd te worden (104). Doordat deze protozoën ook in drinkwater aanwezig kunnen zijn, laten deze resultaten zien dat *Aeromonas* zich, net als *Legionella*, mogelijk ook weet te vermeerderen in protozoa in het drinkwaterdistributiesysteem. Aanvullend onderzoek is echter nodig om dit te achterhalen.

## 5.6 Conclusie

De invloed van nutriënten op groei van *Aeromonas* in het drinkwatersysteem is uitgebreid onderzocht en heeft laten zien dat met name sediment en ongewervelde dieren een belangrijke rol spelen bij de vermeerdering van *Aeromonas* in het drinkwatermilieu (samengevat in Tabel 6). Vermeerdering van *Aeromonas* in het drinkwater lijkt minder belangrijk voor groei, omdat *Aeromonas* niet goed in staat is om te concurreren met de autochtone microflora. Tevens is waargenomen dat *Aeromonas* in staat is om verschillende stofgroepen (bv koolhydraten, vetzuren, aminozuren) kan gebruiken voor groei en dat het organisme een voorkeur heeft voor ammonium als stikstofbron.

Tabel 6. Samenvatting van groei van bacteriën van de coligroep, *Aeromonas* en *Legionella* in verschillende niches in het distributienet (drinkwater, spuiwater/sediment, biofilm) en een algemeen overzicht welke koolstof- en stikstofbronnen de bacteriën gebruiken voor groei. Gedetailleerdere informatie over op welke specifieke stoffen, behorend tot de genoemde groepen, de bacteriën kunnen groeien staat vermeld beschreven in bovenstaande tekst.

		Bacteriën van de coligroep	<i>Aeromonas</i>	<i>Legionella</i>
Drinkwater	Gepasteuriseerd	+	+	-
	Ongepasteuriseerd	- (mogelijk wel bij verstoringen)	+/-	-
Spuiwater/ Sediment	Gepasteuriseerd	+	+	-
	Ongepasteuriseerd	-	+	-
Biofilm		-	-	+ (in protozoa)
Nutriënten voor groei		Aminozuren Aromatische zuren Carbonsuren Gistextract Koolhydraten	Aminozuren Ammonium Carbonsuren Dierlijke organismen Koolhydraten Langeketenvetzuren Groei in protozoa	AOC: > 1 µg-C/l Biofilm: > 50 µg ATP/cm <sup>2</sup> IJzer Leidingmateriaal Metaalionen (ex. ijzer): <1-10 mg/l Roest

## 6 Referenties

1. van Bel N. 2018. Groei van *Aeromonas* op sediment en ongewervelde dieren uit het distributienet van de productielocaties Kralingen, Braakman en Berenplaat van Evides. KWR, BTO 2018.037. Nieuwegein.
2. van der Kooij D, Bakker GL, Italiaander R, Veenendaal HR, Wullings BA. 2017. Biofilm Composition and Threshold Concentration for Growth of *Legionella pneumophila* on Surfaces Exposed to Flowing Warm Tap Water without Disinfectant. *Applied and Environmental Microbiology* 83.
3. Liu S, Gunawan C, Barraud N, Rice SA, Harry EJ, Amal R. 2016. Understanding, Monitoring, and Controlling Biofilm Growth in Drinking Water Distribution Systems. *Environmental Science & Technology* 50:8954-8976.
4. Fang W, Hu JY, Ong SL. 2009. Influence of phosphorus on biofilm formation in model drinking water distribution systems. *Journal of Applied Microbiology* 106:1328-1335.
5. Madigan MTMJBTD. 2006. Brock biology of microorganisms. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
6. van der Kooij D. 1990. Assimilable Organic Carbon (AOC) in Drinking Water, p 57-87. In McFeters GA (ed), *Drinking Water Microbiology: Progress and Recent Developments* doi:10.1007/978-1-4612-4464-6\_3. Springer New York, New York, NY.
7. van der Kooij D, van der Wielen PWJJ. 2013. *Microbial Growth in Drinking Water Supplies*. IWA Publishing.
8. Sack ELW, van der Wielen PWJJ, van der Kooij D. 2011. *Flavobacterium johnsoniae* as a Model Organism for Characterizing Biopolymer Utilization in Oligotrophic Freshwater Environments. *Applied and Environmental Microbiology* 77:6931-6938.
9. Hijnen WAM, Schurer R, Bahlman JA, Ketelaars HAM, Italiaander R, van der Wal A, van der Wielen PWJJ. 2018. Slowly Biodegradable Organic Compounds Impact the Biostability of Non-Chlorinated Drinking Water Produced from Surface Water. *Water Research* 129:240-251.
10. van der Kooij D, Vrouwenvelder JS, Veenendaal HR. 2003. Elucidation and control of biofilm formation processes in water treatment and distribution using the Unified Biofilm Approach. *Water Science and Technology* 47:83-90.
11. Van der Kooij D, Veenendaal HR. 2012. Bepaling van de biofilmvormende eigenschappen van drinkwater met een continue biofilmmonitor (CBM). KWR Watercycle Research Institute, BTO 2011.050. Nieuwegein.
12. Sack ELW, van der Wielen PWJJ, van der Kooij D. 2014. Polysaccharides and Proteins Added to Flowing Drinking Water at Microgram-per-Liter Levels Promote the Formation of Biofilms Predominated by Bacteroidetes and Proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 80:2360-2371.
13. Julien C, Laurent E, Legube B, Thomassin JH, Mondamert L, Labanowski J. 2014. Investigation on the iron-uptake by natural biofilms. *Water Research* 50:212-220.
14. Marschner B, Kalbitz K. 2003. Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma* 113:211-235.
15. Kwon B, Lee S, Cho J, Ahn H, Lee D, Shin HS. 2005. Biodegradability, DBP Formation, and Membrane Fouling Potential of Natural Organic Matter: Characterization and Controllability. *Environmental Science & Technology* 39:732-739.
16. Sun L, Perdue EM, Meyer JL, Weis J. 1997. Use of elemental composition to predict bioavailability of dissolved organic matter in a Georgia river. *Limnology and Oceanography* 42:714-721.
17. Chong Soh Y, Roddick F, van Leeuwen J. 2008. The impact of alum coagulation on the character, biodegradability and disinfection by-product formation potential of reservoir natural organic matter (NOM) fractions. *Water Science and Technology* 58:1173-1179.

18. Fish KE, Osborn AM, Boxall J. 2016. Characterising and understanding the impact of microbial biofilms and the extracellular polymeric substance (EPS) matrix in drinking water distribution systems. *Environmental Science: Water Research & Technology* 2:614-630.
19. Ginige MP, Wylie J, Plumb J. 2011. Influence of biofilms on iron and manganese deposition in drinking water distribution systems. *Biofouling* 27:151-163.
20. van der Kooij D, Bereschchenko L. 2015. De invloed van ijzer op de biomassa-accumulatie in de continue biofoulingmonitor (CBM). KWR, BTO 2015.216(s). Nieuwegein.
21. Slaats P, Rosenthal L, Siegers W, van den Boomen M, Beuken R, Vreeburg J. 2004. Processes Involved in the Generation of Discolored Water. IWA Publishing.
22. van der Wielen PWJJ, Van de Wetering TSCM. 2021. De invloed van mangaan op biofilmvorming en sediment in het distributiesysteem KWR Water Research Institute, BTO 2021.039. Nieuwegein.
23. van der Kooij D, Veenendaal HR, Scheffer WJ. 2005. Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Research* 39:2789-2798.
24. Learbuch KLG, Smidt H, van der Wielen PWJJ. 2021. Influence of pipe materials on the microbial community in unchlorinated drinking water and biofilm. *Water Research* 194:116922.
25. Flemming HC, Bendinger B, Exner M, Gebel J, Kistemann T, Schaule G, Szewzyk U, Wingender J. 2014. The last meters before the tap: where drinking water quality is at risk, p 207-238. *In* van der Kooij D, van der Wielen PWJJ (ed), *Microbial Growth in Drinking-Water Supplies Problems, Causes, Control and Research Needs*. IWA Publishing, London, UK.
26. Ryssel ST, Arvin E, Lutzhoft HC, Olsson ME, Prochazkova Z, Albrechtsen HJ. 2015. Degradation of specific aromatic compounds migrating from PEX pipes into drinking water. *Water Research* 81:269-278.
27. Borkow G, Gabbay J. 2005. Copper as a Biocidal Tool. *Current Medicinal Chemistry* 12:2163-2175.
28. Yu J, Kim D, Lee T. 2010. Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials. *Water Science and Technology* 61:163-171.
29. Morvay AA, Decun M, Scurtu M, Sala C, Morar A, Sarandan M. 2011. Biofilm formation on materials commonly used in household drinking water systems. *Water Supply* 11:252-257.
30. Manuel CM, Nunes OC, Melo LF. 2007. Dynamics of drinking water biofilm in flow/non-flow conditions. *Water Research* 41:551-562.
31. van der Kooij D. 1998. Potential for biofilm development in drinking water distribution systems. *Journal of Applied Microbiology* 85:39S-44S.
32. van der Kooij D, Veenendaal HR. 2011. Bepaling en beoordeling van de *Legionellagroep* potentie van drinkwater. KWR, BTO 2011.037. Nieuwegein.
33. van der Kooij D, Veenendaal HR, van der Mark EJ, Dignum M. 2017. Assessment of the microbial growth potential of slow sand filtrate with the biomass production potential test in comparison with the assimilable organic carbon method. *Water Research* 125:270-279.
34. Liu G, Bakker GL, Li S, Vreeburg JHG, Verberk JQJC, Medema GJ, Liu WT, Van Dijk JC. 2014. Pyrosequencing Reveals Bacterial Communities in Unchlorinated Drinking Water Distribution System: an Integral Study of Bulk Water, Suspended Solids, Loose Deposits, and Pipe Wall Biofilm. *Environmental Science and Technology* 48:5467-5476.
35. van der Wielen PWJJ, Lut MC. 2016. 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* 16:896-904.
36. Prest EI, Schaap PG, Besmer MD, Hammes F. 2021. Dynamic Hydraulics in a Drinking Water Distribution System Influence Suspended Particles and Turbidity, But Not Microbiology. *Water* 13:109.
37. Gauthier V, Gérard B, Portal J-M, Block J-C, Gatel D. 1999. Organic matter as loose deposits in a drinking water distribution system. *Water Research* 33:1014-1026.
38. Mussared A, Fabris R, Vreeburg J, Jelbart J, Drikas M. 2018. The origin and risks associated with loose deposits in a drinking water distribution system. *Water Science and Technology: Water Supply* 19:291-302.
39. Logsdon GS, Rice EW. Evaluation of sedimentation and filtration for micro-organisms removal, p 1177-1197. *In* (ed),

40. Sabater S. 1995. Algae in urban drinking water in N-E Spain. *Appl Phycol* 7:455-460.
41. Camper AK, LeChevallier MW, Broadway SC, McFeters GA. 1986. Bacteria associated with granular activated carbon particles in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 52:434-438.
42. Bucklin KE, McFeters GA, Amirtharajah A. 1991. Penetration of coliforms through municipal drinking water filters. *Water Research* 25:1013-1017.
43. Stringfellow WT, Mallon K, DiGiano FA. 1993. Enumerating and Disinfecting Bacteria Associated With Particles Released From GAC Filter-Adsorbers. *Journal AWWA* 85:70-80.
44. Bourbigot MM, Pagliardini AV, Marteil P. 1988. Etude des facteurs déterminant la fuite en aluminium dans les eaux potables. Cas de l'usine de Super-Rinie. *L'Eau* 83:73-77.
45. Brazos BJ, O'Connor JT. 1996. Seasonal Effects on Generation of Particle-Associated Bacteria during Distribution. *Journal of Environmental Engineering* 122:1050-1057.
46. Sly LI, Hodgkinson MC, Arunpairojana V. 1990. Deposition of manganese in a drinking water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology* 56:628-639.
47. Mouchet P, Montiel A, Rigal S. 1992. Dégradations physico-chimiques de l'eau dans les réseaux de distribution. *TSM l'Eau* 87:299 - 306.
48. LeChevallier MW, Schulz W, Lee RG. 1991. Bacterial nutrients in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 57:857-862.
49. LeChevallier MW, Welch NJ, Smith DB. 1996. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2201-2211.
50. Garrity GM. 2001-2011. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York.
51. Hamsch B, Korth A, Petzoldt H. 2012. Occurrence and Growth of Coliform Bacteria in Drinking Water Distribution Systems, p 38-46, *The Significance of Faecal Indicators in Water: A Global Perspective* doi:10.1039/9781849735421-00038. The Royal Society of Chemistry.
52. Camper AK, McFeters GA, Characklis WG, Jones WL. 1991. Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* 57:2233-2239.
53. van der Kooij D, Hijnen WAM. 1988. Multiplication of a *Klebsiella pneumoniae* Strain in Water at Low Concentrations of Substrates. *Water Science and Technology* 20:117-123.
54. van der Kooij D. 1997. Multiplication of coliforms at very low concentrations of substrates in tap water, p 195-207. *In* Kay D, Fricker C (ed), *Coliforms and E coli Problem or Solution?* The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
55. Kämpfer P, Glaeser SP, Packroff G, Behringer K, Exner M, Chakraborty T, Schmithausen RM, Doijad S. 2018. *Lelliottia aquatilis* sp. nov., isolated from drinking water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68:2454-2461.
56. Puchenkova SG. 1996. [Enterobacteria in areas of water along the Crimean coast]. *Mikrobiol Z* 58:3-7.
57. Pang A, Warren MJ, Pickersgill RW. 2011. Structure of PduT, a trimeric bacterial microcompartment protein with a 4Fe-4S cluster-binding site. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 67:91-96.
58. Szewzyk U, Szewzyk R, Stenström TA. 1993. Growth and survival of *Serratia marcescens* under aerobic and anaerobic conditions in the presence of materials from blood bags. *Journal of Clinical Microbiology* 31:1826-1830.
59. Kämpfer P, Glaeser SP. 2016. *Serratia aquatilis* sp. nov., isolated from drinking water systems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66:407-413.
60. van der Wielen PWJJ, van der Kooij D. 2009. Literatuurstudie naar opportunistisch-ziekteverwekkende micro-organismen die zich in drinkwater kunnen vermeerderen. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
61. van der Kooij D, Brouwer-Hanzens AH, Veenendaal HR, Wullings BA. 2015. Effect of temperature on the growth of *Legionella pneumophila* sequence types KWR, BTO 2015.079. Nieuwegein.
62. van der Kooij D, Wubbels G, Brouwer-Hanzens AJ, Veenendaal HR. 2008. Invloed van de temperatuur op de groei van *Legionella pneumophila* en *L. anisa* in leidingwater. Kiwa Water Research, KWR 08.046. Nieuwegein.

63. van der Kooij D, Brouwer-Hanzens AJ, Veenendaal H. 2009. Invloed van de watertemperatuur op de groei van *Legionella pneumophila* en *Legionella anisa* in biofilms. KWR, KWR 09.056. Nieuwegein.
64. Van der Kooij D, Wubbels G, Veenendaal G. 2007. *Legionella*-bacteriën in leidingwaterinstallaties behoren meestal tot de ongevaarlijke soort *Legionella anisa*. H2O 5:33-35.
65. Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M, Messi P. 2005. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives, p 355-380, Biotechnology Annual Review, vol 11. Elsevier.
66. Van der Kooij D. 2014. *Legionella* in drinking-water supplies, p 127-175. In Van der Kooij D, Van der Wielen PWJJ (ed), Microbial Growth in Drinking Water Supplies Problems, Causes, Controls and Research Needs. IWA Publishing, London, UK.
67. Rowbotham TJ. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. Journal of Clinical Pathology 33:1179-1183.
68. Moffat JF, Tompkins LS. 1992. A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. Infection and Immunity 60:296-301.
69. Wadowsky RM, Butler LJ, Cook MK, Verma SM, Paul MA, Fields BS, Keleti G, Sykora JL, Yee RB. 1988. Growth-supporting activity for *Legionella pneumophila* in tap water cultures and implication of hartmannellid amoebae as growth factors. Applied and Environmental Microbiology 54:2677-2682.
70. Tyndall RL, Domingue EL. 1982. Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. Applied and Environmental Microbiology 44:954.
71. Steele TW, McLennan AM. 1996. Infection of *Tetrahymena pyriformis* by *Legionella longbeachae* and other *Legionella* species found in potting mixes. Applied and Environmental Microbiology 62:1081-1083.
72. Learbuch KLG, Lut MC, Liu G, Smidt H, van der Wielen PWJJ. 2019. *Legionella* growth potential of drinking water produced by a reverse osmosis pilot plant. Water Research 157:55-63.
73. Williams K, Pruden A, Falkinham JO, Edwards M. 2015. Relationship between Organic Carbon and Opportunistic Pathogens in Simulated Glass Water Heaters. Pathogens (Basel, Switzerland) 4:355-372.
74. States SJ, Conley LF, Ceraso M, Stephenson TE, Wolford RS, Wadowsky RM, McNamara AM, Yee RB. 1985. Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. Applied and Environmental Microbiology 50:1149-1154.
75. Bargellini A, Marchesi I, Righi E, Ferrari A, Cencetti S, Borella P, Rovesti S. 2011. Parameters predictive of *Legionella* contamination in hot water systems: association with trace elements and heterotrophic plate counts. Water Research 45:2315-2321.
76. Vickers RM, Yu VL, Hanna SS, Muraca P, Diven W, Carmen N, Taylor FB. 1987. Determinants of *Legionella pneumophila* contamination of water distribution systems: 15-hospital prospective study. Infect Control 8:357-363.
77. Buracco S, Peracino B, Andreini C, Bracco E, Bozzaro S. 2018. Differential Effects of Iron, Zinc, and Copper on *Dictyostelium discoideum* Cell Growth and Resistance to *Legionella pneumophila*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 7:536-536.
78. James BW, Mauchline WS, Dennis PJ, Keevil CW, Wait R. 1999. Poly-3-Hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an Energy Source for Survival in Low-Nutrient Environments. Applied and Environmental Microbiology 65:822-827.
79. Allard KA, Dao J, Sanjeevaiah P, McCoy-Simandle K, Chatfield CH, Crumrine DS, Castignetti D, Cianciotto NP. 2009. Purification of Legiobactin and Importance of This Siderophore in Lung Infection by *Legionella pneumophila*. Infection and Immunity 77:2887.
80. Johnson W, Varner L, Poch M. 1991. Acquisition of iron by *Legionella pneumophila*: role of iron reductase. Infection and Immunity 59:2376.
81. Reeves MW, Pine L, Hutner SH, George JR, Harrell WK. 1981. Metal requirements of *Legionella pneumophila*. Journal of Clinical Microbiology 13:688-695.
82. Bédard E, Triguí H, Liang J, Doberva M, Paranjape K, Lalancette C, Allegra S, Faucher SP, Prévost M. 2021. Local adaptation of *Legionella pneumophila* within a hospital hot water system increases

- tolerance to copper. *Applied and Environmental Microbiology* doi:10.1128/AEM.00242-21:AEM.00242-00221.
83. van der Lugt W, Euser SM, Bruin JP, Den Boer JW, Walker JT, Crespi S. 2017. Growth of *Legionella anisa* in a model drinking water system to evaluate different shower outlets and the impact of cast iron rust. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 220:1295-1308.
  84. van der Kooij D, Martijn B, Schaap PG, Hoogenboezem W, Veenendaal HR, van der Wielen PWJJ. 2015. Improved biostability assessment of drinking water with a suite of test methods at a water supply treating eutrophic lake water. *Water Research* 87:347-355.
  85. Liu G, Tao Y, Zhang Y, Lut M, Knibbe W-J, van der Wielen P, Liu W, Medema G, van der Meer W. 2017. Hotspots for Selected Metal Elements and Microbes Accumulation and the Corresponding Water Quality Deterioration Potential in an Unchlorinated Drinking Water Distribution System. *Water Research* 124:435-445.
  86. Learbuch K, Hijnen WAM. 2018. Onderzoek naar de biologische condities in water, sediment en op de buiswand en de *Aeromonas* toename in een transportleiding als functie van het seizoen in 2016. KWR, BTO 2018.031. Nieuwegein.
  87. van Bel N, van der Wielen P, Wullings B, van Rijn J, van der Mark E, Ketelaars H, Hijnen W. 2021. *Aeromonas* Species from Nonchlorinated Distribution Systems and Their Competitive Planktonic Growth in Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology* 87:e02867-02820.
  88. Croci L, Di Pasquale S, Cozzi L, Toti L. 2001. Behavior of *Aeromonas hydrophila* in Bottled Mineral Waters. *Journal of Food Protection* 64:1836-1840.
  89. van der Kooij D, Visser A, Hijnen WAM. 1980. Growth of *Aeromonas hydrophila* at Low Concentrations of Substrates Added to Tap Water. *Applied and Environmental Microbiology* 39:1198-1204.
  90. Learbuch KLG, van Bel N. 2018. Temperatuurafhankelijke groei van *Aeromonas* in drinkwater. KWR, BTO 2018.097. Nieuwegein.
  91. van der Kooij D, Hijnen WA. 1988. Nutritional versatility and growth kinetics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from drinking water. *Applied Environmental Microbiology* 54:2842-2851.
  92. van Bel N, Wullings BA, Hijnen WAM. 2016. Isolatie en identificatie van *Aeromonas* stammen uit vijf DPWE voorzieningsgebieden en hun groeikarakteristieken. KWR, KWR 2016.073. Nieuwegein.
  93. van Lieverloo JH, Hoogenboezem W, Veenendaal G, van der Kooij D. 2012. Variability of invertebrate abundance in drinking water distribution systems in the Netherlands in relation to biostability and sediment volumes. *Water Research* 46:4918-4932.
  94. van Bel N, Hup K, Kolkman A, Brouwer AJ, Hijnen WAM. 2017. Verband tussen *Aeromonas* nagroei en de aanwezigheid van waterpissebedden. KWR, KWR 2017.021. Nieuwegein.
  95. Hijnen WAM, Reijnen GK, Bos RHM, Veenendaal G, Van der Kooij D. 1992. Lagere *Aeromonas*-aantallen in het drinkwater van pompstation Zuidwolde door verbeterde ontgassing en vernieuwen van het filtergrind. *H2O* 25:370-375.
  96. Lau D, Goedkoop W, Vrede T. 2013. Cross-ecosystem Differences in Lipid Composition and Growth Limitation of a Benthic Generalist Consumer. *Limnology and Oceanography* 58:1149-1164.
  97. Chaix G, Roger F, Berthe T, Lamy B, Jumas-Bilak E, Lafite R, Forget-Leray J, Petit F. 2017. Distinct *Aeromonas* Populations in Water Column and Associated with Copepods from Estuarine Environment (Seine, France). *Frontiers in Microbiology* 8.
  98. van Bel N, Verschoor AM. 2020. Groei en overleving van waterpissebedden op water en organische stof uit het drinkwaterdistributienet van Kralingen en Braakman. KWR, BTO 2020.040. Nieuwegein.
  99. Moreno-Mesonero L, Hortelano I, Moreno Y, Ferrús MA. 2020. Evidence of viable *Helicobacter pylori* and other bacteria of public health interest associated with free-living amoebae in lettuce samples by next generation sequencing and other molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology* 318.
  100. Yousuf FA, Siddiqui R, Khan NA. 2013. *Acanthamoeba castellanii* of the T4 genotype is a potential environmental host for *Enterobacter aerogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Parasites & Vectors* 6:169.

101. Rahman M, Abd H, Romling U, Sandstrom G, Mollby R. 2008. *Aeromonas*-*Acanthamoeba* interaction and early shift to a viable but nonculturable state of *Aeromonas* by *Acanthamoeba*. *Journal of Applied Microbiology* 104:1449-1457.
102. Delafont V, Perraud E, Brunet K, Maisonneuve E, Kaaki S, Rodier M-H. 2019. *Vermamoeba vermiformis* in hospital network: a benefit for *Aeromonas hydrophila*. *Parasitology Research* 118:3191-3194.
103. King CH, Shotts EB. 1988. Enhancement of *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas salmonicida* through ingestion by the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *FEMS Microbiology Letters* 51:95-100.
104. Anacarso I, de Niederhäusern S, Messi P, Guerrieri E, Iseppi R, Sabia C, Bondi M. 2012. *Acanthamoeba polyphaga*, a potential environmental vector for the transmission of food-borne and opportunistic pathogens. *Journal of Basic Microbiology* 52:261-268.

Jaar van publicatie  
2022

Meer informatie  
Kimberly Learbuch MSc.  
T 030-6069599  
E [kimberly.learbuch@kwrwater.nl](mailto:kimberly.learbuch@kwrwater.nl)

Groningehaven 7  
Postbus 1072  
3430 BB Nieuwegein

T +31 (0)30 60 69 511  
E [info@kwrwater.nl](mailto:info@kwrwater.nl)  
I [www.kwrwater.nl](http://www.kwrwater.nl)

BTO 2022.007 | 20 januari 2022 ©KWR

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.

### Keywords

*Legionella*, opportunistische pathogenen,  
biofilm, normoverschrijdingen