

A network diagram consisting of various sized light blue circles connected by thin white lines, set against a solid blue background. The circles vary in size and are scattered across the page, with some larger circles acting as hubs.

Bedrijfstakonderzoek
BTO 2024.052 | April 2024

**Effect van
aquathermie op
microbiologische
drinkwaterkwaliteit
– Deel II**

Bedrijfstakonderzoek

KWR

Bridging Science to Practice

Colofon

Effect van aquathermie op microbiologische drinkwaterkwaliteit – Deel II

BTO 2024.052 | April 2024

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

Opdrachtnummer

404390/001

Projectmanager

ir. Andreas Moerman

Opdrachtgever

BTO WiCE

Auteur(s)

dr. Frits van Charante (KWR),
ing. Danielle van der Linde (KWR)

Kwaliteitsborger(s)

Dr. Paul van der Wielen

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar.

Keywords

TED, thermische energie, opportunistische pathogenen, legionella

Jaar van publicatie
2024

Meer informatie
Frits van Charante

T +31(0)306069585
E frits.van.vancharante@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

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

KWR

April 2024 ©

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

Managementsamenvatting

Effect van aquathermie op microbiologische drinkwaterkwaliteit – Deel II

Auteur(s) dr. Frits van Charante (KWR), ing. Danielle van der Linde (KWR).

De groei van opportunistische pathogenen is een risicofactor bij de toepassing van aquathermie, warmte of koude winning uit het drinkwater. In dit onderzoek is getracht een temperatuurgrens te bepalen waarbij het risico op de groei van opportunistische pathogenen wordt gelimiteerd. Hiervoor is gebruik gemaakt van flowcellen om een warmtewisselaar na te bootsen welke zijn aangeëent met zes verschillende van deze opportunistische pathogenen. Van *L. pneumophila*, *L. anisa* en *M. avium* is groei opgetreden gedurende het experiment. Op basis daarvan kan een maximumtemperatuur van 23°C worden geadviseerd voor zowel het drinkwater als het secundaire circuit in de warmtewisselaar. Het gebruik van materialen met een lage BPP-waarde in de warmtewisselaar is ook van groot belang om de groei van opportunistische pathogenen te voorkomen.



ZOB-container van PWN waarin de flowcellen waren geïnstalleerd geplaatst op locatie

Belang: Veiligheid van aquathermie

Duurzame warmtewinning uit drinkwater kan bijdragen aan de energietransitie, maar heeft ook invloed op de drinkwatertemperatuur. Voordat aquathermie kan worden toegepast moet worden bepaald of aanpassing van de temperatuur als gevolg hiervan niet teveel impact heeft op de waterkwaliteit.

Aanpak: Belang temperatuur en materiaal achterhalen d.m.v. flowcellen

Flowcellen, om een warmtewisselaar na te bootsen, met verschillende materialen (RVS en EPDM) zijn op locatie geplaatst in Zuidoostbeemster. Met behulp van een steeklans is een aftakking gecreëerd op een drinkwatertransportleiding van waaruit drinkwater door flowcellen is gevoerd waar dit opwarmde naar

verschillende temperaturen (17°C en 23°C). Ook is een positieve controle flowcel gebruikt met PE op 30°C. Aan de flowcellen zijn zes verschillende opportunistische pathogenen gedoseerd waarvan de vestiging en groei in de flowcellen gedurende 16 weken is gemonitord om te bepalen welke temperaturen en materialen een risico zouden kunnen vormen voor de volksgezondheid.

Resultaten: Groei van *L. pneumophila*, *L. anisa* en *M. avium*

L. pneumophila heeft zich kunnen vermeerderen in de positieve controle en RVC 23°C flowcel. *L. anisa* heeft zich ook kunnen vermeerderen in de positieve controle en RVS 23°C flowcel en initieel in de EPDM 17°C flowcel. *M. avium* vertoonde een sterk verhoogde groei in beide flowcellen met EPDM. In de EPDM flowcel op 23°C werd meer groei gevonden dan op 17°C. *A. fumigatus* en *M. kansasii* hebben zich kunnen vestigen, maar niet kunnen groeien in alle flowcellen. *P. aeruginosa* heeft zich niet kunnen vestigen in alle flowcellen behalve kort in de positieve controle.

Op basis van de resultaten bleek dat ook de temperatuur van het materiaal van groot belang is en niet alleen de temperatuur van het drinkwater. Hierdoor kan een maximale temperatuur voor zowel het drinkwater als het secundaire circuit in een warmtewisselaar worden opgesteld van 23°C. Ook is het van belang om materiaal met lage BPP-waarden te gebruiken in warmtewisselaars, aangezien het gebruikte EPDM duidelijk groeibevorderend bleek.

Toepassing: Maximale temperatuur ook in secundair circuit en lage BPP-waarden materialen

Voor warmtewisselaars is niet alleen de drinkwater temperatuur cruciaal om de groei van opportunistische pathogenen te voorkomen, maar ook die van het secundaire circuit. Hiervoor is op basis van deze studie een maximum voor 23°C opgesteld.

Bepalen van BPP-waarden van materialen in de warmtewisselaar is van groot belang, zeker van materiaal waarbij dit sterk kan variëren. Gebruik van materialen met een lage BPP-waarde is ook van belang om de groei van opportunistische pathogenen te voorkomen.

Het Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Effect van aquathermie op microbiologische drinkwaterkwaliteit* (BTO 2024.052) en is een vervolg op het effectonderzoek dat uitgevoerd is in het WarmingUP-programma (rapport KWR 2023.010, zie referentie hieronder)

Deel I: van Bel, N., Moerman, A., van der Linde, D., Koopmans, C., van der Wielen, P.W.J.J. (2023). Effect van aquathermie op microbiologische drinkwaterkwaliteit deel 1. KWR 2023.010, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL. [WarmingUP - Effecten van aquathermie op microbiologische drinkwaterkwaliteit \(Deel 1\) \(kwrwater.nl\)](#)

Inhoud

Managementsamenvatting	3
Inleiding	6
1.1 Aanleiding	6
1.2 Doel en reikwijdte	6
1.3 Samenhang met eerdere rapportage	6
1.4 Drinkwatertemperatuur en TED	7
1.5 Temperatuur en opportunistische pathogenen	8
1 Materialen en methoden	10
1.1 Opzet flowcellen	10
1.2 Opzet container	12
1.3 Opzet experimenten	12
1.4 Opportunistische pathogenen	14
1.5 Monsternamen	16
1.6 Laboratoriumanalyses	16
2 Resultaten tweede experiment PWN	18
2.1 Recirculatie en doorstroming	18
2.2 Temperatuur	19
2.3 Opportunistische pathogenen	20
3 Discussie	26
3.1 Representativiteit	26
3.2 Invloed van temperatuur	26
3.3 Invloed van materiaal	27
3.4 Invloed van waterkwaliteit	28
3.5 Vergelijking met eerste experiment PWN	29
3.6 Implementatie in de praktijk	29
4 Conclusie en aanbevelingen	31
4.1 Conclusies	31
4.2 Aanbevelingen	31
5 Referenties	32
I Logboek container en flowcellen	34

Inleiding

1.1 Aanleiding

Bijna 40% van het energiegebruik in Nederland wordt gebruikt voor de warmtevoorziening, waardoor duurzame warmtewinning een belangrijke bijdrage kan leveren aan de energietransitie. Aquathermie is een techniek die substantieel kan bijdragen aan het leveren van duurzame warmte (en koude) in de gebouwde omgeving. Door (1) de winning van thermische energie uit oppervlaktewater (TEO), drinkwater (TED) of afvalwater (TEA) te koppelen aan (2) laag thermische opslagsystemen in de bodem en (3) distributie via warmte- en koudenetten kan aquathermie in potentie voorzien in een substantieel deel van de warmtevraag. Aquathermie met TED wordt al op verschillende plekken in Nederland succesvol toegepast.

Wanneer warmte (of koude) aan het drinkwater wordt onttrokken door een warmtewisselaar in een TED-installatie heeft dit invloed op de temperatuur van het drinkwater. De microbiologische kwaliteit van het drinkwater kan hierdoor veranderen. Het is daarom belangrijk om zicht te hebben op de toelaatbare temperatuurveranderingen van het drinkwater ('waterfase') en de biofilm in de warmtewisselaar. In het verleden is al verschillende keren onderzocht wat het effect van TED is op de microbiële biomassaconcentratie en samenstelling van de bacteriële gemeenschap (Moerman et al., 2019; Ahmad, 2022; van Bel et al., 2023). Deze onderzoeken geven echter geen volledig beeld of zogenaamde opportunistische pathogenen, die van nature in lage aantallen in drinkwater aanwezig kunnen zijn, bij hogere temperaturen zich daadwerkelijk gaan vermenigvuldigen in de biofilm en daardoor een risico vormen voor de volksgezondheid. Ook zijn alle eerdere onderzoeken gebaseerd op proeven met (geïnfiltreerd) grondwater als bron voor drinkwater. Daarom is binnen WarmingUP een proefopstelling gebouwd waarmee daadwerkelijk onderzoek gedaan kan worden naar de groei van opportunistische pathogenen op diverse materialen die gebruikt worden in warmtewisselaars en bij verschillende temperaturen van drinkwater geproduceerd uit oppervlaktewater. Daarmee kan deze proefopstelling worden gebruikt om te voorspellen of het gebruik van TED bij verschillende temperaturen leidt tot een verhoogd risico op verspreiding van opportunistische pathogenen.

1.2 Doel en reikwijdte

Met deze studie is beoogd vast te stellen wat toelaatbare temperaturen zijn in relatie tot vermeerdering van opportunistische ziekteverwekkers voor de inzet van aquathermie/ TED bij drinkwater geproduceerd uit oppervlaktewater. Het achterliggende doel hierbij is grootschaliger facilitering van aquathermie/ TED in de praktijk onder veilige condities voor de volksgezondheid.

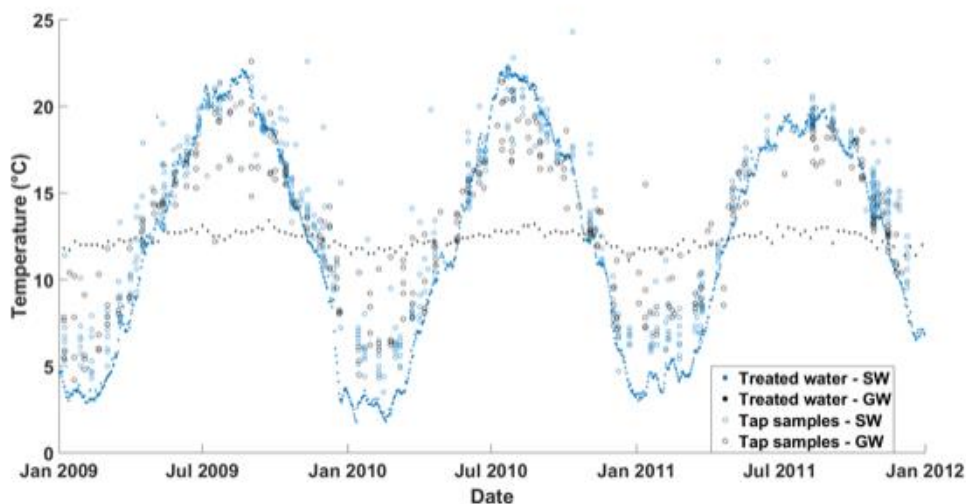
1.3 Samenhang met eerdere rapportage

Dit is deel twee van de rapportage over de TED-proefopstelling gevoed met drinkwater bereid uit oppervlaktewater. In deel één van de rapportage zijn de resultaten van het initiële experiment bij KWR en het eerste experiment in Zuidoostbeemster bij PWN met drinkwater uit oppervlaktewater beschreven (van Bel et al., 2023). In dat onderzoek bleek de temperatuur van de plaatjes, waarop de biofilm zich ontwikkelt en waarin opportunistische ziekteverwekkers zich vermeerderen, soms te hoog waardoor de micro-organismen waarschijnlijk doodgingen. Daarom is dat experiment opgevolgd met een experiment in de winter met hetzelfde water om tot stabielere en niet te hoge temperaturen te komen. De resultaten van deze tweede studie worden in het onderhavige rapport gepresenteerd. Een verdiepende inleiding met meer achtergrondinformatie is dan ook in deel één van deze rapportage terug te lezen. Hieronder worden een aantal punten van die achtergrondinformatie herhaald.

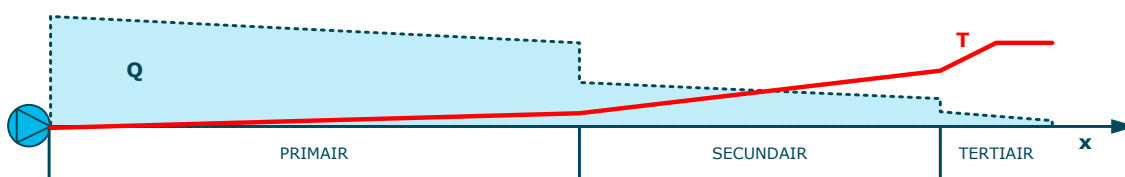
1.4 Drinkwatertemperatuur en TED

De temperatuur van het drinkwater is gedurende het transport in het drinkwaterleidingnet niet constant. Uit onderzoek is gebleken dat het drinkwater de bodemtemperatuur aangenomen heeft wanneer het de klant bereikt (Agudelo-Vera et al., 2020). Dit komt door de warmte-uitwisseling met de bodem tijdens het verblijf in het drinkwaterleidingnet. De invloed van de bodem op de drinkwatertemperatuur is het kleinst in grote transportleidingen en het grootst in leidingen met een kleinere diameter in het drinkwaterleidingnet.

Over het algemeen kan worden aangenomen dat het drinkwater dat aankomt bij de klant de bodemtemperatuur rondom de distributieleiding heeft aangenomen. Dit blijkt ook uit vergelijkingen tussen temperatuurmetingen aan de tap, voor zowel drinkwater gemaakt uit oppervlaktewater, als drinkwater gemaakt uit grondwater (Figuur 1) (Agudelo-Vera et al., 2020). Een schematische weergave van de toename van de temperatuur van drinkwater is weergegeven in Figuur 2.



Figuur 1. Resultaat van temperatuurmetingen aan de tap gedurende een jaar. Voor grondwaterbronnen (GW) is deze temperatuur redelijk constant, voor oppervlaktewaterbronnen (SW) fluctueert deze temperatuur met de seizoenen. De figuur laat goed zien dat de brontemperatuurverschillen bij de klant ("tap samples") niet meer merkbaar zijn; de temperatuur van het water dat geleverd wordt aan de klant heeft de temperatuur van de bodem aangenomen (Agudelo-Vera et al., 2020).



Figuur 2. Schematische weergave verloop volumestroom (Q) en temperatuur (T) in het leidingnet tussen (bovenstrooms) het pompstation en (benedenstrooms) de klant uitgaande van een zomerdag waarbij het drinkwater opwarmt in het leidingnet.

Studies van KWR hebben laten zien dat er in het drinkwaterleidingnet hotspots aan te wijzen zijn; locaties waar het leidingnet warmer is dan gemiddeld (Agudelo-Vera et al., 2017). Dit zijn bijvoorbeeld locaties die altijd in de volle zon liggen, onder asfalt of in de buurt van warmtebronnen, zoals warmtenetten. Bij deze hotspots is anno 2022 al een risico dat de temperatuur van het drinkwater af en toe hoger is dan de wettelijke eis van 25°C. Door de warme bodem is een eventueel positief koelend effect van een TED-installatie op temperatuur van het drinkwater in de zomer lokaal en tijdelijk. TED is dus geen systematische "bron-tot-kraan-oplossing" voor ongewenste opwarming van drinkwater in de zomer door enerzijds klimaatverandering en anderzijds bronnen die warmte uitstralen in de bodem zoals (hoge temperatuur) warmtenetten. Dit betekent ook dat koud onttrekking (opwarming) van drinkwater in de winter in zekere mate mogelijk is zonder dat het een substantiële invloed heeft op de temperatuur

van het drinkwater bij de klant. Lokaal kunnen echter door warmteonttrekking- of toevoeging wel grotere temperatuurfluctuaties optreden, wat mogelijk een effect heeft op de microbiologie in het drinkwater. In grotere (transport)leidingen blijven temperatuurveranderingen langer behouden omdat de invloed van de bodem daar kleiner is. Dit biedt mogelijk kansen om eventuele groei van micro-organismen in specifiek deze leidingen te verminderen door inzet van TED in combinatie met seizoensopslag van warmte (WKO).

1.5 Temperatuur en opportunistische pathogenen

Onder micro-organismen die zich in drinkwatersystemen kunnen vermeerderen kunnen zich ook opportunistische pathogenen bevinden: micro-organismen die bij mensen met een verzwakt immuunsysteem ziekte kunnen veroorzaken. Voorgaande onderzoeken door KWR hebben laten zien dat *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium kansasii*, *Aspergillus fumigatus* en *Stenotrophomonas maltophilia* in Nederlands drinkwater aanwezig kunnen zijn (van der Wielen & van der Kooij, 2011; van der Wielen & van der Kooij, 2013; van der Wielen 2014). Als in Nederlands drinkwater *Legionella* wordt aangetroffen gaat het nagenoeg altijd om *Legionella anisa*, een legionellasoort die slechts sporadisch ziekte veroorzaakt. De meer pathogene *L. pneumophila* komt veel minder vaak voor in drinkwater dan *L. anisa*, maar veroorzaakt wel meer dan 90 tot 95% van de ziektegevallen. Daarnaast is van *L. pneumophila*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* bekend dat drinkwaterisolaten en patiëntisolaten overeenkomen [6, 7], waardoor infectie met deze organismen via drinkwater een reële mogelijkheid is. *Mycobacterium avium* is niet aangetroffen in het Nederlandse drinkwater (van der Wielen & van der Kooij, 2011), maar is wel van belang voor vervolgonderzoek in België gezien mycobacterium daar in het water is aangetoond en is zodoende ook meegenomen in het hier gerapporteerde experiment (Van Assche et al., 2019).

Vaak wordt slechts een deelstroom van het drinkwater met enkele of meerdere graden opgewarmd of afgekoeld. Het effect op de hoofdstroom ter plaatse van de warmtewisselaar is dan kleiner, meestal maximaal 1-2°C. Echter, net als bij hotspots, wordt de biofilm op de warmtewisselaarplaten continu aan hogere temperaturen (dan elders) blootgesteld. Hiermee kan een milieu worden gecreëerd waarin micro-organismen, waaronder opportunistische pathogenen, zich kunnen gaan vermeerderen in de biofilm. Een warmtewisselaar kan daardoor een bron van opportunistische pathogenen worden voor het benedenstrooms gelegen distributienet, en zo een risico voor de volksgezondheid vormen.

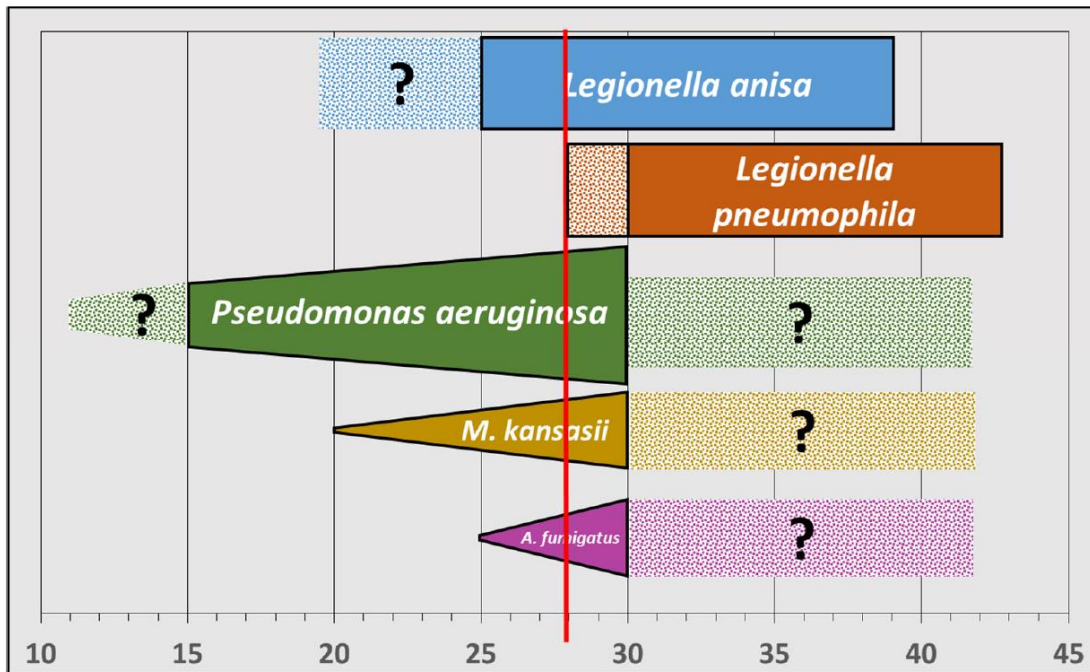
L. pneumophila en *L. anisa*

Van *L. pneumophila* en *L. anisa* is veel bekend over het effect van temperatuur op groei van beide bacteriën onder drinkwatercondities. Legionellabacteriën groeien in het distributiesysteem alleen in de biofilm. *L. pneumophila* kon zich in het laboratorium vanaf 31°C handhaven in de biofilm op PVC-P terwijl *L. anisa* al bij lagere temperaturen (vanaf 25°C) in hoge aantallen in de biofilm voorkwam (van der Kooij et al., 2009; van der Kooij et al., 2010). Tussen 31°C en 37°C groeiden beide legionellasoorten even goed in de biofilm. Als *L. pneumophila* echter eenmaal aanwezig was in de biofilm zorgde een verlaging van de temperatuur naar 25 of 27°C er niet voor dat *L. pneumophila* verdween. Vanaf 38,5°C was *L. anisa* niet meer aanwezig in de biofilm en *L. pneumophila* stierf boven de 43°C af.

P. aeruginosa, *A. fumigatus*, *M. kansasii* en *M. avium*

De invloed van temperatuur op groei van deze opportunistische pathogenen is alleen bekend uit onderzoek naar groei van deze micro-organismen in drinkwaterbiofilms onder statische condities, dat wil zeggen zonder doorstroming maar met wekelijkse verversing van het water (van der Wielen, 2020). In deze experimenten onder statische condities werd een worstcasesituatie nagebootst met glazen monsterflessen met daarin PVC-P materiaal (een materiaal met een relatief zeer hoge groeipotentie), dosering van opportunistische pathogenen en drinkwater. Gedurende 16 weken is bij verschillende temperaturen de groei bepaald. Bij de laagst geteste temperatuur (15°C) kon *P. aeruginosa* al groeien onder deze condities, daardoor is nog niet bekend wat de minimale groeitemperatuur voor *P. aeruginosa* in een drinkwatersysteem is. Voor *A. fumigatus* leek tussen 15°C en 25°C afsterving en groei met

elkaar in evenwicht en pas vanaf 27,5°C namen de aantallen *A. fumigatus* echt toe. Voor *M. kansasii* was bij 15°C en 17,5°C groei en afsterving met elkaar in balans, maar vond vanaf 20°C groei plaats. Ook van *M. avium* is bekend dat deze kan gaan groeien vanaf 20°C uit eerder onderzoek (van der Wielen, 2014b). Voor alle vier de opportunistische pathogenen geldt dat bij toenemende temperaturen hogere aantallen werden waargenomen. Bij een stijging van de drinkwater- of biofilmtemperatuur neemt dus (i) de kans toe dat in het drinkwaterleidingnet opportunistische pathogenen in de biofilm op de drinkwaterleidingen en/of warmtewisselaren gaan groeien en (ii) dat het aantal van deze opportunistische pathogenen verder zal toenemen bij toenemende temperaturen.



Figuur 3. Minimale en maximale groeitemperaturen van opportunistische pathogenen die in dit project worden getest. Van de gearceerde vlakken is niet bekend of de specifieke opportunistische pathogeen bij die temperatuur kan groeien.

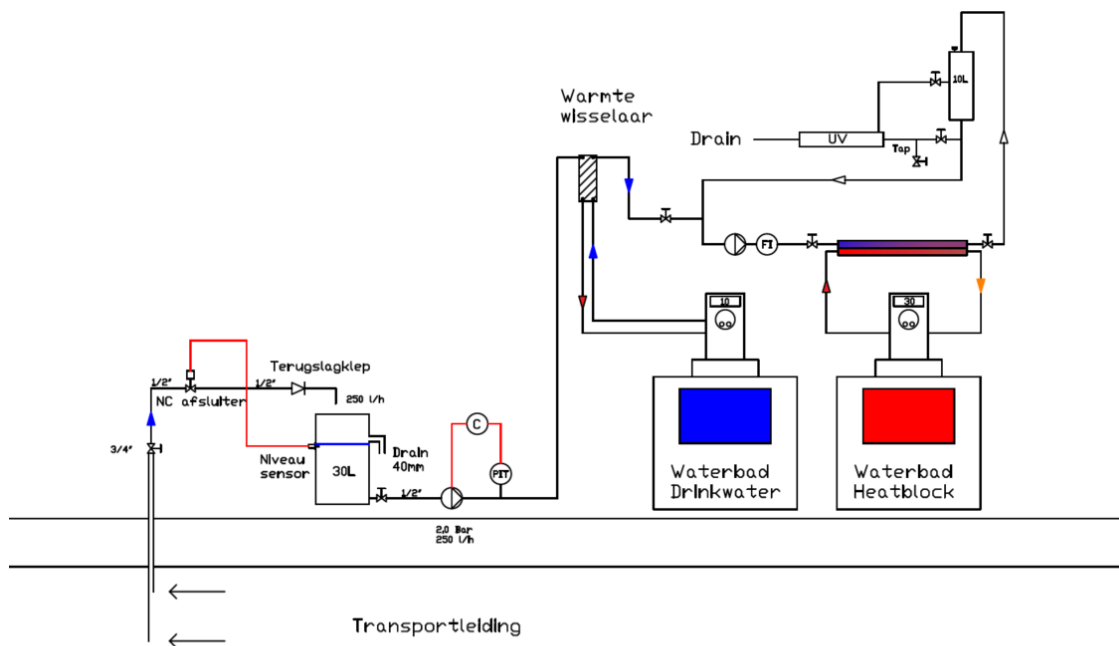
2 Materialen en methoden

Om een warmtewisselaar in het drinkwaterleidingnet na te bootsen zijn flowcellen ontwikkeld met daarin plaatjes van verschillende materialen die ook in een warmtewisselaar worden toegepast. Door de flowcellen stroomt drinkwater met verschillende temperaturen, en waar opportunistische pathogenen aan zijn gedoseerd. Door de biofilm van de plaatjes te bemonsteren en analyseren, kan de groei van de gedoseerde opportunistische pathogenen in de tijd gevolgd worden. Voordat de dosering van de opportunistische ziekteverwekkers werd toegepast, is eerst gedurende 8 weken een biofilm gekweekt op de plaatjes.

2.1 Opzet flowcellen

In de flowcellen stroomt drinkwater over plaatjes van RVS-316 en EPDM, materialen die in warmtewisselaars gebruikt worden, en van PE, een positieve controle. PE is namelijk een materiaal met een relatief hoge biomassaproductiepotentie, dat leidt tot relatief hoge biofilmconcentraties. Via een steeklans wordt continu drinkwater uit een 600 mm transportleiding van PWN onttrokken als voedingswater van de flowcellen. Hierbij wordt alleen water uit het midden en het bovenste deel van de transportleiding bemonsterd om verstopping van de flowcellen met sedimentdeeltjes (die onder in de transportleiding aanwezig zijn) te voorkomen. Het onttrokken water gaat vervolgens door een breaktank om te voorkomen dat water uit de flowcellen terug de transportleiding instroomt.

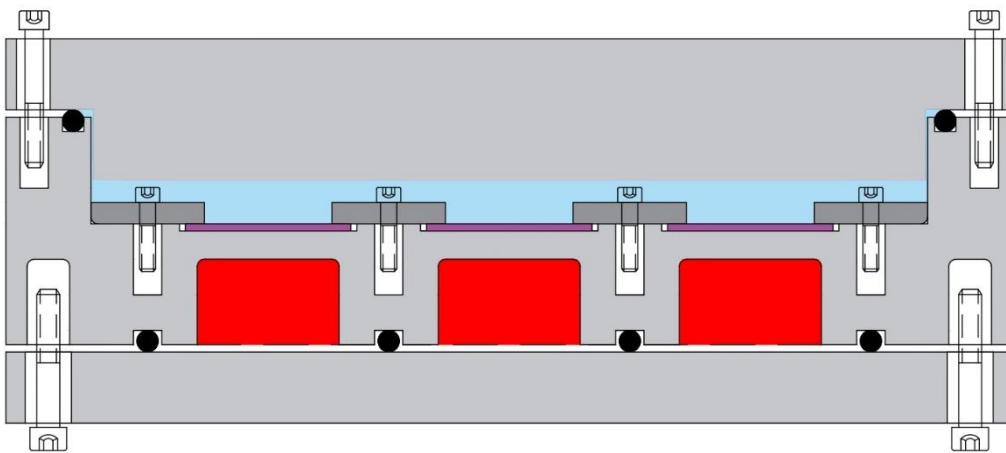
Het drinkwater wordt, voordat het in de flowcellen komt, in een apart circuit op de juiste temperatuur gebracht. Hiervoor wordt proceswater in een waterbad (blauw waterbad in Figuur 4) op de juiste temperatuur gebracht (10°C of 30°C). Dit proceswater van 10°C of 30°C stroomt naar een kleine warmtewisselaar waarmee het inkomende drinkwater op de gewenste temperatuur wordt gebracht. Het drinkwater stroomt daarna door de flowcel waar het vervolgens of kan circuleren of via een UV-lamp op het riool wordt geloosd. Via een heatblock aan de onderkant



Figuur 4: Schematisch overzicht van de opstelling voor één flowcel (blauw-rode rechthoek) met waterbad om het drinkwater op 10°C of 30°C te brengen (blauw waterbad) en een waterbad om het uitgaande water op de juiste temperatuur (17°C, 23°C, 30°C) te brengen (rood waterbad).

van de flowcel wordt het langsstromende drinkwater opgewarmd naar 17°C, 23°C of 30°C. Door het heatblock stroomt water dat in een ander waterbad (rood waterbad in Figuur 4) wordt opgewarmd en na het heatblock weer terugstroomt naar dit waterbad. Beiden waterbaden zijn gesloten circuits en staan niet in direct contact met het drinkwater.

In de flowcel stroomt het drinkwater in een dunne laag van 2-5 mm (blauw in Figuur 5) over de plaatjes (paars in Figuur 5) met een variabele flow van ongeveer 16-34 l/h (Tabel 1). Deze stroomsnelheid werd aangepast om tot de gewenste uitgaande temperatuur te komen. Voor een grotere temperatuurstijging was de flow dus lager ingesteld. Door de flow te gebruiken om de uitgaande temperatuur te reguleren konden de hitteblokken op een constante temperatuur gehouden worden om het risico op oververhitting van de biofilm en afsterving van opportunistische ziekteverwekkers, zoals werd waargenomen in deel 1 van het onderzoek, te vermijden. De plaatjes worden op hun plek gehouden door klemmetjes met schroeven (RVS-316; Figuur 5 en 6).



Figuur 5: Zijaanzicht van een flowcel waarbij je in de stroomrichting kijkt. Rood: warm water dat door het heatblock stroomt. Paars: plaatjes van PE, EPDM of RVS-316 waarop biofilm wordt gevormd. Deze worden op hun plaats gehouden door klemmen met schroeven van RVS-316 (donkergrijs). Over de plaatjes stroomt drinkwater in een laag van 2-5 mm (blauw). De hele flowcel wordt afgesloten met een hermetisch sluitende deksel (bovenste grijze deel).



Figuur 6: Binnenkant van een flowcel met daarin EPDM-plaatjes. In de rechterfiguur is één rij plaatjes verwijderd voor monsternamname. Links vindt de monsternamname plaats.

2.2 Opzet container

De flowcellen werden uiteindelijk in een container geplaatst. Voor de experimenten in de Zuidoostbeemster bij PWN is daarbij een al bestaande container van PWN gebruikt. De container is voor dit onderzoek wel aangepast en verbouwd om de installatie van de flowcellen mogelijk te maken (Figuur 7).

Omdat de container op een parkeerplaats stond en niet beschermd was tegen weersinvloeden (zon, regen, wind, etc.), is de container extra geïsoleerd, is een airco geïnstalleerd en zijn ventilatiegaten geplaatst.

Wanneer de flowcellen op doorstromen stonden ingesteld, werd het drinkwater na passage door de flowcellen geloosd op het riool. Het uitgaande water is voor lozing op het riool gedesinfecteerd middels een UV-lamp, zodat er geen levende opportunistische pathogenen op het riool geloosd werden. Bij circulatie over de flowcellen was de afsluiter (links in Figuur 4) gesloten.



Figuur 7: ZOB-container van PWN waarin de flowcellen waren geïnstalleerd. Rechts achterin (niet in beeld) bevindt zich de steeklans waarmee continu drinkwater uit de onderliggende transportleiding wordt bemonsterd.

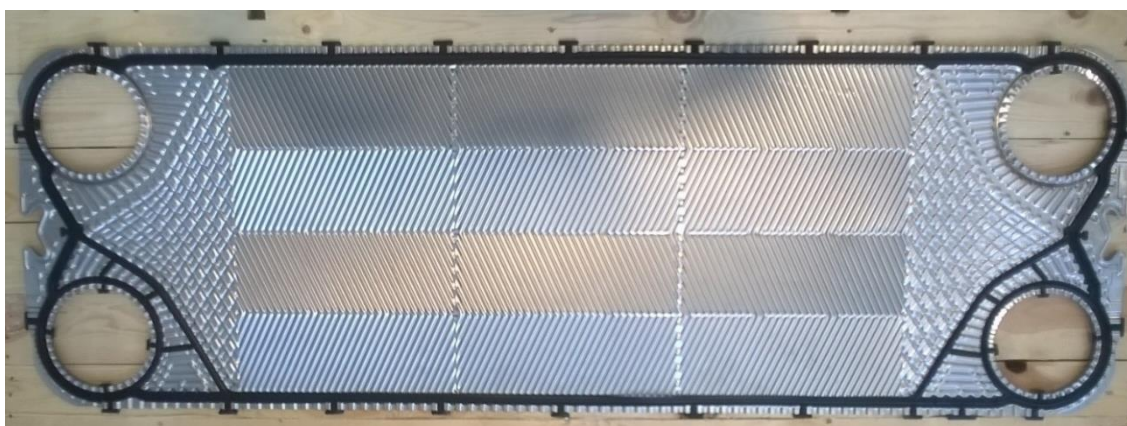
2.3 Opzet experimenten

2.3.1 Temperatuur en materiaal

Voor het experiment zijn temperaturen en materialen gekozen die ook worden gebruikt in fullscale platenwarmtewisselaars in het drinkwaterleidingnet: RVS-316 (platen) en EPDM (pakkingen, afsluiterubbers) (Figuur 8). Via het RVS-316 vindt de uitwisseling van warmte plaats; dit is het grootste oppervlakte van de warmtewisselaarplaten. Afsluiting van de platen gebeurt door pakkingen of afsluiterubbers gemaakt van synthetisch rubber (EPDM), dat in verhouding tot de RVS-316 slechts een klein onderdeel is van de contactoppervlakten voor het passerende drinkwater. Van RVS-316 is bekend dat het geen groeibevorderende stoffen bevat, waardoor er relatief lage biofilmconcentraties op worden gevormd. EPDM, daarentegen, bevat hoge concentraties aan afbreekbare stoffen voor micro-organismen, zodat op dat materiaal relatief hoge biofilmconcentraties worden

gevormd (Moerman et al., 2019). Ondanks het kleine contactoppervlak van EPDM in warmtewisselaars, kan op EPDM vanwege de hoge concentratie afbreekbare stoffen toch relatief veel biofilmbiomassa ontwikkelen, waaronder dus mogelijk ook opportunistische pathogenen. Zeker wanneer een groot aantal warmtewisselaarplaten wordt gebruikt.

Met de keuze van de temperaturen is de situatie nagebootst waarbij in de winter koude uit het water wordt gehaald en het drinkwater dus opwarmt. In Tabel 1 is een overzicht gegeven van de ingestelde drinkwatertemperaturen en materialen die gebruikt zijn. Flowcel 1, met PE als materiaal en een temperatuur van 30°C, dient als positieve controle omdat bij die condities verwacht kan worden dat groei van opportunistische pathogenen plaatsvindt.



Figuur 8: Voorbeeld van een plaat uit een full-scale warmtewisselaar. De plaat zelf is gemaakt van RVS-316, de afsluitrubbers van EPDM.

Met een ingaande drinkwatertemperatuur (water dat de flowcell ingaat) van 10°C werd de drinkwatertemperatuur in de winter nagebootst. Als uitgaande watertemperatuur (water dat de flowcell uitgaat) is gekozen voor 23°C als een worstcasescenario: als er bij deze temperaturen geen groei van opportunistische pathogenen plaatsvindt, kan het drinkwater gedurende langere tijd opgewarmd worden naar 23°C. Omdat het niet realistisch werd geacht dat er bij 23°C geen groei optreedt, is ook een lagere, meer realistische uitgaande temperatuur van 17°C gekozen. Bij deze temperatuur kunnen slechts enkele opportunistische pathogenen onder bepaalde condities gaan groeien (van der Wielen, 2020), maar of dit ook gebeurt onder de condities van een warmtewisselaar is nog onduidelijk.

Tabel 1: Overzicht van de gebruikte flowcellen.

Flowcel	Materiaal	Doel temperatuur		Ingestelde flow (l/h)
		Ingaand	Uitgaand	
1	PE	30°C	30°C	16-30
2	RVS-316	10°C	23°C	24-28
3	EPDM	10°C	23°C	24-30
4	RVS-316	10°C	17°C	27-34
5	EPDM	10°C	17°C	31-32

2.3.2 Monsternamemomenten

Om het mogelijke risico van aquathermie op de microbiologische waterkwaliteit te bepalen, was het belangrijk om inzicht te krijgen of de opportunistische pathogenen bij de hierboven genoemde temperaturen zich in de biofilm konden vestigen en gaan groeien om zo een microbiologische hotspot te vormen. Om hier zekerheid over te krijgen, hebben alle experimenten (KWR en PWN) 16 weken geduurd. Er is voor 16 weken gekozen, omdat kolonisatie en/of groei van de opportunistische pathogenen in de biofilm langzaam kan zijn (van der Wielen, 2020).

Op dag 1 is alleen het uitgaand water bemonsterd (meteen na doseren van opportunistische pathogenen) en uitgaand water en de plaatjes in de flowcel zijn bemonsterd na 1, 2, 4, 5, 6, 8, 12, 16 weken na start van het experiment.

2.3.3 Circulatie en doorstroming

Uit de eerdere experimenten is gebleken dat een periode van circulatie van het water noodzakelijk is om de opportunistische pathogenen de tijd te geven om zich in de biofilm te vestigen (van der Wielen, 2014b; van der Wielen, 2020). Zodoende zijn de flowcellen na aanenting van de opportunistische pathogenen eerst op circulatie gehouden. De opportunistische ziekteverwekkers zijn op dag 0 en op dag 21 gedoseerd (zie 2.4.2). Na de tweede enting hebben de flowcellen nog 14 dagen op recirculeren gestaan, zodat tot en met week 5 het water van de flowcellen is gerecirculeerd. Hierna zijn de flowcellen overgezet naar doorstroming om de praktijksituatie na te bootsen.

2.3.4 Biofilmopbouw

De biofilmopbouw in een warmtewisselaar, bij het in gebruik nemen, of na intensieve schoonmaakacties waarin de biofilm wordt verwijderd, kent drie fasen:

- Nieuwe of intensief schoongemaakte warmtewisselaar zonder aanwezige biofilm;
- Biofilm wordt gevormd tijdens de eerste weken/maanden waarin de warmtewisselaar gebruikt wordt, wat resulteert in een toenemende biofilmconcentratie.
- Na een bepaalde tijd (meestal weken/maanden) is op de platen en andere materialen van de warmtewisselaar een volwassen en in de tijd stabiele biofilm aanwezig.

Dit betekent dat er voor opportunistische pathogenen in de bovenstaande drie fasen verschillende niches in het microbiologische ecosysteem voorkomen waarin groei op kan treden. Zoals eerder beschreven, kunnen sommige opportunistische pathogenen beter een al bestaande biofilm koloniseren (einde van fase 2 en fase 3) en daarin groeien, terwijl anderen in staat zijn om oppervlakken zonder biofilm te koloniseren (fase 1 en begin van fase 2). In het laatste geval kunnen de opportunistische pathogenen de competitie van andere micro-organismen ook weer verliezen wanneer de ontwikkeling van een biofilm verder gaat (einde van fase 2 en fase 3).

In dit experiment zijn de testen uitgevoerd met een al bestaande biofilm, aangezien dit meer representatief zal zijn voor een warmtewisselaar die voor een lange termijn in gebruik is.

2.4 Opportunistische pathogenen

Voor de testen zijn vijf opportunistische pathogenen onderzocht: *L. pneumophila*, *L. anisa*, *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *M. kansasii*. Aanvullende informatie over de gebruikte stam staat vermeld in Tabel 2.

Tabel 2. Opportunistische ziekteverwekkers gebruikt in de studie.

Opp. pathogeen	Stamcode KWR	Bron	Bijzonderheden
<i>L. pneumophila</i>	Lp1/ATCC 22284		
<i>L. anisa</i>	ATCC 35292	Drinkwater USA	
<i>P. aeruginosa</i>	M103998	Nederlands drinkwater	MLST type: ST 712
<i>M. kansasii</i>	Geen	Patiënt	Verkregen van Radboud UMC
<i>M. avium</i>	Geen	Patiënt	Verkregen van Radboud UMC
<i>A. fumigatus</i>	M142650-2	Nederlands drinkwater	Getypeerd met microsatellietenanalyse

2.4.1 Opkweken

P. aeruginosa en *A. fumigatus* zijn opgekweekt in entflessen conform werkinstructie W-009-B. De concentratie van de entflessen is bepaald met kweek. *L. pneumophila* en *L. anisa* zijn opgekweekt op BCYE-agarplaten. Meerdere *Legionella*-kolonies zijn van de agarplaat geoogst en opgelost in een PBS-buffer waarna de concentratie bacteriën is bepaald met flowcytometrie volgens KWR-huisvoorschrift LMB-071 met SYBRgreen en PI kleurstoffen.

Op basis hiervan is de concentratie voor het aanenten van de flowcellen bepaald ($5 \cdot 10^4$ cfu/micro-organisme/flowcel).

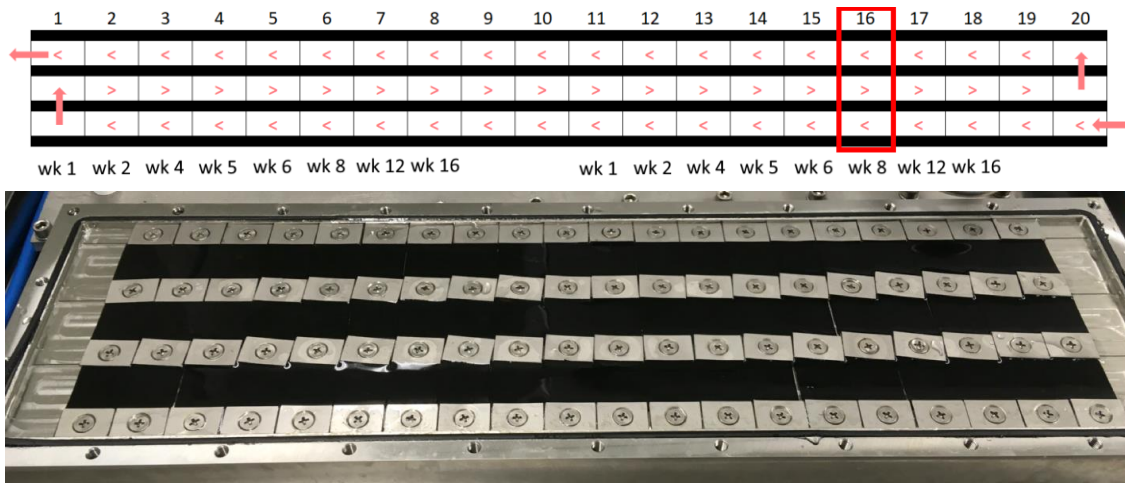
2.4.2 Aanenten

Elk opportunistisch pathogeen is toegevoegd aan het recirculatievat met dezelfde eindconcentraties bij het doseermoment. Na dosering van de bacterieoplossingen aan het recirculatievat hebben de flowcellen twee weken gerecirculeerd. Zo wordt de concentratie opportunistische pathogenen in het water homogeen verdeeld en is er lange contacttijd met de biofilm om de kans van hechting van de opportunistische pathogenen aan de biofilm te vergroten.

De pathogenen zijn tweemaal aangeënt op dag 0 en dag 21. Na twee weken leken beide legionella soorten en *P. aeruginosa* zich nog niet goed te vestigen in de biofilm. Zodoende was besloten om een tweede enting te doen met deze opportunistische pathogenen zodat er een hogere kans was dat er vestiging van de opportunistische pathogenen zou plaatsvinden en de eventuele groei tijdens het experiment gemonitord zou kunnen worden.

2.5 Monstername

Watermonsters zijn genomen uit het recirculatievat, dat wil zeggen na passage door de flowcel. Bij verversing van het water (als de flowcellen op recirculatie staan) is eerst het watermonster genomen en is daarna het water verversd.



Figuur 9: Schematische weergave (boven) en een foto (onder) van de binnenkant van een flowcel. In het schema staat aangegeven welke rijen in welke weken zijn bemonsterd. De drie plaatjes in een kolom vormen samen één monster, zoals de highlight. De pijltjes geven de stroomrichting van het water in het hitteblok weer.

Elke flowcel bevat 20 rijen met elk drie plaatjes (Figuur 9). In Figuur 9 (boven) is aangegeven welke rij in welke week is bemonsterd. Voor bemonstering van de plaatjes zijn eerst de betreffende schroeven losgedraaid die de plaatjes op hun plek houden. Vervolgens is met een steriele pincet het plaatje voorzichtig uit de flowcel gehaald (Figuur 6). De plaatjes zijn direct in steriele potjes met steriel drinkwater gedaan en bij 0 - 4°C vervoerd naar KWR. Bij KWR zijn de plaatjes binnen 24 uur verder behandeld en de betreffende analyses uitgevoerd. De plaatjes die uit de flowcel zijn gehaald zijn vervangen door nieuwe, schone plaatjes van hetzelfde materiaal. Voor de monsternamen worden drie plaatjes verwijderd en gepoold, zoals geïllustreerd in Figuur 9. Door kolommen van plaatjes samen te nemen is de gemiddelde doorstroomtijd van het water in het hitteblok onder de plaatjes consistent als mogelijk over alle monsternamen. Per monsternamen worden twee kolommen verwijderd en vervangen.

2.6 Laboratoriumanalyses

2.6.1 Biofilmbemonstering

De biofilm is van de plaatjes losgetrild met hoge energie sonicatie (HES). Hiervoor zijn drie plaatjes in 120 ml steriel leidingwater overgebracht waarna de HES is toegepast. Het water, met daarin de losgetrilde biofilm, is vervolgens verder in bewerking genomen voor onderstaande microbiologische analyses.

2.6.2 ATP

De ATP-concentratie van de biofilm op de materiaalstukjes werd bepaald volgens NEN-EN 16421-2015 volgens KWR-voorschrift LMB-002.

2.6.3 Kweekmethoden

L. pneumophila en *L. anisa*

Het aantal *L. pneumophila* en *L. anisa* bacteriën werd bepaald conform NEN-EN-ISO 11731, volgens KWR-voorschrift LMB-080. De monsters zijn onbehandeld en met hittebehandeling ingezet. Daarna zijn de monsters geïncubeerd op een selectief kweekmedium (Buffered Charcoal Yeast Extract Agar [BCYE]). De agarplaten werden 7-10 dagen geïncubeerd bij 36°C. De aangetroffen kolonies zijn conform KWR-voorschrift LMB-050 bevestigd met PCR specifiek voor *L. anisa* en *L. pneumophila*.

P. aeruginosa

Het aantal kolonievormende eenheden van *P. aeruginosa* werd bepaald volgens KWR-voorschrift LMB-038, welke is afgeleid van ISO 16266. Het monster is geïncubeerd op een selectief kweekmedium (cetrimide-nalidixic acid agar [CN agar]) waarop *P. aeruginosa* fluorescerende kolonies vormt. De agarplaten werden 48 uur geïncubeerd bij 36°C en na 24 en 48 uur werd het aantal fluorescerende kolonies op de agarplaten bepaald.

A. fumigatus

Het aantal kolonievormende eenheden van *A. fumigatus* werd bepaald op malt extract agar (MEA). Dit medium is specifiek voor (alle) schimmels, maar is selectief voor *A. fumigatus* door de platen te incuberen bij 50°C. De agarplaten werden gedurende 72 uur geïncubeerd bij 50°C. Na 24, 48 en 72 uur werden het aantal kolonies op de agarplaten bepaald.

2.6.4 DNA-isolatie en qPCR

DNA-isolatie

Het DNA is geïsoleerd met de PowerBiofilm™ kit volgens KWR-voorschrift LMB-069. Het geïsoleerde DNA werd geëluëerd in elutiebuffer die meegeleverd werd met de kit.

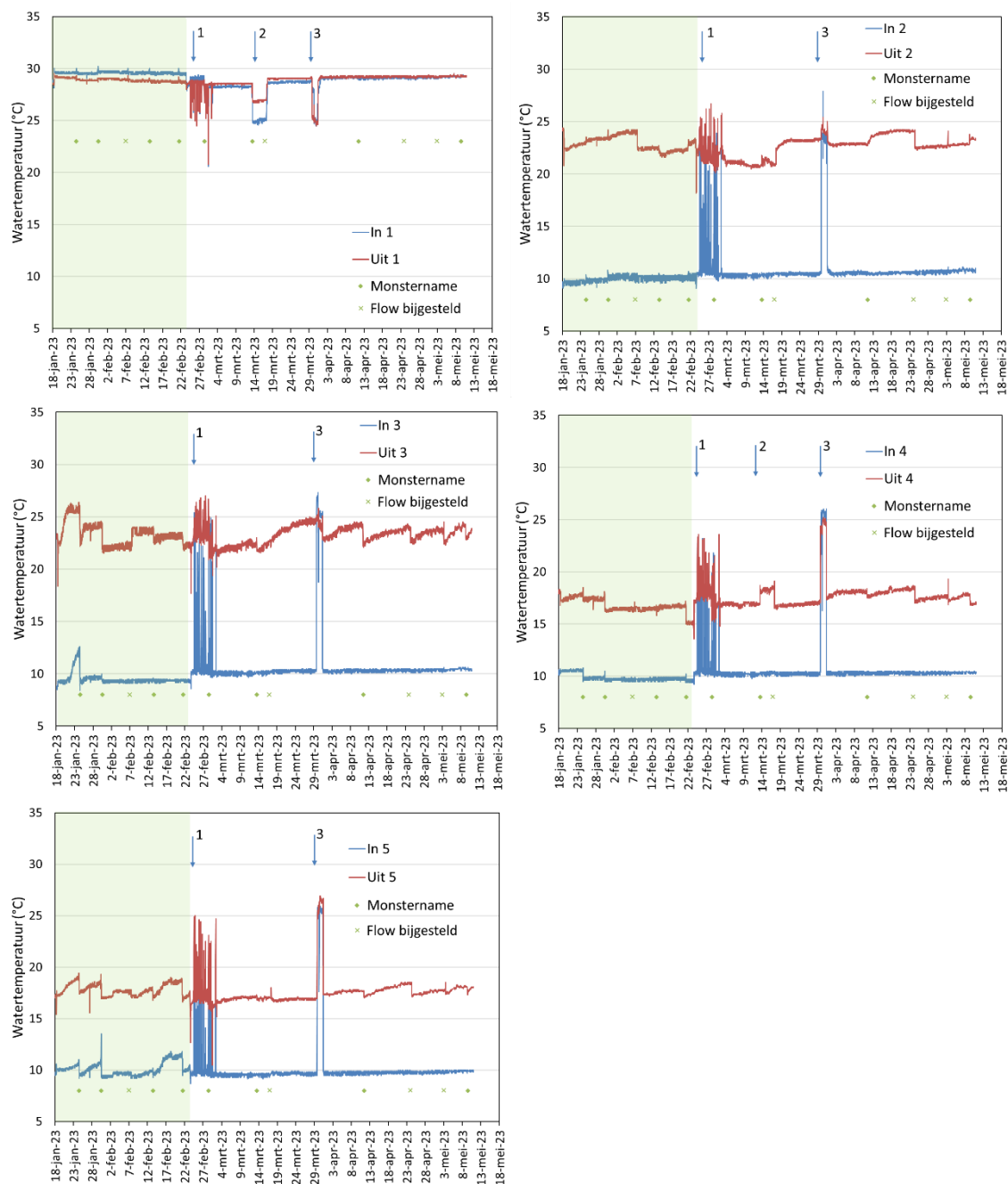
qPCRs

Met meerdere qPCRs is van elk opportunistisch pathogeen het aantal genkopieën DNA bepaald, hiervoor zijn de voorschriften van KWR-voorschrift LMB-065 gebruikt. De qPCR voor *P. aeruginosa* amplificeert specifiek het *regA* gen, de qPCR voor *M. kansasii* amplificeert specifiek het 16S-23S ITS gen, de qPCR voor *M. avium* amplificeert specifiek het 16S rRNA gen en de qPCR voor *A. fumigatus* amplificeert specifiek het 28S rRNA gen. Details over de qPCR-methoden zijn eerder in meer detail beschreven (van der Wielen & van der Kooij, 2013; van der Wielen & Uytewaal-Aarts, 2013).

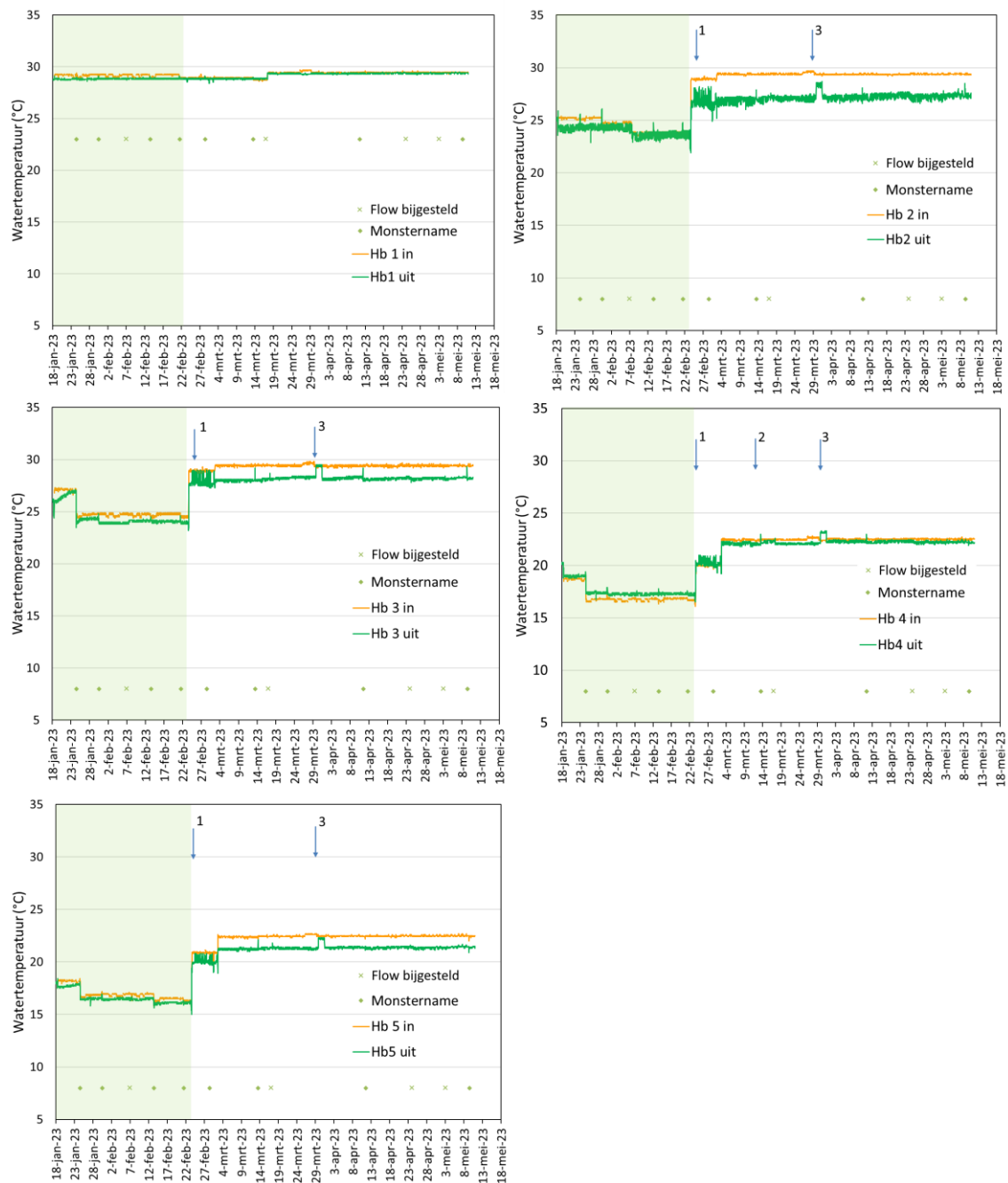
3 Resultaten tweede experiment PWN

3.1 Recirculatie en doorstroming

Gedurende dit experiment hebben de flowcellen langer op circuleren gestaan dan gepland. De metingen na de eerste enting lieten zeer lage concentraties van de legionella soorten en *P. aeruginosa* zien. Hierdoor is besloten om een tweede enting te doen op week 3, waarna de flowcellen nog twee weken op circuleren hebben gestaan om ook de tweede enting de kans te geven om zich te vestigen in de biofilm. Tijdens dit experiment hebben de flowcellen zodoende vijf weken op circuleren gestaan en daarna elf weken op doorstromen.



Figuur 10: In- en uitgaande watertemperatuur in de vijf flowcellen gedurende het experiment. Moment van monsternamen (groene diamanten), flow bijstellen (groene x) en circulatie (lichtgroene vlakken) is aangegeven. Met pijlen en nummers is aangegeven als de oorzaak van vreemde fenomenen in de watertemperatuur bekend is. Uitleg bij de nummers is gegeven in Tabel 3.



Figuur 11: In- en uitgaande watertemperatuur in de vijf hitteblokken gedurende het experiment. Moment van monstername (groene diamanten), flow bijstellen (groene x) en circulatie (lichtgroene vlakken) is aangegeven. Met pijlen en nummers is aangegeven als de oorzaak van vreemde fenomenen in de watertemperatuur bekend is. Uitleg bij de nummers is gegeven in Tabel 3.

3.2 Temperatuur

Gedurende het experiment werd de temperatuur van het uitgaande water gereguleerd door middel van het aanpassen van de stroomsnelheid van het water en werden de temperaturen van de heatblocks constant gehouden. Hoewel deze stroomsnelheden waarschijnlijk minder representatief zijn geweest voor de praktijk, voorkwamen de aangepaste stroomsnelheden een sterke stijging van de temperatuur van de hitteblokken, zodat de biofilm en/of pathogenen niet worden afgedood door een te hoge temperatuur. Wel is de flow turbulent geweest, wat overeenkomt met de praktijk.

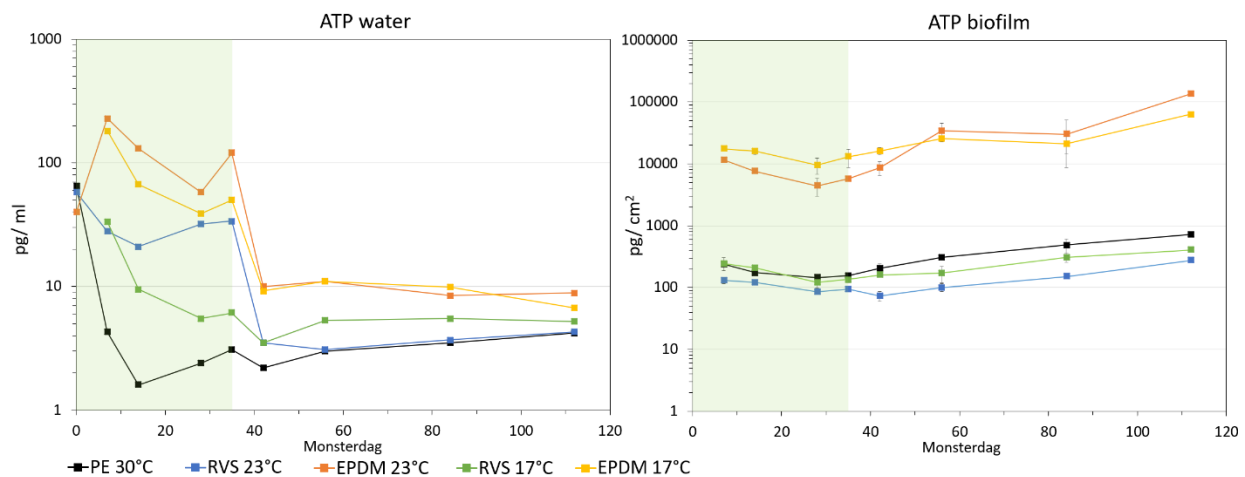
Van elke flowcel werd de temperatuur van het water dat de flowcel inkomt en uitgaat gelogd (Figuur 10). Gedurende het eerste experiment bleek dat de temperatuur van het inkomende drinkwater zodanig steeg dat de waterbaden niet voldoende capaciteit hadden om deze naar 10 graden te brengen. Door het experiment tijdens de winter uit te voeren was het mogelijk om de ingaande temperatuur gedurende het experiment constant op 10°C te houden. Er zijn wel fluctuaties geweest in de uitgaande temperatuur. Een aantal van deze zijn beschreven in Tabel 3. Het bleek lastig om de stroomsnelheden constant te houden, en de daardoor optredende variabele stroomsnelheden is de oorzaak van de fluctuaties in temperatuur. De stroomsnelheden namen gedurende het experiment langzaam af, waardoor de uitgaande temperatuur langzaam omhoogging. De stroomsnelheden zijn bij iedere monsternamen en een aantal keer tussendoor weer aangepast om tot de juiste uitgaande temperatuur te komen (Tabel 1). Hierbij werd gestuurd op een maximale bandbreedte van 1°C onder of boven de gewenste temperatuur, wat grotendeels succesvol is geweest (Figuur 10).

Tabel 3: Bekende oorzaken van grotere afwijkingen in de watertemperatuur. De nummers verwijzen naar de nummers in de grafieken van Figuur 10 en 11.

#	Periode	Oorzaak
1	23 februari tot 2 maart	Storing in de aanvoer pomp na onderhoud aan opstelling en/of overstap naar doorstroming
2	13-17 maart	Probleem met ingestelde flow
3	29-31 maart	Probleem met de voedingspomp, verholpen na vervanging v/d pomp

3.3 ATP

Als maat voor de actieve biomassa zijn ook ATP-metingen gedaan om een beeld te krijgen van een verschil in biofilmvorming in de flowcellen en een verschil in de ATP-concentraties in het uitgaande drinkwater. De resultaten staan weergegeven in Figuur 12. Voor het water lagen de ATP concentraties hoger gedurende de circulatie fase vergeleken met de doorstroming fase. De waarden tijdens de doorstroming fase liggen in de verwachte bandbreedte voor drinkwater, maar die in de EPDM-flowcellen (6.7 – 11 pg/ml) lagen wel hoger dan in de andere flowcellen (2.2 - 5.5 pg/ml). Voor de ATP-concentraties in de biofilm lagen de ATP resultaten iets hoger bij de PE flowcel (145 - 720 pg/cm²) dan de twee RVS flowcellen (85.5 - 405 pg/cm²) voor het grootste gedeelte van het experiment. Voor de EPDM flowcellen lagen de ATP concentraties het hoogst (4400 – 135000 pg/cm²).

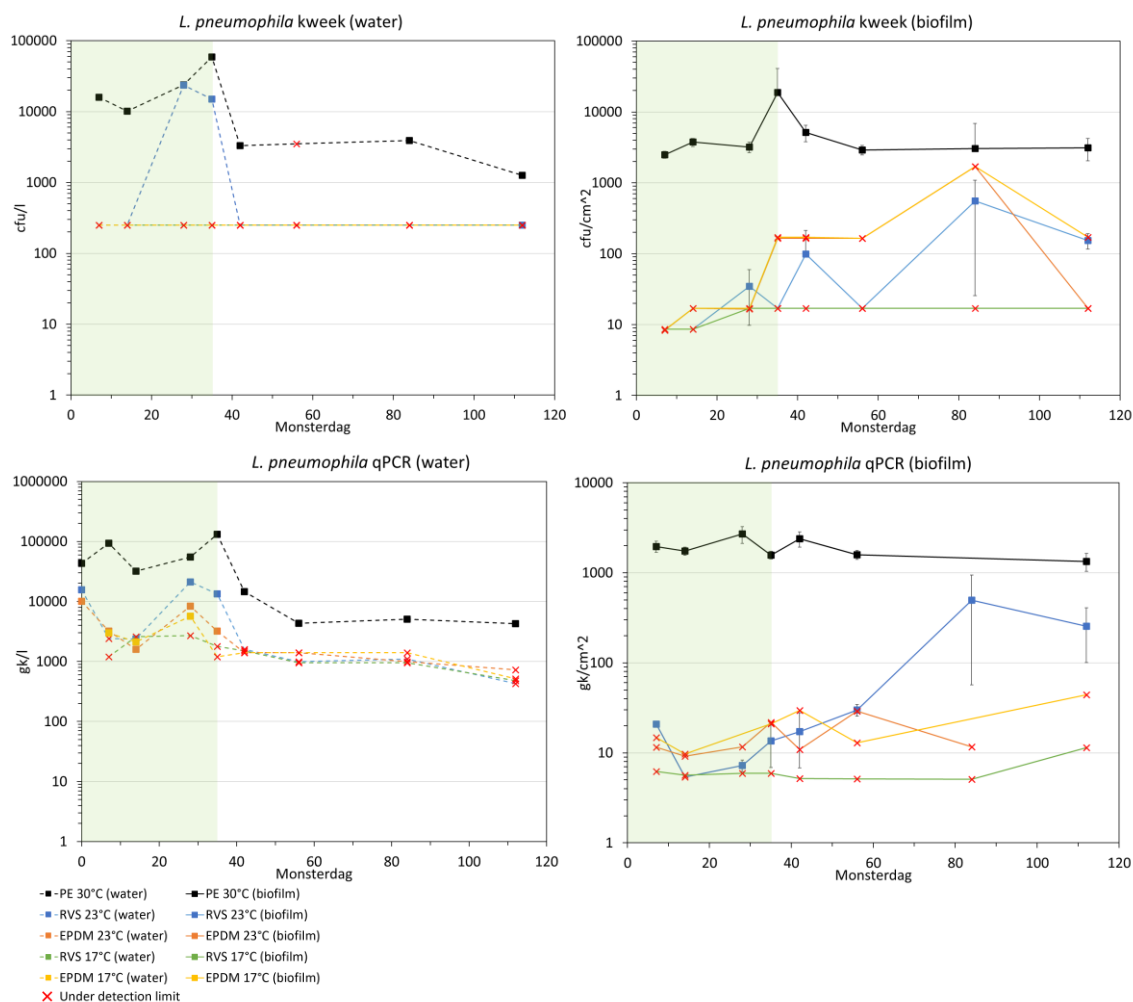


Figuur 12: ATP-concentraties in het uitgaande water en de biofilm op het materiaal in de flowcellen. Met het groene vlak is aangegeven wanneer de flowcellen op circulatie stonden om zo de opportunistische pathogenen aan de biofilm te kunnen laten hechten

3.4 Opportunistische pathogenen

Legionella pneumophila

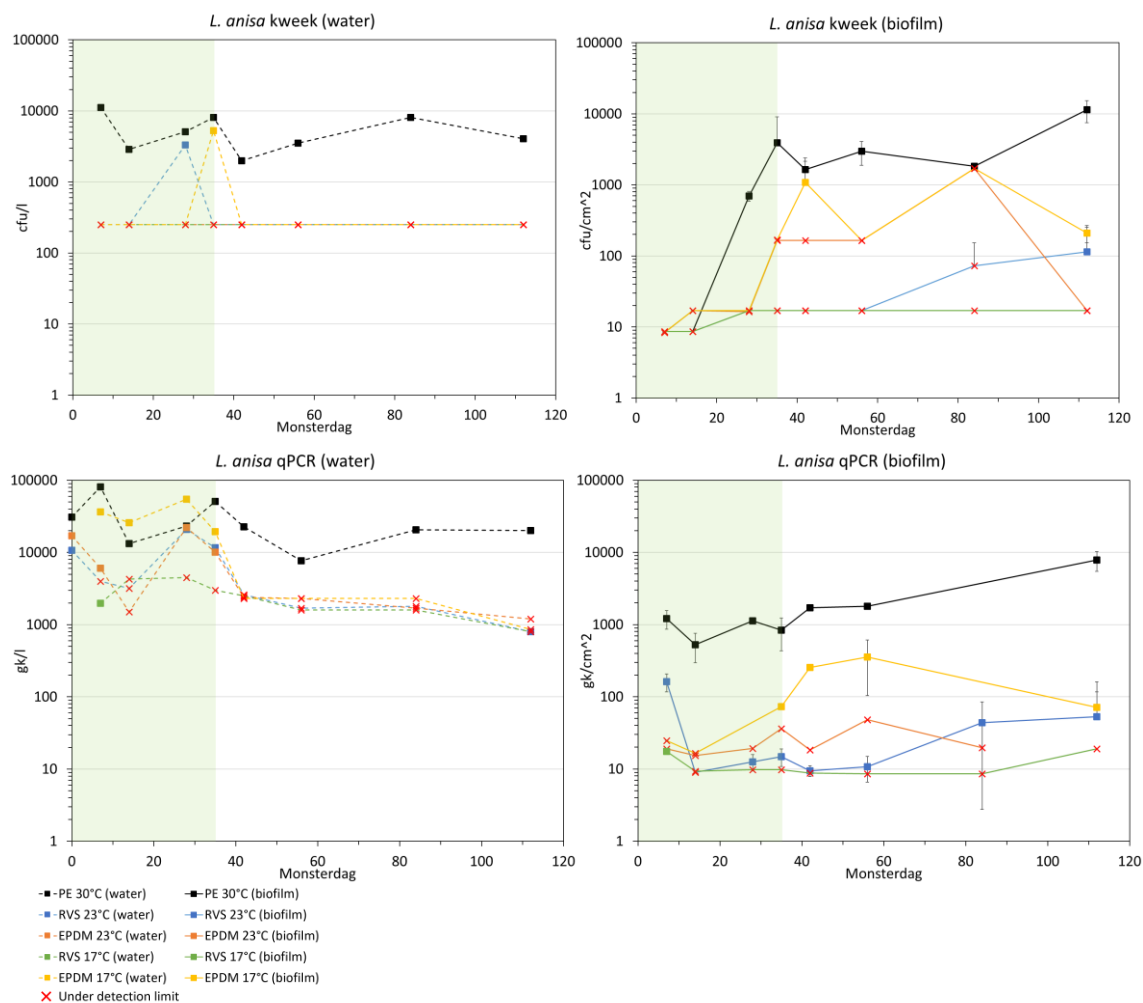
De aantallen kolonievormende eenheden en het aantal genkopieën van *L. pneumophila* waren het hoogst in de positieve controle flowcel 1 (PE, 30 °C) (Figuur 13). Dit positieve resultaat bij de controle geeft aan dat het flowcel systeem inderdaad geschikt is voor de groei van *L. pneumophila*. Alleen in flowcel 2 (RVS, 23°C) werd *L. pneumophila* ook gedetecteerd in de biofilm met de kweek en qPCR. Doordat de detectielimiet van *Legionella* met de kweek erg hoog was, is het met alleen de kweek gegevens niet duidelijk of *L. pneumophila* ook aanwezig was in de andere flowcellen, maar de qPCR resultaten wijzen daar niet op. In flowcel 2 (RVS, 23°C) nam de concentratie *L. pneumophila* ook toe gedurende het experiment van 7 gk/cm² in week 6 tot 500 gk/cm² in week 12 en 250 gk/cm² in week 16. Bij de andere flowcellen (3, 4 en 5) was de concentratie *L. pneumophila* onder de detectielimiet. Dit was echter ook gedurende circulatie, dus wellicht heeft *L. pneumophila* zich niet kunnen vestigen in de biofilm op deze flowcellen. In het water was alleen in flowcel 1 (PE, 30 °C) *L. pneumophila* gedetecteerd tijdens doorstroming. Tijdens circulatie is wel nog *L. pneumophila* gedetecteerd in flowcel 2 (RVS, 23°C) met kweek en ook flowcel 2, 3 en 5 met de qPCR.



Figuur 13: Aantallen *Legionella pneumophila* in water en de biofilm, bepaald met de kweekmethode en qPCR. Rood kruisje: resultaat onder de detectielimiet, het kruisje geeft de waarde van de detectielimiet aan. Met het groene vlak is aangegeven wanneer de flowcellen op circulatie stonden om zo de opportunistische pathogenen aan de biofilm te kunnen laten hechten.

Legionella anisa

De hoogste aantallen *L. anisa* werden gemeten in flowcel 1 (PE, 30°C) waar zowel het aantal kolonievormende eenheden en genkopieën in het water en de biofilm gedurende het experiment het hoogst waren (Figuur 14). Dit positieve resultaat bij de controle (0,8 – 7,8 x 10³ gk/cm², 0,39 - 1,1 x 10⁴ cfu/l voor de biofilm) geeft aan dat het flowcel systeem inderdaad geschikt is voor de groei van *L. anisa*. Bij flowcel 5 (EPDM, 17°C) werd een hogere concentratie *L. anisa* gevonden in de biofilm (71 – 356 gk/cm², 210-1085 cfu/l) dan in de biofilm van flowcel 2 (RVS 23°C) (9-53 gk/cm², 73-114 cfu/l). In flowcel 3 en 4 waren de genkopieën onder de detectielimiet. In het water kon alleen voor flowcel 1 (PE, 30°C) *L. anisa* gedetecteerd worden tijdens doorstroming (0,76 – 5,1 x 10⁴ gk/cm², 2 - 8,1 x 10³ cfu/l). Tijdens doorstroming konden in de andere flowcellen ook op één of meerdere momenten *L. anisa* in het water worden gedetecteerd.

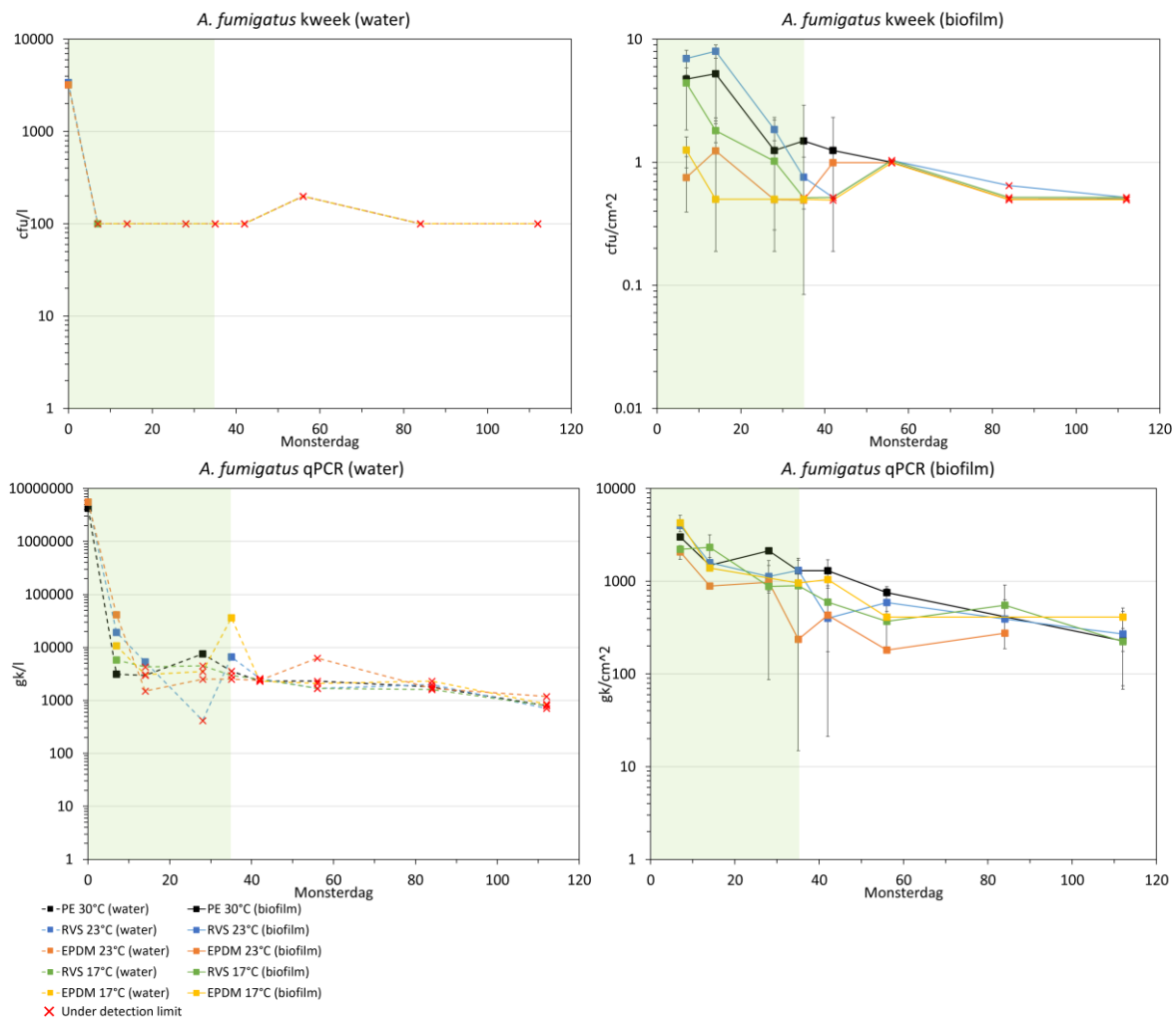


Figuur 14: Aantallen *L. anisa* in het water en de biofilm, bepaald met de kweekmethode en qPCR. Rode kruisjes: resultaat onder de detectielimiet. Het kruisje geeft de detectielimiet weer. Met het groene vlak is aangegeven wanneer de flowcellen op circulatie stonden om zo de opportunistische pathogenen aan de biofilm te kunnen laten hechten.

Aspergillus fumigatus

In de biofilm werd *A. fumigatus* gedetecteerd in alle flowcellen met qPCR en kweek gedurende de circulatieperiode (Figuur 15). De aantallen die met kweek werden aangetroffen in de biofilm tijdens de recirculatieperiode waren echter laag en tijdens de recirculatieperiode waren de aantallen meestal al tot onder de detectiegrens van ongeveer 1 kve/cm² gedaald, ook in de positieve controle met PE-materiaal en 30°C. Na de start van de doorstroming bleven de aantallen in de kweek tot onder de detectielimiet. *A. fumigatus* kon wel worden gekwantificeerd in de biofilm van alle flowcellen met qPCR. De genkopieën per cm² namen echter wel gestaag af

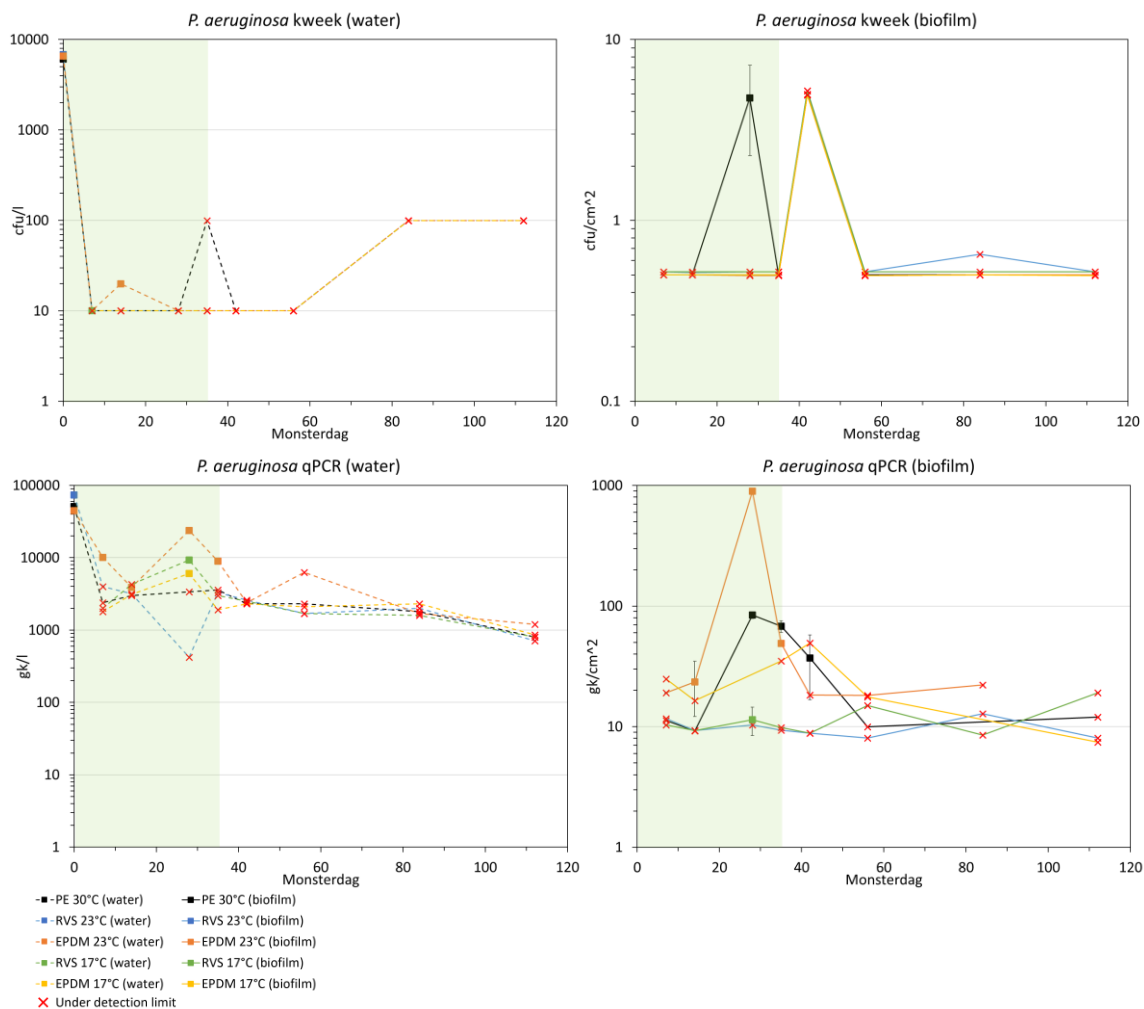
tijdens het experiment in alle flowcellen, dus ook in de positieve controle. In het bemonsterde water kon *A. fumigatus* niet gedetecteerd worden boven de detectielimiet met de kweek methode in alle metingen met uitzondering van direct na de enting en voor de qPCR was de genkopieënconcentratie onder de detectielimiet na start van de doorstroming in alle flowcellen. Deze resultaten wijzen erop dat *A. fumigatus* zich wel succesvol heeft kunnen vestigen, maar dat groei van *A. fumigatus* niet is opgetreden in de verschillende flowcellen. Doordat groei ook niet is opgetreden in de flowcel met PE bij 30°C (positieve controle) kunnen er geen uitspraken worden gedaan in hoeverre de flowcellen met EPDM of RVS groei van *A. fumigatus* stimuleren.



Figuur 15: Aantallen *A. fumigatus* in het water en de biofilm, bepaald met de kweekmethode en qPCR. Rode kruisjes: resultaat onder de detectielimiet. Het kruisje geeft de detectielimiet weer. Met het groene vlak is aangegeven wanneer de flowcellen op circulatie stonden om zo de opportunistische pathogenen aan de biofilm te kunnen laten hechten.

Pseudomonas aeruginosa

Tijdens de circulatieperiode werd *P. aeruginosa* alleen gedetecteerd met qPCR in de biofilm van flowcel 1 (PE, 30°C), 3 (EPDM, 23°C) en 4 (RVS, 17°C) (11 - 897 gk/cm²). Na de start van de doorstroming werd *P. aeruginosa* alleen eenmalig gedetecteerd in flowcel 1 (PE, 30°C) met qPCR (37 gk/cm²) in week 6 (Figuur 16), maar in alle andere biofilm- en watermonsters lagen zowel de aantallen kolonievormende eenheden als genkopieën van *P. aeruginosa* onder de detectiegrens. Dit wijst erop dat *P. aeruginosa* zich waarschijnlijk niet goed heeft kunnen vestigen in de biofilm in alle flowcellen. Wellicht was er een iets betere vestiging bij PE op 30°C, waarna het alsnog de competitie met de andere micro-organismen heeft verloren. Doordat groei ook niet is opgetreden in de flowcel met PE bij 30°C (positieve controle) kunnen er geen uitspraken worden gedaan in hoeverre de flowcellen met EPDM of RVS groei van *P. aeruginosa* stimuleren.



Figuur 16: Aantallen *P. aeruginosa* in het water en de biofilm, bepaald met de kweekmethode en qPCR. Rode kruisjes: resultaat onder de detectielimiet. Het kruisje geeft de detectielimiet weer. Met het groene vlak is aangegeven wanneer de flowcellen op circulatie stonden om zo de opportunistische pathogenen aan de biofilm te kunnen laten hechten.

Mycobacterium avium

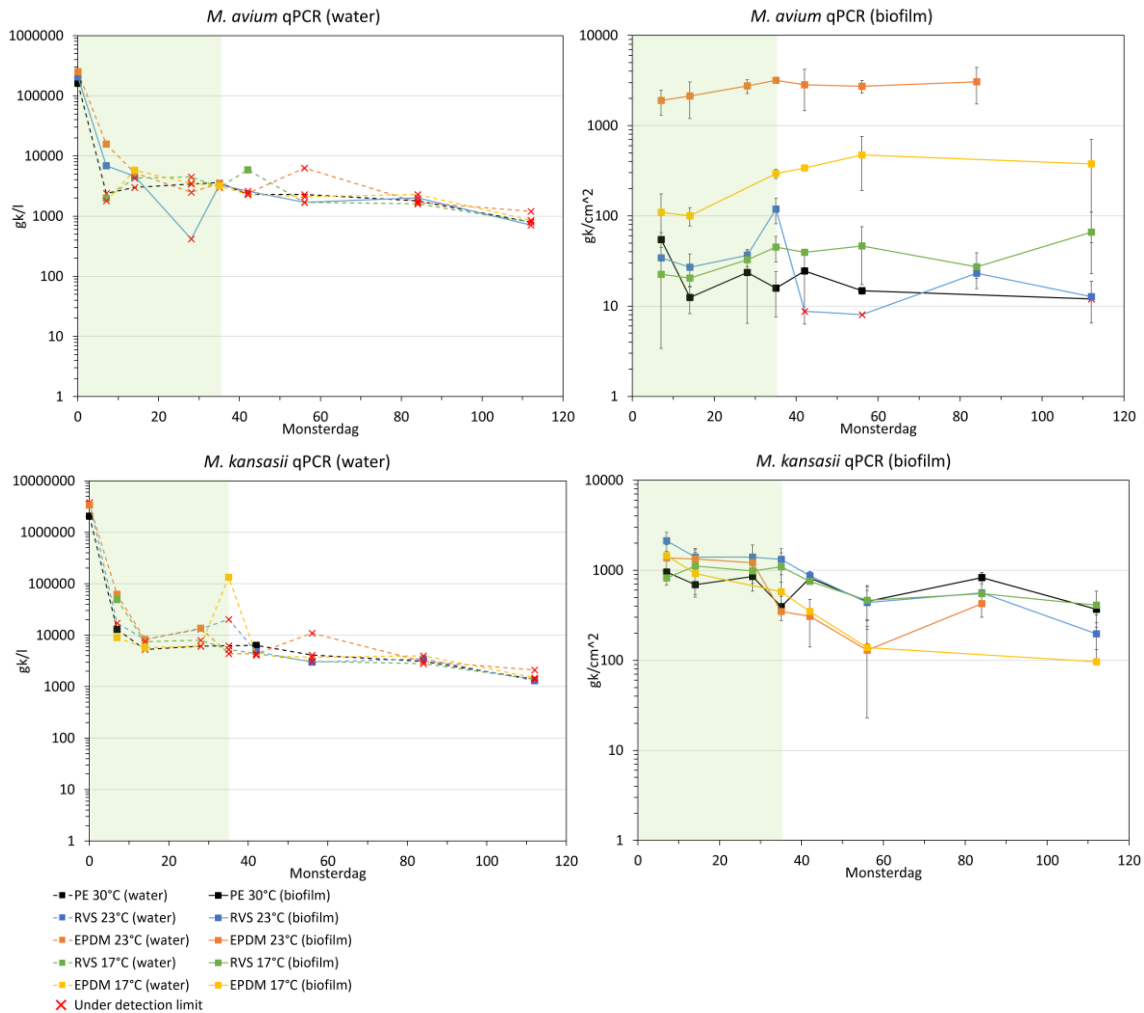
Voor *M. avium* was er een duidelijk effect van materiaal en temperatuur te zien op de gemeten genkopieën in de biofilm met aantallen die stabiel bleven tijdens doorstroming van de flowcellen. De hoogste aantallen waren gemeten bij flowcel 3 (EPDM, 23°C) ($2,7 - 3,1 \times 10^3$ gk/cm²) gevolgd door flowcel 5 (EPDM, 17°C) ($3,4 - 4,7 \times 10^2$ gk/cm²) (Figuur 17). De aantallen bij de flowcellen met PE en RVS waren lager (13 – 66 gk/cm²) of onder de detectielimiet. Het gebruik van EPDM leidde tot sterk verhoogde genkopieën *M. avium* en ook de hogere temperatuur had een duidelijk bevorderlijk effect.

In tegenstelling tot de biofilm werd in het water slechts eenmaal *M. avium* gedetecteerd boven de detectielimiet in flowcel 4 (RVS, 17°C) ($5,9 \times 10^3$ gk/l) tijdens doorstroming. De uitwisseling van *M. avium* tussen de water en biofilmfase lijkt zodoende erg laag te zijn. Wellicht zou deze hoger kunnen zijn bij een hogere stroomsnelheid.

Mycobacterium kansasii

Voor *M. kansasii* is het niet met zekerheid te zeggen of er verschillen zijn in de genkopieënconcentratie tussen de verschillende flowcellen. In week 6 en 8 lagen de concentraties in beide EPDM-flowcellen lager ($1,3 - 350$ gk/cm²) dan in de PE en RVS-flowcellen ($4,4 - 870$ gk/cm²), echter was de standaarddeviatie ook hoog, dus het is niet te concluderen of er daadwerkelijk een verschil was. In week 12 werd een vergelijkbare concentraties gemeten in flowcel 3 (EPDM, 23°C) en de PE- en RVS-flowcellen (Figuur 17). De verschillen tussen de concentraties in de RVS en

EPDM-flowcellen bij 17°C en 23°C waren ook verwaarloosbaar, waardoor er ook geen sprake lijkt van een effect van de geteste temperaturen. Voor *M. kansasii* lijkt ook een licht dalende trend aanwezig te zijn over tijd, wat erop wijst dat het zich ofwel niet goed kan vermeerderen en/of de competitie met de andere micro-organismen verloor in het experiment. Doordat groei ook niet is opgetreden in de flowcel met PE bij 30°C (positieve controle) kunnen er geen uitspraken worden gedaan in hoeverre de flowcellen met EPDM of RVS groei van *M. kansasii* stimuleren.



Figuur 17: Concentratie genkopieën van *M. avium* en *M. kansasii* in het water en de biofilm, bepaald met de qPCR. Rode kruisjes: resultaat onder de detectielimiet. Het kruisje geeft de detectielimiet weer. Met het groene vlak is aangegeven wanneer de flowcellen op circulatie stonden om zo de opportunistische pathogenen aan de biofilm te kunnen laten hechten.

4 Discussie

Het doel van het hier beschreven onderzoek was om vast te stellen wat toelaatbare temperaturen zijn in relatie tot vermeerdering van opportunistische ziekteverwekkers voor de inzet van aquathermie/ TED bij drinkwater geproduceerd uit oppervlaktewater. Hierbij spelen meerdere factoren een rol: de temperatuur van het drinkwater, de temperatuur van het water in het secundaire circuit, de materialen die worden gebruikt in de warmtewisselaar, de waterkwaliteit, de kolonisatie van de biofilm en vermeerdering daarin van opportunistische pathogenen.

4.1 Representativiteit

4.1.1 Dosering micro-organismen

De opzet van het onderzoek waarin dosering van relatief hoge aantallen opportunistische pathogenen heeft plaatsgevonden met daarna tijdelijke recirculatie van het water over de flowcellen, komt niet overeen met hoe in de praktijk een warmtewisselaar wordt bedreven. Uit de praktijk is bekend dat de opportunistische ziekteverwekkers die in dit onderzoek zijn gedoseerd uiteindelijk in staat zijn om zich te vermeerderen in biofilms. Vermeerdering kan alleen plaatsvinden als op een bepaald moment een opportunistisch pathogeen zich vanuit het drinkwater in de biofilm vestigt en zich daar gaat vermeerderen. Om dat proces voor dit onderzoek te versnellen, is in de proefinstallatie een worstcasescenario nagebootst met hoge aantallen opportunistische pathogenen gevolgd door tijdelijke recirculatie, zodat zeker is dat de opportunistische pathogenen voldoende mogelijkheden hebben gehad om de biofilm te koloniseren, zodat vervolgens onderzocht kan worden of de opgelegde condities, waarmee de praktijk wordt nagebootst, tot vermeerdering van de opportunistische ziekteverwekkers leidt. Wanneer we niet gedoseerd zouden hebben of met heel lage aantallen, en daarnaast ook met doorstroming in plaats van recirculatie zouden hebben gewerkt, is de kans groot dat het erg lang duurt voordat toevallig voorbijkomende opportunistisch pathogenen de biofilm koloniseren en zich gaan vermeerderen. In een dergelijke opzet zouden dan geen betrouwbare uitspraken gedaan kunnen worden over het mogelijk risico van warmtewisselaars in combinatie met materiaal en temperatuur.

4.1.2 Vorming biofilm voor kolonisatie met opportunistische pathogenen

In dit experiment is ervoor gekozen om eerst een natuurlijke biofilm te laten vormen in de flowcellen voor het doseren met opportunistische pathogenen. Dit zal representatief zijn voor bijna de gehele levensduur van een warmtewisselaar in de praktijk, met uitzondering van een korte periode (weken) na plaatsing. Deze keuze heeft wel invloed gehad op de resultaten aangezien *P. aeruginosa* moeite heeft zich te vestigen in een bestaande biofilm (Bressler et al., 2009; Doğruöz et al., 2009). Zoals uitgelegd was een onmiddellijke dosering van *P. aeruginosa* (en andere opportunistische pathogenen) minder representatief voor de levensduur van de warmtewisselaar.

4.2 Invloed van temperatuur

Hoewel de temperatuur van het uitgaande drinkwater (17 of 23°C) tegen de ondergrens van de minimale groeitemperatuur van de verschillende opportunistische pathogenen ligt, is ook de temperatuur van het heatblock van belang aangezien de biofilm ook aan deze temperatuur wordt blootgesteld. De temperaturen van het heatblock lagen gedurende doorstroming tussen 26°C en 29°C voor flowcel 2 (RVS, 23°C) en 3 (EDPM, 23°C) en tussen de 20°C en 23°C voor flowcel 4 (RVS, 17°C) en 5 (EPDM, 17°C). Een effect van de temperatuur op vermeerdering van opportunistische pathogenen werd gezien voor *L. pneumophila* en *M. avium*. Voor *L. pneumophila* werd naast de positieve controle (flowcel 1) alleen in flowcel 2 gedetecteerd. Voor *M. avium* was de concentratie genkopieën duidelijk verhoogd in flowcel 3 (EDPM, 23°C) t.o.v. flowcel 5 (EPDM, 17°C). De

uitzondering was *L. anisa* waarbij flowcel 5 (EPDM, 17°C) initieel meer genkopiesen werden gedetecteerd (met uitzondering van de positieve controle flowcel 1), maar aan het einde van het experiment was dit gelijk met flowcel 2 (RVC, 23°C).

Uit eerdere onderzoeken is bekend dat temperatuur een grote invloed heeft op de groei van deze opportunistische pathogenen. Voor *L. pneumophila* is bekend dat groei optreedt vanaf 31°C, maar dat deze bacterie zich wel kan handhaven bij lagere temperaturen, in ieder geval tot 25°C (van der Kooij et al., 2009; van der Kooij et al., 2010). Groei bij in de flowcel op 23°C is zodoende opvallend, maar kan veroorzaakt zijn door de temperatuur in het heatblock van ongeveer 26-29°C. In combinatie met de groei in de positieve controle flowcel op 30°C is het aannemelijk dat 29-30°C inderdaad voldoende is voor groei van *L. pneumophila*. Door de schommeling van de temperatuur kan deze grens ook wellicht bij de 26°C liggen, maar dat is niet met zekerheid te zeggen. Kleine temperatuur verschillen tussen flowcel 2 en 3 kunnen eventueel ook een verklaring zijn waarom *L. pneumophila* wel in de RVS flowcel op 23°C is gegroeid, maar niet in de flowcel met EPDM.

L. anisa kan al op lagere temperaturen groeien (vanaf 25 °C) (van der Kooij et al., 2009; van der Kooij et al., 2010). Hier is de groei in een flowcel op 17°C zodoende ook opvallend en waarschijnlijk veroorzaakt door de temperatuur van het heatblock van 20-23°C. In combinatie met de groei in een flowcel op 23°C is het aannemelijk dat 23°C voldoende is voor groei van *L. anisa*. Deze grens is door temperatuurschommelingen niet exact te bepalen en zou zodoende ook meer richting de 20°C kunnen liggen, maar dat is niet exact te bepalen op basis van de huidige data.

Voor *A. fumigatus* is bekend dat toenemende aantallen pas gevonden worden bij een temperatuur boven de 25°C en dat tussen 15°C en 25°C groei en afsterving in evenwicht zouden kunnen zijn (van der Wielen, 2020). In dit experiment is er geen groei gevonden van *A. fumigatus* in de verschillende flowcellen, hoewel zeker in de positieve controle de temperatuur voldoende zou zijn geweest. Hierdoor is het niet mogelijk de invloed van temperatuur op *A. fumigatus* te bepalen in een warmtewisselaar op basis van dit experiment.

Van *P. aeruginosa* is bekend dat deze zich vanaf 15°C graden kan vermeerderen en een hogere temperatuur in ieder geval tot de 30°C bevorderlijk is voor de groei (van der Wielen, 2020). Alle flowcellen in dit experiment vallen binnen dit temperatuur bereik. Echter is er geen groei van *P. aeruginosa* gedetecteerd, waardoor het niet mogelijk de invloed van temperatuur op *P. aeruginosa* te bepalen in een warmtewisselaar op basis van dit experiment.

Bij *M. avium* is bekend dat groei kan optreden vanaf 20°C (van der Wielen, 2014b). Dit kan verklaren waarom er groei heeft opgetreden bij flowcel 5, aangezien daar het heatblock de vereiste temperatuur behaald. Een hogere temperatuur was ook duidelijk bevorderlijk voor de groei van *M. avium* in lijn met eerdere bevindingen (van der Wielen, 2014b).

Ook bij *M. kansasii* is eerder gevonden dat groei kan optreden vanaf 20°C en dat aantallen toenemen bij een toenemende temperatuur naar 30°C (van der Wielen, 2020). In dit experiment is er geen groei gevonden van *A. fumigatus* in de verschillende flowcellen, hoewel zeker in de positieve controle de temperatuur voldoende zou zijn geweest. Hierdoor is het niet mogelijk de invloed van temperatuur op *A. fumigatus* te bepalen in een warmtewisselaar op basis van dit experiment.

4.3 Invloed van materiaal

Naast temperatuur speelt het materiaal ook een belangrijke rol bij de vorming van biofilm en groei van opportunistische pathogenen doordat het een bron van voedingsstoffen kan zijn. Hierbij verhoogt RVS niet de biofilmconcentratie doordat het geen voedingsstoffen afgeeft. EPDM geeft wel voedingsstoffen af en veroorzaakt daardoor sterk verhoogde biofilmconcentraties (van der Kooij & Veenendaal, 2007). In relatie daarmee is ook waargenomen dat *L. pneumophila* zich tot hogere aantallen weet te vermeerderen in de biofilm op EPDM dan in de

biofilm op RVS (van der Kooij & Veenendaal, 2007). Over het algemeen is er een goede relatie tussen de BPP-waarde van materiaal en *L. pneumophila* aantallen (Learbuch et al., 2019). Ook is eerder gevonden dat een BPP-waarde van 400 pg ATP/cm² een grenswaarde kan zijn voor de groei van *L. pneumophila* (Learbuch, 2016). Voor *L. pneumophila* werd dit effect echter niet waargenomen in dit onderzoek. *L. pneumophila* is juist alleen gedetecteerd in flowcel 2 (RVS, 23°C) (met uitzondering van de positieve controle flowcel 1).

Een effect op vermeerdering van de opportunistische ziekteverwekkers door het type materiaal werd voornamelijk gezien bij *M. avium* waarbij de biofilm in de flowcellen met EPDM (flowcel 3 en 5) meer genkopieën van *M. avium* bevatte dan die met RVS (2 en 4). De flowcellen met EPDM bevatte ook meer genkopieën dan de positieve controle met PE. De BPP-waarde van EPDM is ook hoger dan van PE, wat dit verschil kan verklaren. Dit was ook duidelijk terug te zien in de gemeten ATP concentraties van de biofilm die voor EPDM gemiddeld een factor 85x hoger waren dan de PE flowcel en gemiddeld 160x hoger dan de RVS flowcellen. Een materiaal waar veel voedingsstoffen bij vrijkomen lijkt zodoende een vereiste voor *M. avium*. Echter wordt *M. avium* wordt over het algemeen niet gedetecteerd in Nederlands drinkwater (van der Wielen & van der Kooij, 2011; van der Wielen et al., 2020), maar is wel gedetecteerd in geproduceerd drinkwater in Vlaanderen (Van Assche et al., 2019). Ondanks missende detectie kan niet worden uitgesloten dat *M. avium* ook voorkomt in Nederland en lijkt het gebruik van een materiaal met lage BPP-waarde dan ook een goede voorzorgsmaatregel.

Ook bij *L. anisa* bevatte flowcel 5 (EPDM, 17°C) initieel meer genkopieën in de biofilm, maar dit was bij de laatste meting gedaald naar het niveau in flowcel 2 (RVS, 23°C).

M. kansasii werd initieel ook minder gedetecteerd in de flowcellen met EPDM (flowcel 3 en 5), maar dit was bij de laatste meting(en) weer gelijkaardig met de RVS flowcellen.

Een effect van BPP-waarden van materialen op de groei van opportunistische pathogenen is ook bekend uit eerder onderzoek. Eerder is gevonden dat EPDM kan leiden tot hogere aantallen *M. avium* en *P. aeruginosa*. Ook PVC-P, een ander materiaal met een hoge BPP-waarde, kan leiden tot hogere aantallen *M. avium*, *A. fumigatus* en *P. aeruginosa* (van der Wielen & Bereschenko, 2016). Deze trend wordt ook weer gevonden in dit onderzoek. Het gebruik met materialen met hoge BPP-waarden is zodoende zeker een risico voor de groei van opportunistische pathogenen.

4.4 Invloed van waterkwaliteit

De experimenten bij PWN zijn uitgevoerd met drinkwater geproduceerd op Andijk. Hiervan is bekend dat de biologische stabiliteit van het drinkwater relatief laag is in vergelijking met andere productielocaties in Nederland (van der Wielen, 2018). Voor *L. pneumophila* is bekend dat drinkwater met een hogere groeipotentie kan leiden tot hogere aantallen. Ook kan de aanwezigheid van ijzer groei van *L. pneumophila* stimuleren zolang de concentraties niet toxisch worden (States et al., 1985). Deze combinatie kan wellicht verklaren waarom er bij flowcel 2 (RVS, 23°C) *L. pneumophila* is aangetoond. Of *L. pneumophila* ook zou hebben kunnen groeien in de RVS flowcel bij een locatie met biologisch stabiel water is niet uit te sluiten, maar zou wel interessant zijn om verder te onderzoeken. Ook voor *P. aeruginosa* was in een eerder experiment meer groei gevonden in drinkwater met een lagere biologische stabiliteit t.o.v. een drinkwater met hogere biologische stabiliteit. In deze studie waren ook *M. avium* en *M. kansasii* meegenomen die geen groei vertoonden in beide waters (van der Wielen., 2014). Verder onderzoek naar de impact van biologische stabiliteit op de verschillende opportunistische pathogenen zou interessant zijn.

4.5 Vergelijking met eerste experiment PWN

De temperatuurregulatie was verbeterd voor het tweede experiment bij PWN in vergelijking met het eerste experiment bij PWN doordat het ingaande water beter op temperatuur gehouden kon worden en de regulatie van het uitgaande water door middel van de flow is gedaan i.p.v. de temperatuur van het heatblock, welke op een vaste temperatuur was gezet. Hierdoor zijn tijdens het tweede experiment geen excessieve temperaturen gemeten die de biofilm negatief beïnvloeden kunnen hebben en wat wel het geval was in het eerste experiment. Hierdoor kunnen de resultaten tussen het eerste en tweede experiment niet één op één vergeleken worden, maar een vergelijking tussen sommige waargenomen trends kan wel worden gemaakt. De resultaten van het eerste experiment werden eerder gerapporteerd (van Bel et al., 2023).

- De gemeten ATP-concentraties in beide experimenten zijn enigszins vergelijkbaar, wat ook te verwachten was gezien het gebruik van dezelfde materialen.
- *L. pneumophila* werd in beide experimenten alleen in de RVS 23°C flowcel gedetecteerd (naast de positieve controle) gedurende doorstroming. Een hogere temperatuur lijkt dus inderdaad sterk bepalend voor de groei van *L. pneumophila*.
- *L. anisa* werd nagenoeg niet gedetecteerd bij het eerste experiment, ook niet in de positieve controle, maar wel bij het tweede experiment bij PWN. Dit verschil zou kunnen komen door het verschil in de bedrijfsvoering van de temperatuur.
- *A. fumigatus* leek zich wel redelijk te vestigen gedurende het eerste experiment, maar nam in het tweede experiment langzaam af. Dit verschil zou veroorzaakt kunnen zijn door de lagere heatblocktemperaturen bij het tweede experiment, ook al omdat *A. fumigatus* minder goed in staat lijkt bij temperaturen onder 25°C te groeien, maar wel bij relatief hoge temperaturen kan groeien.
- *P. aeruginosa* kon zich in beide experimenten niet vestigen in een bestaande biofilm.
- De resultaten met *M. kansasii* zijn wat tegengesteld tussen de twee experimenten met verhoogde *M. kansasii* in de EPDM 17°C flowcel tijdens het eerste experiment bij PWN maar niet tijdens het tweede experiment. Ook hier kan de oorzaak het verschil in bedrijfsvoering zijn geweest.

4.6 Implementatie in de praktijk

De temperatuur van flowcel 2 en 3, waar het drinkwater een temperatuur van 23°C had en de heatblock een temperatuur tussen 26 en 29°C, was gekozen als een waarschijnlijk uiterste temperatuurverhoging dat praktisch kan worden toegepast bij aquathermie uit drinkwater. Een drinkwatertemperatuur van 23°C wordt nu ook al (tijdelijk) gehaald in het distributiesysteem, met name in de zomer en op hotspots in het distributiesysteem. Echter, met warmtewisselaars worden de micro-organismen voor een langere periode blootgesteld aan hogere temperaturen.

Voor de groei is niet alleen de temperatuur van het uitgaande water van belang, maar ook de temperatuur van het secundaire circuit in de warmtewisselaar. Dit was ook gebleken uit het eerste experiment (van Bel et al., 2023). De temperatuur van 26 tot 29°C in de heatblocks (uitgaand water 23°C) in twee van de flowcellen heeft wel geresulteerd in groei van sommige opportunistische pathogenen in de biofilm op de materialen. Daarentegen resulteerde gebruik van heatblocks met temperatuur van 20 - 23°C (uitgaand water 17°C) in aanmerkelijk minder groei van opportunistische pathogenen. In de praktijk is de periode van blootstelling aan de temperaturen langer dan gedurende dit experiment en zijn de materiaaloppervlakten (met name die van RVS) groter dan in de proefinstallatie, waardoor verwacht kan worden dat de waargenomen groei van opportunistische ziekteverwekkers in de proefinstallatie ook een risico kan zijn in praktijkinstallaties. Op basis van de resultaten in deze studie zou een temperatuurlimiet van maximaal 23°C gelden voor zowel het water dat langs de warmtewisselaar loopt als het water in het secundaire circuit om langdurige blootstelling van de biofilm aan hogere temperaturen te voorkomen.

Daarbij ook in gedachten te houden dat een lagere temperatuur beter is als dit mogelijk is. Zeker gezien de bekende lagere groeitemperaturen van *P. aeruginosa* (vanaf 15°C) en de geteste mycobacterium soorten (vanaf 20°C).

Het grootste gedeelte van een warmtewisselaar bestaat uit RVS, wat op basis van de resultaten in dit onderzoek geen groot risico vormt wanneer het gebruikt wordt met een maximum van 23°C voor het water en het secundaire circuit. Bij een hogere temperatuur werd groei van *L. pneumophila* gedetecteerd (23°C uitgaand water en 26-29°C heatblock) op RVS, wat betekent dat enkel het gebruik van RVS niet voldoende is om risico's af te dekken en ook de temperatuur van belang blijft. EPDM vormt een veel kleiner onderdeel van de warmtewisselaar, maar kan met verhoogde temperaturen mogelijk een groter risico vormen omdat het relatief veel groeibevorderende stoffen bevat. BPP-waarden voor EPDM kunnen variëren (afhankelijk van meerdere factoren, bijv. grondstoffen), maar waarden van meer dan 10.000 pg ATP/cm² zijn eerder gemeten (van der Wielen & Bereschenko, 2016). De experimenten uitgevoerd in deze studie laten zien dat groei van *M. avium* en *L. anisa* op EPDM inderdaad een risico kan zijn. Ondanks dat EPDM maar een klein gedeelte van de oppervlakte vormt kan dit bij het plaatsen van veel platen toch een groot totaaloppervlakte zijn. Daarnaast kan een kleine lokale bron van opportunistische ziekteverwekkers in de warmtewisselaars voldoende zijn om het drinkwatersysteem benedenstrooms van de warmtewisselaar te inoculeren met deze opportunistische pathogenen. In deze studie is bij de lagere temperatuur (17°C uitgaand water; 20-23°C hitteblok) alleen voor *M. avium* verhoogde aantallen gedetecteerd in een flowcel met EPDM. Bij de hogere temperatuur (23° uitgaande water; 26-29°C hitteblok) waren deze aantallen *M. avium* nog hoger in de flowcel. Op basis van dit experiment lijkt het er dus op dat RVS gebruik in warmtewisselaars een risico kan zijn voor groei van *L. pneumophila* op hoge temperaturen, terwijl EPDM gebruik in warmtewisselaars mogelijk een risico kan zijn voor groei van *M. avium*, maar dat dit ook afhankelijk is van de temperatuur. Echter, als het gebruik hiervan voorkomen kan worden is dat zeer wenselijk om de risico's te minimaliseren. Voor materialen in een warmtewisselaar zouden de BPP-waarden bepaald moeten worden.

Voor bepaalde opportunistische pathogenen is de aanwezigheid van biofilm noodzakelijk om zich te vermeerderen (bijv. *L. pneumophila*). De biofilm monitoren in een warmtewisselaar is echter niet eenvoudig. Bij eerder onderzoek is ook gebruik gemaakt van uitneembare leidingsegmenten waarmee biofilm eenvoudiger gemonitord kan worden zonder dat de warmtewisselaar uit elkaar gehaald moet worden (Moerman et al., 2019). Door dit ook in te bouwen bij warmtewisselaars in de praktijk kan eenvoudig bekeken worden hoeveel biofilm zich heeft opgebouwd en wanneer het wellicht noodzakelijk wordt om de warmtewisselaar uit elkaar te halen voor reiniging. Het zou ook de mogelijkheid geven de biofilm te controleren op de aanwezigheid van opportunistische pathogenen.

5 Conclusie en aanbevelingen

5.1 Conclusies

Hieronder zijn puntsgewijs de conclusies uit het onderzoek weergegeven.

- Van de onderzochte pathogenen kon alleen *P. aeruginosa* zich niet goed vestigen in de biofilm op de flowcellen wanneer de biofilm via het drinkwater wordt blootgesteld aan 17 of 23°C en via het materiaal aan 20-23 of 26-29°C.
- Wanneer de temperatuur van de biofilm werd blootgesteld aan 23°C via het drinkwater en 26-29°C via het materiaal, zijn *L. pneumophila*, *L. anisa* en *M. avium* in staat zich te vermeerderen in de biofilm. Bij temperaturen van 17° en 20-23°C werd geen groei van *L. pneumophila* waargenomen, maar wel van *M. avium*. Voor *L. anisa* werd er initieel groei geobserveerd bij temperaturen van 17°C en 20-23°C, maar later in het experiment afsterving.
- Materiaal met een hoge BPP-waarde (EPDM) kan groei van *M. avium* en *L. anisa* (initieel) in de biofilm verhogen in vergelijking met materialen met een lage BPP-waarde (RVS).
- *A. fumigatus* en *M. kansasii* zijn gedetecteerd in alle flowcellen, maar de aantallen namen gedurende de tijd af. Dit wijst erop dat deze organismen zich ofwel niet goed kan vermeerderen en/of de competitie met de andere micro-organismen verloor in het experiment.

5.2 Aanbevelingen

Op basis van de resultaten van deze studie is het aan te raden om met temperaturen lager dan 23°C te werken in warmtewisselaars. Deze limiet geldt voor zowel de temperatuur van het drinkwater in de warmtewisselaar als voor het secundaire circuit om langdurige blootstelling van de biofilm aan hogere temperaturen te vermijden.

Voor materiaalgebruik in de warmtewisselaar wordt daarnaast aanbevolen om de inzet van EPDM-typen met lage BPP-waarde of andere alternatieve materialen met een lage BPP-waarde te onderzoeken. Materialen met een lage BPP-waarde bevatten minder groeibevorderende stoffen, waardoor minder biofilm wordt gevormd en opportunistische ziekteverwekkers waarschijnlijk minder goed in staat zijn om zich te vermeerderen. De BPP-waarde van een materiaal kan in de BPP-test voor materialen bepaald worden.

Ook in Vlaanderen is er interesse in het gebruik van warmtewisselaars, maar daar is de situatie anders o.a. door het distribueren van drinkwater met een desinfectieresidu, dat invloed kan hebben op groei van micro-organismen. Daarom wordt aanbevolen om een vergelijkbaar experiment uit te voeren met drinkwater van een distributiesysteem in Vlaanderen. Voor een vervollexperiment is het ook aan te raden de opstelling aan te passen zodat de flowregulatie preciezer gedaan kan worden.

Verder onderzoek naar de impact van de biologische stabiliteit op de groei van de pathogenen zou interessant kunnen zijn. Eventueel zou een grote impact van biologische stabiliteit meer speelruimte in termen van temperatuur kunnen betekenen in gebieden met een zeer goede biologische stabiliteit van het drinkwater. Zolang dit niet bekend is zal overal aan de hier opgestelde temperatuurlimiet voldaan moeten worden.

6 Referenties

- Agudelo-Vera, C. M., Blokker, M., de Kater, H., & Lafort, R. (2017). Identifying (subsurface) anthropogenic heat sources that influence temperature in the drinking water distribution system. *Drinking Water Engineering and Science*, 10(2), 83-91.
- Agudelo-Vera, C., Avvedimento, S., Boxall, J., Creaco, E., De Kater, H., Di Nardo, A., ... & Blokker, M. (2020). Drinking water temperature around the globe: understanding, policies, challenges and opportunities. *Water*, 12(4), 1049.
- Ahmad, J. I. (2022). Thermal Energy Recovery from Drinking Water Distribution Systems: A study into microbial water quality and potential energy.
- Bressler, D., Balzer, M., Dannehl, A., Flemming, H. C., & Wingender, J. (2009). Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material. *Water Science and Technology: Water Supply*, 9(1), 81-87.
- Doğruöz, N., Göksay, D., İlhan-Sungur, E., & Cotuk, A. (2009). Pioneer colonizer microorganisms in biofilm formation on galvanized steel in a simulated recirculating cooling-water system. *Journal of basic microbiology*, 49(S1), S5-S12.
- Drinkwaterbesluit. Geraadpleegd van <https://wetten.overheid.nl/BWBR0026338/2023-05-05>
- Learbuch, K.L.G. (2016). Legionellagroeiopotentie van (geremineraliseerd) RO-water. BTO 2016.202, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL.
- Learbuch, K. L. G., Lut, M. C., Liu, G., Smidt, H., & van der Wielen, P. W. J. J. (2019). Legionella growth potential of drinking water produced by a reverse osmosis pilot plant. *Water research*, 157, 55-63.
- Moerman, A., van Bel, N., Snip, L.J.P. (2019). Aquathermie in Tilburg: warmte en koude uit drinkwater. KWR 2019.021, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL.
- National Academies of Sciences, E., & Medicine. (2020). Management of Legionella in water systems: National Academies Press.
- States, S. J., Conley, L. F., Ceraso, M., Stephenson, T. E., Wolford, R. S., Wadowsky, R. M., ... & Yee, R. B. (1985). Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. *Applied and environmental microbiology*, 50(5), 1149-1154.
- Van Assche, A., Lievens, B., De Brabanter, J., & Willems, K. (2019). Characterization of the bacterial community composition in drinking water production and distribution systems, emphasizing Acinetobacter species.
- van Bel, N., Moerman, A., van der Linde, D., Koopmans, C., van der Wielen, P.W.J.J. (2023). Effect van aquathermie op microbiologische drinkwaterkwaliteit deel 1. KWR 2023.010, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL.

- van der Kooij, D., Brouwer-Hanzens, A., Veenendaal, H.R., 2009. Invloed van de watertemperatuur op de groei van *Legionella pneumophila* en *Legionella anisa* in biofilms. KWR 09.056, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL.
- van der Kooij, D., Brouwer-Hanzens, A., Veenendaal, H.R., 2010. Invloed van de temperatuur op de groei van *Legionella pneumophila* in een vloeibaar medium en in biofilms. KWR 09.056, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL.
- van der Kooij, D., Veenendaal, H.R. (2007). Assessment of the microbial growth potential of materials in contact with treated water intended for human consumption. KWR 07.068, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL.
- van der Wielen, P.W.J.J. (2014a). Opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater: betekenis voor de drinkwatersector. in BTO congres. 2014. Nieuwegein
- van der Wielen, P.W.J.J. (2014b). Rol van drinkwater, biofilm en temperatuur op groei van opportunistische pathogenen. BTO 2014.217(s), KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL.
- van der Wielen, P.W.J.J. (2018). Aandachtswaarden nieuwe methoden biologische stabiliteit. BTO 2018.049, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL.
- van der Wielen, P.W.J.J., (2020). Invloed van temperatuur op groei van opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater. BTO 2020.036, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL.
- van der Wielen, P.W.J.J., Bereschenko, L. (2016). Rol van leidingmateriaal bij groei van micro-organismen en opportunistische pathogenen. BTO 2016.022, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL.
- van der Wielen, P.W.J.J., Donocik, A., Dignum, M., El Majjaoui, J., Wubbels, G., Hijnen, W., Lut, M., Prest, E., Roosma, A. (2020). Onderzoeksvisie opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater. BTO 2020.067, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL.
- van der Wielen, P.W.J.J., van der Kooij, D. (2011). Opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater. BTO 2011.035, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL.
- van der Wielen, P. W., & van der Kooij, D. (2013). Nontuberculous mycobacteria, fungi, and opportunistic pathogens in unchlorinated drinking water in The Netherlands. Applied and environmental microbiology, 79(3), 825-834.
- van der Wielen, P.W.J.J., Uytewaal-Aarts, M. (2013). Non-tuberculeuze mycobacteriën in drinkwater. BTO 2013.054, KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, NL.

I Logboek container en flowcellen

Week Kalender	Datum	Activiteit	Notitie	Aanenten & monstername
44	4-11-2022	Reinigen systemen	Plaatjes eruit en schoonmaken chloor/SDS/citroenzuur	
	18-11-2023	Onderhoud en reparaties		
47	23-11-2022	Onderhoud en reparaties		
47	25-11-2022	Materialen in flowcellen plaatsen. Start biofilm vorming	Plaatjes erin, verwarmingselement wb1 geplaatst. Wb bijgevuld en temps aangepast	
49	9-12-2022	wb bijgevuld flow (50) en temps aangepast	wb bijgevuld flow (50) en temps aangepast	
50	16-12-2022	wb bijgevuld flow (30) en temps aangepast	wb bijgevuld flow (30) en temps aangepast	
51	19-12-2022	Stroomstoring 10:00	Stroomstoring 10:00	
51	23-12-2022	Systemen weer aangezet en ingesteld. Wb bijgevuld.	wb stonden uit door stroomstoring. Systemen weer aangezet + ingesteld. Wb bijgevuld. Bouten plafond geïsoleerd.	
3	16-1-2023	Kalibratie PT 100, wb bijgevuld	Kalibratie PT 100, wb bijgevuld	
3	17-1-2023	Kalibratie PT 100	Kalibratie PT 100	
3	18-1-2023	Flowcellen naar circulatie. wb bijgevuld flow en temps aangepast	Flow cellen naar circulatie. Aanenten. Watermonstername FC 1/2/3/. wb bijgevuld flow en temps aangepast	Aanenten
4	24-1-2023	wb bijgevuld flow en temps aangepast	Monstername 1/11 wb bijgevuld flow en temps aangepast	Monstername
5	30-1-2023		Monstername 2/12. Pomp po4 op gang geholpen	Monstername
6	7-2-2023	wb bijgevuld, flow ingesteld	Bijenten, wb bijgevuld flow ingesteld	Aanenten Bij enten met de twee legionella-soorten en <i>P. aeruginosa</i> .
7	13-2-2023	wb bijgevuld, flow ingesteld	Monstername 3/13 wb bijgevuld flow ingesteld	Monstername
8	21-2-2023	wb bijgevuld, flow ingesteld	Monsternamen 4/14, wb bijgevuld, flow ingesteld, filter vervangen	Monstername
8	23-2-2023	Flowcellen naar doorstromen,	Systeem naar doorstromen	

		wb bijgevuld flow ingesteld		
9	27-2-2023	Probleem aanvoerpomp geconstateerd		
9	28-2-2023	wb bijgevuld, flow ingesteld	Monsternamen 5/15, wb bijgevuld flow ingesteld	Monsternamen
9	1-3-2023	Werken aan storing aanvoerpomp	Storing voedingspomp verholpen, plaatsen nieuwe laptop	
9	2-3-2023	Storing aanvoerpomp verholpen	Timer en druksensor vervangen, kraan op de steeklans verder opengezet voor grotere flow	
11	13-3-2023	wb bijgevuld, flow ingesteld	Monsternamen 6/16 flow ingesteld	Monsternamen
11	17-3-2023	wb bijgevuld, flow ingesteld	Controle flow en temps aangepast iom Danielle, wb bijgevuld	
13	31-3-2023	Defecte voeding van aanvoerpomp, verholpen, wb bijgevuld, flow ingesteld	Defecte voeding breek tank pomp vervangen, flow bijgesteld wb bijgevuld	
15	11-4-2023	wb bijgevuld, flow ingesteld	Monsternamen 7/17 flow bijgesteld. FC2 2 i.p.v. drie plaatjes	Monsternamen
15	12-4-2023		Melding Leander over stroomonderbreking, blijkt na controle niet bij container	
17	24-4-2023	wb bijgevuld, flow ingesteld	Flows bijstellen iom Frits wb bijgevuld	
18	3-5-2023	wb bijgevuld, flow ingesteld	Flows bijstellen	
19	9-5-2023	wb bijgevuld, flow ingesteld	Monsternamen 8/18 wb bijgevuld	Monsternamen
22	31-5-2023		Flowcellen spoelen met chloor leeghalen en op doorstromen	