

BTO 2017.024 | September 2017

## **BTO** rapport

**Literatuuronderzoek  
naar de invloed van  
temperatuur op groei  
van opportunistische  
pathogenen in  
drinkwater**



# BTO

## Literatuuronderzoek naar de invloed van temperatuur op groei van opportunistische pathogenen in drinkwater

### Opdrachtnummer

400554-145

### Projectmanager

Edu Dorland

### Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Klimaatbestendige watersector

### Kwaliteitsborger

Paul van der Wielen

### Auteur

Nikki van Bel

### Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.  
Een jaar na publicatie is het openbaar.

**Jaar van publicatie**  
2017

**Meer informatie**  
dr. Nikki van Bel  
T 030-6069516  
E [Nikki.van.Bel@kwrwater.nl](mailto:Nikki.van.Bel@kwrwater.nl)

**Keywords**  
Opportunistische pathogenen,  
Legionella, biofilmmonitor,  
temperatuur

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511  
F +31 (0)30 60 61 165  
E [info@kwrwater.nl](mailto:info@kwrwater.nl)  
I [www.kwrwater.nl](http://www.kwrwater.nl)



BTO 2017.024 | September 2017 © KWR

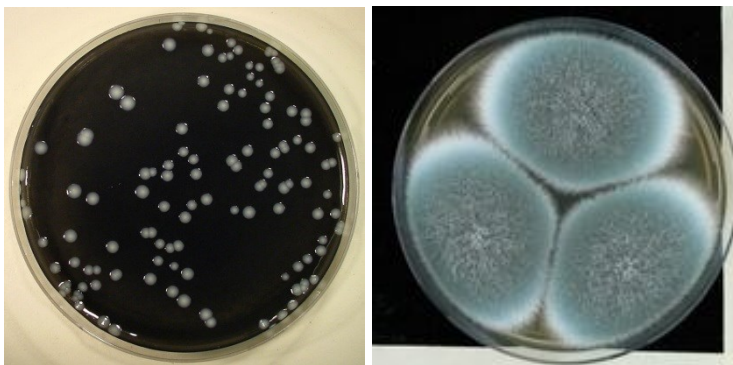
Alle rechten voorbehouden.  
Niets uit deze uitgave mag worden vervaelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke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

## BTO Managementsamenvatting

### Hotspots in het drinkwaternet vragen om monitoring op opportunistische pathogenen om kennis te verzamelen

**Auteur** dr. ir. N. (Nikki) van Bel

Omdat in warme zomers de temperatuur van het drinkwater aan de kraan incidenteel boven de wettelijke grens van 25 °C kan komen en de kans hierop groter wordt door klimaatverandering, is kennis nodig over de invloed van drinkwatertemperatuur op de groei van *Legionella pneumophila* en andere opportunistische ziekteverwekkers. Er is een overzicht gemaakt van door KWR ontwikkelde kennis en andere internationale wetenschappelijke literatuur hierover. De rol van de watertemperatuur bij de groei van opportunistische ziekteverwekkers blijkt nog onvoldoende bekend om betrouwbare uitspraken te doen over de mogelijke effecten van hotspotlocaties in het leidingnet, dit wil zeggen, plekken in het distributienet waar de grootste kans is op hoge watertemperaturen. De literatuur meldt wel dat langdurige watertemperaturen boven 28°C het risico op groei van *L. pneumophila* verhogen, maar dergelijke temperaturen zijn nog niet in het distributienet aangetroffen. Voor de Nederlandse situatie wordt daarom aanbevolen een veiligheidsmarge in acht te nemen om eventuele groei van *L. pneumophila* te voorkomen: een watertemperatuur hoger dan 28°C gedurende zeven dagen is een potentieel gevaar voor groei van *L. pneumophila*. Een andere conclusie is dat meer onderzoek nodig naar de relatie tussen de groei van andere opportunistische ziekteverwekkers en de duur van blootstelling aan hogere temperaturen, bijvoorbeeld door ten tijde van hoge watertemperaturen monsters van de hotspotlocaties en van referentielocaties te analyseren op de hoeveelheden opportunistische ziekteverwekkers.



Groei van *Legionella pneumophila* (links) en *Aspergillus fumigatus* (rechts) op een geschikte voedingsbodem

**Belang:** hogere drinkwatertemperatuur kan gevolgen hebben voor microbiologische risico's van water

De drinkwaterwet legt een temperatuurgrens van 25 °C vast voor de levering van drinkwater. In warme zomers kan de temperatuur van de bodem rond de leidingen op specifieke hotspot-locaties een aantal

dagen tot boven 25 °C stijgen, waardoor ook het drinkwater zal opwarmen. Verstedelijking, steeds meer warmte-uitstoot uit antropogene bronnen en klimaatverandering zullen ervoor zorgen dat de kans dat op steeds meer specifieke hotspot-locaties de temperatuurgrens wordt overschreden zal toenemen.



Deze wettelijke grens is onder meer relevant omdat watertemperatuur een belangrijke rol speelt bij de groei van opportunistische pathogenen in drinkwater en de biofilm van het distributienet. Uit de literatuur blijkt dat nog onvoldoende onderzoek is gedaan om de grootte van die rol te kunnen bepalen.

Opportunistische pathogenen zoals *Legionella pneumophila*, *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa* en *Stenotrophomonas maltophilia* kunnen zich in het drinkwaterdistributienet vermeerderen en ziekte veroorzaken in mensen met een verzwakt immuunsysteem. Van meerdere opportunistische pathogenen is bekend dat groei in drinkwater en de drinkwaterbiofilm mogelijk is. Er is nog weinig bekend over de invloed van (lokaal) hoge temperaturen van de leidingwand op de nagroei van bijvoorbeeld opportunistische pathogenen in de biofilm van het distributienet.

#### Aanpak: literatuuronderzoek naar nationale en internationale literatuur

In de afgelopen jaren heeft KWR veel onderzoek gedaan naar het effect van de (water)temperatuur op de groei van opportunistische pathogenen in drinkwater. De verzamelde kennis is echter verspreid over meerdere rapporten, die voor verschillende opdrachtgevers zijn uitgevoerd. In deze literatuurstudie is een overzicht gecreëerd van de bestaande kennis binnen KWR en in de relevante internationale wetenschappelijke literatuur en zijn kennishiaten geïdentificeerd.

**Resultaten: watertemperatuur speelt een belangrijke rol bij de groei van opportunistische ziekteverwekkers *L. pneumophila***, de veroorzaker van de veteranenziekte, wordt momenteel niet waargenomen in het gedistribueerde drinkwater in Nederland. Onderzoek bij KWR heeft in het verleden laten zien dat langdurige watertemperaturen boven 28°C het risico op groei van *L. pneumophila* verhoogt, maar

dergelijke temperaturen zijn op de hotspotlocaties niet aangetroffen. Enkele andere opportunistische ziekteverwekkers, zoals *S. maltophilia*, *A. fumigatus* en *P. aeruginosa*, komen momenteel voor in 5 – 10% van het gedistribueerde drinkwater, maar in lage aantallen. Zij veroorzaken alleen ziekte bij een kleine subpopulatie (mensen met een verzwakt immuunsysteem) en worden ook verspreid via andere blootstellingsroutes die waarschijnlijk belangrijker zijn dan verspreiding via drinkwater. Watertemperatuur speelt een belangrijke rol in de groei van deze opportunistische ziekteverwekkers, maar het exacte effect van de watertemperatuur op groei van deze organismen in het Nederlandse drinkwater is nog onvoldoende duidelijk om een betrouwbare uitspraak te doen over mogelijke effecten van hotspotlocaties.

#### Implementatie: veiligheidsmarge *L. pneumophila* & monitor opportunistische pathogenen op hotspots.

Neem voor de Nederlandse situatie een veiligheidsmarge in acht om eventuele groei van *L. pneumophila* te voorkómen. Bij een watertemperatuur die gedurende zeven dagen hoger is dan 28°C is er een potentieel gevaar voor groei van *L. pneumophila*.

Voor de andere opportunistische pathogenen moet de relatie tussen groei en de duur van de blootstelling aan hogere temperatuur nog verder worden onderzocht. Het is aan te raden de invloed van temperatuur op de andere opportunistische ziekteverwekkers in kaart te brengen en om tijdens hoge watertemperaturen monsters van de hotspotlocaties en van referentielocaties te analyseren op de hoeveelheden opportunistische ziekteverwekkers.

#### Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *BTO-2017.024 Literatuuronderzoek naar de invloed van temperatuur op groei van opportunistische pathogenen in drinkwater*.

# Inhoud

<b>1</b>	<b>Inleiding</b>	<b>3</b>
1.1	Inleiding	3
1.2	Doel van het onderzoek	3
1.3	Opportunistische pathogenen in het Nederlands drinkwater	4
1.4	Aanpak en leeswijzer	5
<b>2</b>	<b>Legionella pneumophila</b>	<b>6</b>
2.1	Soorten <i>Legionella</i>	7
2.2	Groei van <i>L. pneumophila</i> in reinculturen	7
2.3	Groei van <i>L. pneumophila</i> in aanwezigheid van <i>L. anisa</i>	7
2.4	Groei van <i>L. pneumophila</i> in een biofilm	8
2.5	Groei van <i>Legionella spp.</i> en <i>L. pneumophila</i> in Duits drinkwater	8
<b>3</b>	<b>Andere opportunistische pathogenen van belang voor de Nederlandse drinkwatersituatie</b>	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>12</b>
4.1	Conclusies	12
4.2	Aanbevelingen	13
<b>5</b>	<b>Referenties</b>	<b>15</b>

# 1 Inleiding

## 1.1 Inleiding

Binnen het BTO project 'Toekomstige temperatuur in het distributienet, onder invloed van verstedelijking en klimaatverandering' is een al bestaand bodemtemperatuurmodel geschikt gemaakt voor gebruik in de stad. Dit model heeft aangetoond dat in een warm jaar rond 2050, op (nog niet gelokaliseerde) hotspots, de drinkwatertemperatuur langdurig (ruim 2 maanden) boven de 25°C uitkomt, en gedurende meer dan 7 dagen boven de 28°C (Agudelo-Vera et al, 2015). Het is nog niet bekend hoe, met name lokale, hoge temperaturen van de leidingwand de nagroei van bijvoorbeeld opportunistische pathogenen in de biofilm van het distributienet kunnen beïnvloeden. Potentieel kan een hogere temperatuur ook invloed hebben op hogere organismen. Van beiden processen is echter nog niet veel bekend.

Een ander belangrijk aspect van de klimaatverandering en de aanwezigheid van hotspots in het distributiesysteem, is dat de temperatuur van het drinkwater mogelijk zal stijgen. Volgens de wet moet de watertemperatuur aan de tap na doorstroming lager zijn dan 25°C. De reden voor deze temperatuurgrens is niet bekend, maar aangenomen wordt dat een hogere drinkwatertemperatuur mogelijk gevolgen kan hebben voor de microbiologische risico's van het water.

Aan het Nederlandse drinkwater wordt geen chloor of een ander desinfectieresidu gedoseerd. Om groei van micro-organismen in het drinkwater te voorkómen en het drinkwater microbiologisch veilig te houden, wordt het gehalte aan biologisch afbreekbare stoffen in het drinkwater daarom zo laag mogelijk gehouden. Echter, zelfs bij deze lage concentraties kunnen bepaalde opportunistische ziekteverwekkers zoals *L. pneumophila* zich vermeerderen en dit kan mogelijk leiden tot gezondheidsrisico's. Opportunistische pathogenen kunnen zich in het drinkwaterdistributienet vermeerderen en ziekte veroorzaken in mensen met een verzwakt immuunsysteem (b.v. ouderen, zwangeren, mensen met een immuunziekte, zware rokers of patiënten die medicijnen krijgen die het immuunsysteem onderdrukken). Van meerdere opportunistische pathogenen is bekend dat groei in drinkwater en de drinkwaterbiofilm mogelijk is (van der Wielen *et al.*, 2014). Het is echter nog onbekend of drinkwaterstammen van deze opportunistische pathogenen ook de stammen zijn die bij patiënten worden aangetroffen. Dit aspect wordt momenteel onderzocht binnen het thematisch BTO onderzoek van de themagroep Biologische Activiteit en zal eind 2017 worden gerapporteerd.

## 1.2 Doel van het onderzoek

In de afgelopen jaren is er door KWR veel onderzoek gedaan naar het effect van de (water)temperatuur op de groei van opportunistische pathogenen in water. De huidige kennis is echter verspreid over meerdere rapporten die voor verschillende opdrachtgevers zijn uitgevoerd. Het doel van deze literatuurstudie is om een overzicht te geven van onderzoek naar de relatie tussen temperatuur en opportunistische pathogenen binnen KWR en, waar mogelijk, relevante internationale wetenschappelijke literatuur hierin mee te nemen. Tevens wordt meestal de groei van reïnculturen bij verschillende temperaturen getest en is de mogelijke competitie met andere bacteriën niet meegenomen. Omdat deze resultaten moeilijk te vertalen zijn naar de praktijk, zijn dit soort onderzoeken niet opgenomen in deze literatuurstudie. Op basis van het overzicht van de huidige kennis worden in de laatste

paragraaf eventuele kennishiaten geïdentificeerd en aanbevelingen voor vervolgonderzoek gedaan.

Dit literatuuronderzoek is onderdeel van het onderzoek *Hotspots in het leidingnet* (BTO 2017.023). Het doel van dit onderzoek is 1) de belangrijkste factoren achterhalen die bepalen waar de hotspots zich in de stad bevinden, 2) bepalen welke adaptatiestrategieën mogelijk zijn om deze opwarming tegen te gaan en 3) wat het effect van hotspots is op nagroeiproblemen (e.g. groei van ziekteverwekkers, *Aeromonas*, KG22, dierlijke organismen en/of bruin water, reuk/smaak).

De resultaten zijn weergegeven in twee rapporten. Het rapport BTO 2017.023 *Hotspots in het leidingnet* beschrijft een methode om de antropogene bronnen en hotspots te lokaliseren en de resultaten hiervan. Dit rapport, BTO 2017.024 *Literatuuronderzoek naar de invloed van temperatuur op groei van opportunistische pathogenen in drinkwater*, bevat de resultaten van een literatuuronderzoek naar de invloed van temperatuur op groei van opportunistische pathogenen in drinkwater.

### 1.3 Opportunistische pathogenen in het Nederlands drinkwater

In een eerder literatuuronderzoek is het belang van verschillende soorten opportunistische pathogenen voor de Nederlandse situatie aangegeven op basis van het aantal ziektegevallen, de epidemiologische relatie tussen drinkwaterstammen en patiëntstammen en het vóórkomen van het pathogeen in Nederlands drinkwater (Tabel 1).

Uit eerder BTO-onderzoeken is gebleken dat naast *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* (Pathogenic fungi) en *Stenotrophomonas maltophilia* (in enkele gevallen) ook worden aangetroffen in het drinkwater, terwijl ziekteverwekkende non-tuberculeuze mycobacteriën niet worden gedetecteerd in het Nederlandse drinkwater (van der Wielen en van der Kooij, 2009; van der Wielen en van der Kooij, 2011 en van der Wielen 2014). De aanwezigheid van *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* in het Nederlandse drinkwater kan mogelijk leiden tot gezondheidsrisico's. Het onderzoek bij KWR is daarom voornamelijk gericht op deze vier micro-organismen. De overige opportunistische pathogenen uit Tabel 1 zullen om deze reden niet worden besproken.

TABEL 1. BELANG VAN OPPORTUNISTISCHE PATHOGENEN VOOR DE NEDERLANDSE DRINKWATERSITUATIE. (UIT: VAN DER WIELEN ET AL., 2014)

Organism	Cases	Epidemiology	Occurrence	Priority
<i>L. pneumophila</i>	+++	++	+	Very high
NTM	++	++	+	High
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	High
Pathogenic fungi	+	++	+	High
<i>S. maltophilia</i>	+/-	+	+	Moderate
<i>Acanthamoeba</i> spp.	+/-	++	-	Moderate
<i>B. cepacia</i> complex	+/-	+	Unknown	Low
<i>A. baumannii</i> complex	+/-	-	Unknown	Low
<i>Aeromonas</i> spp.	+/-	-	+	Low
<i>Y. enterocolitica</i>	++	-	Unknown	Low
<i>Afipia</i> spp.	-	-	Unknown	Low
<i>Bosea</i> spp.	-	-	Unknown	Low
<i>B. pseudomallei</i>	-	++	Unknown	Low
<i>S. negevensis</i>	-	+/-	Unknown	Low
<i>E. meningoseptica</i>	-	+/-	Unknown	Low
Methylobacteria	-	-	Unknown	Low
<i>N. fowleri</i>	-	+/-	Unknown	Low

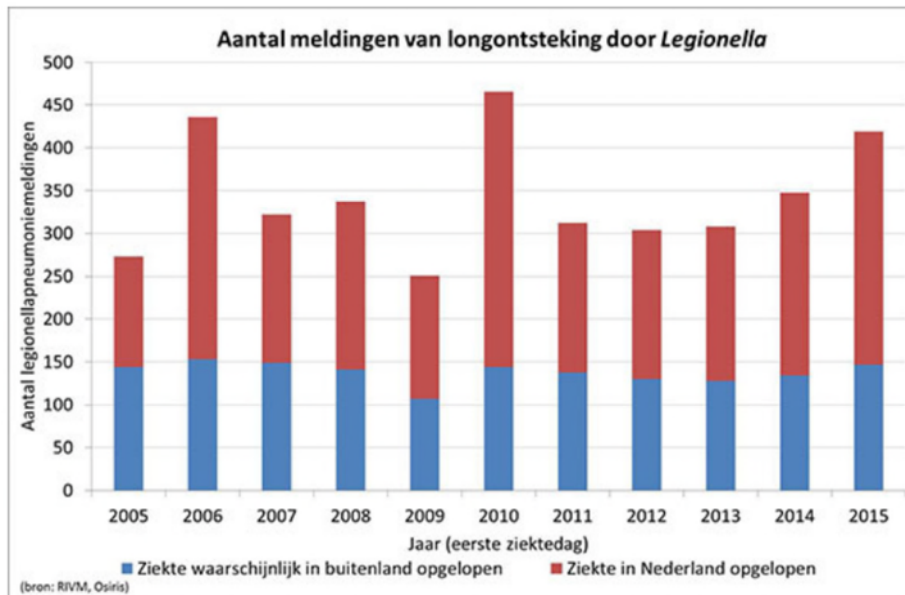


#### 1.4 Aanpak en leeswijzer

In dit rapport zijn de belangrijkste resultaten en conclusies van de studies i.v.m. groei van opportunistische pathogenen in drinkwater samengevat. Hoofdstuk 2 is een samenvatting van de kennis ontwikkeld rond *L. pneumophila*. Over andere opportunistische pathogenen is minder bekend dan voor *L. pneumophila*. De kennis over *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* (*Pathogenic fungi*) en *S. maltophilia* is beschreven in hoofdstuk 3. Internationaal wordt er weinig onderzoek gedaan naar de invloed van temperatuur op de groei van opportunistische pathogenen. Het enige relevante onderzoek is uit Duitsland en wordt besproken in Bijlage I Groei van *Legionella spp.* en *L. pneumophila* in Duits drinkwater en Bijlage II Groei van *P. aeruginosa* in Duits drinkwater. Hoofdstuk 4 bevat de conclusies en aanbevelingen.

## 2 Legionella pneumophila

Binnen de groep van *Legionella* bacteriën bestaan er meerdere *Legionella* soorten. De bekendste en gevaarlijkste *Legionella* soort voor mensen is *Legionella pneumophila*. Infectie kan alleen plaatsvinden via inhalatie van aerosolen waarin zich *L. pneumophila* bevindt en kan een levensbedreigende longontsteking veroorzaken. Dit wordt ook wel de veteranenziekte genoemd. Elk jaar worden er gemiddeld 250-350 gevallen gerapporteerd in Nederland, met uitschieters tot 450-500 gevallen per jaar (Figuur 1). De bronnen van de besmettingen zijn niet eenduidig.



FIGUUR 1. HET TOTAAL AANTAL MELDINGEN VAN LEGIONELLAPNEUMONIE PER JAAR (GEBASEERD OP EERSTE ZIEKTEDAG) IN DE PERIODE 2005-2015, EN INDELING OF DE ZIEKTE WAARSCHIJNLIJK WERD OPGELOPEN BINNEN NEDERLAND OF TIJDENS EEN REIS IN HET BUITENLAND (INFORMATIE VAN RIVM).

*L. pneumophila* komt voornamelijk voor in waterige milieus en heeft een gastheer nodig om te kunnen groeien. De minimale hoeveelheid voedingsstoffen in water waarbij groei van *L. pneumophila* op kan treden is erg laag (ongeveer 1 µg AOC per liter). Het meeste drinkwater dat in Nederland wordt geproduceerd bevat meer dan 1 µg AOC per liter. Protozoën (b.v. *Vermamoeba vermiformis* en *Acanthamoeba spp.*) zijn de gastheer waarin *L. pneumophila* zich kan vermeerderen. Deze protozoën grazen op de biofilm en nemen zo *L. pneumophila* bacteriën op die zich in de biofilm bevinden. *L. pneumophila* vermenigvuldigt zich tot hoge aantallen in de protozoën en komen vrij als de protozocel openbarst. De vrijgekomen *L. pneumophila* bacteriën kunnen zich vervolgens weer hechten aan de biofilm waarna ze worden opgenomen door nieuwe protozoën.

## 2.1 Soorten *Legionella*

Van het genus *Legionella* zijn momenteel 63 soorten bekend (www.dsmz.de), waarvan ongeveer 20 soorten in verband zijn gebracht met ziekte bij mensen. De meeste ziektegevallen (> 90%) worden veroorzaakt door *L. pneumophila* (Fields *et al.*, 2002; WHO, 2000). In het Nederlandse drinkwater komen veel *Legionella*-soorten voor in het drinkwater (Wullings en van der Kooij, 2006). Drinkwater bereid uit grondwater op 81 verschillende productielocaties en uit oppervlaktewater op 16 verschillende productielocaties is met behulp van kwantitatieve PCR onderzocht op de aanwezigheid van *Legionella*. In alle onderzochte drinkwatermonsters was *Legionella* aanwezig. De aantallen variëren van  $2,1 \times 10^4$  –  $7,8 \times 10^5$  genkopieën/liter voor drinkwater bereid uit oppervlaktewater en  $1,1 \times 10^3$  –  $1,7 \times 10^5$  genkopieën/liter wanneer het drinkwater is bereid uit grondwater. Fylogenetische analyse van het 16S rRNA gen laat zien dat 33% van de gensequenties behoort tot het genus *Legionella*. *L. pneumophila* werd slechts in één drinkwatermonster aangetroffen, en in drie van de oppervlaktewatermonsters. Naast *L. pneumophila* zijn ook andere soorten *Legionella* aangetroffen, maar die staan niet bekend als ziekte verwerkers.

## 2.2 Groei van *L. pneumophila* in reïnculturen

Groei-experimenten van verschillende *L. pneumophila* isolaten bij verschillende temperaturen, laat zien dat het temperatuurbereik varieert per isolaat. *L. pneumophila* SG1 groeit bij temperaturen tussen de 25°C en 45°C (van der Kooij, 2014).

Bij temperaturen onder de 25°C is de groei van *L. pneumophila* in een biofilm geremd. *L. pneumophila* wordt wel verteerd door de gastheer protozoa, maar kan de gastheer niet infecteren waardoor er geen groei optreedt. Tevens zijn andere *Legionella* soorten, zoals *L. anisa*, beter aangepast aan lagere temperaturen waardoor zij in een cocultuur *L. pneumophila* zullen overgroeien. *L. pneumophila* wordt sporadisch aangetroffen in het Nederlandse drinkwaterdistributienet, net als in andere landen met een gematigd klimaat. Dit is het gevolg van dat de minimale groeitemperatuur van *L. pneumophila* (25°C) in de meeste gevallen niet wordt gehaald.

## 2.3 Groei van *L. pneumophila* in aanwezigheid van *L. anisa*

Naast *L. pneumophila*, komt de ongevaarlijke *Legionella* soort *L. anisa* voor in het drinkwaterdistributienet. In de meeste gevallen waarbij kweekbare legionellasoorten worden aangetroffen is *L. anisa* de dominante soort en komt *L. pneumophila* niet of in lagere aantallen voor (van der Wielen, 2014a).

Groei van *L. pneumophila* en *L. anisa* reïnculturen op geschikt groeimedium laat zien dat de optimale groeitemperatuur van *L. anisa* lager is dan *L. pneumophila*: 25°C - 30°C versus 30°C - 40°C, respectievelijk. Bij 40°C was er geen groei van *L. anisa* detecteerbaar, terwijl *L. pneumophila* tot 42°C kan groeien.

Om te achterhalen bij welke temperatuur *L. pneumophila* kan groeien in aanwezigheid van *L. anisa* en de autochtone microbiële flora zijn groei-experimenten met de biofilmmonitor uitgevoerd. De kolommen van de biofilmmonitor zijn gevuld met PVC-P ringen waar bovenop twee PE-ringen zijn geplaatst met daarop een populatie van *L. pneumophila* en *L. anisa* in de biofilm. Het water werd continu verversd en de watertemperatuur varieerde per kolom. Elke week zijn de aantallen van beide *Legionella* soorten bepaald. Bij temperaturen onder de 30°C kan *L. pneumophila* zich wel handhaven in de biofilm, maar is het niet in staat om te groeien op PVC-P ringen. Pas bij temperaturen boven de 34,5°C groeit *L. pneumophila* op de PVC-P ringen. Bij een jonge biofilm, met lage aantallen *L. anisa*, is de groeisnelheid van *L. pneumophila* hoger vergeleken met een biofilm die al hoge aantallen *L. anisa* bevat. Andersom groeit *L. anisa* in de biofilm vanaf 25°C en kan het zich niet handhaven bij 38°C in

een biofilm die ook *L. pneumophila* bevat. Binnen zeven tot tien dagen bij een temperatuur boven de 34,5°C bereikt *L. pneumophila* aantallen in de biofilm van  $10^6$  -  $10^7$  kve/cm<sup>2</sup>, *L. anisa* bereikt deze hoge aantallen al bij 30°C (van der Wielen, 2014a).

#### 2.4 Groei van *L. pneumophila* in een biofilm

Van drie *L. pneumophila* stammen (serogroep 1 sequentietypen (ST) 1, ST47 en ST62) is het temperatuurbereik bepaald op *Legionella*-specifiek groeimedium (BYEB) en in de biofilm monitor (van der Kooij *et al.*, 2016). ST 1 is het meest frequent geïsoleerde milieu isolaat uit drinkwater, maar omvat slechts een klein deel van de klinische isolaten. *L. pneumophila* ST47 is een klinisch dominant isolaat in Nederland, Engeland en Wales. *L. pneumophila* ST62 is hoog-virulent en was de oorzaak van de uitbraak in 1999 in Bovenkarspel en van uitbraken in koeltorens in Duitsland en Canada.

In groeimedium met reïnculturen werd de maximale groeisnelheid voor ST1, ST47 en ST62 bereikt op respectievelijk 37°C, 39°C en 41°C. De maximale groeitemperatuur ligt hoger op respectievelijk 41 °C - 42°C (verschilt per ST1 isolaat), 43°C en 43°C. Aan de biofilmmonitor werd, na vorming van een stabiele biofilm, een monocultuur van de isolaten ST1 of ST62 geïnoculeerd. Deze waren bij 38°C en 41°C in staat zich te vermeerderen en zich in relatief hoge aantallen (ongeveer  $10^7$  en  $5 \times 10^6$  kve/cm<sup>2</sup>) in de biofilm te handhaven. Bij een temperatuursverhoging van één graad, naar 42°C, daalde het aantal kolonievormende eenheden tot onder de detectiegrens. Verlaging van de temperatuur naar 40°C leidde hierbij niet tot herstel.

In een volgend experiment is een mengsel van *L. pneumophila* stammen (2 ST1 isolaten, 1 ST47 isolaat en 2 ST62 isolaten) gedoseerd aan vijf onafhankelijke biofilmmonitors waarbij de temperatuur constant werd gehouden op respectievelijk 38°C, 39°C, 40°C, 40,5°C en 41°C. Bij 38°C en 39°C werd sterke groei van *L. pneumophila* waargenomen, terwijl bij 41°C de aantallen daalden. Genetische analyses van de gekweekte *L. pneumophila* in de biofilm toonde aan dat 37 dagen na inoculatie de biofilm bij 41°C werd gedomineerd door een ST1 isolaat (ST62 was in een minderheid aanwezig), terwijl bij de overige vier temperaturen ST62 domineerde. Na 24 dagen was de concentratie van *V. vermiformis*, één van de gastheerprotozoa van *L. pneumophila*, in de biofilm het hoogst bij 38°C en daalde bij hogere temperaturen tot onder de detectiegrens bij 40,5°C. Een andere gastheer voor *L. pneumophila*, *Acanthamoeba* spp., werd niet aangetroffen in de biofilm. De reden hiervoor is dat de meesten *Acanthamoeba* soorten niet kunnen groeien bij temperaturen boven de 37°C.

Naast de verschillen in het temperatuurbereik van verschillende *Legionella* soorten, is er dus ook variatie in de temperaturen waarbij verschillende *L. pneumophila* stammen kunnen groeien. De mate van groei hangt sterk samen met het sequentietype en met de aanwezigheid van de juiste gastheer die bij hogere temperaturen (>40°C) kan overleven en groei van *L. pneumophila* kan ondersteunen.

#### 2.5 Groei van *Legionella* spp. en *L. pneumophila* in Duits drinkwater

Internationaal wordt er weinig onderzoek gedaan naar de invloed van temperatuur op de groei van opportunistische pathogenen. Het in Bijlage I besproken Duitse onderzoek is het enige relevante onderzoek.

### 3 Andere opportunistische pathogenen van belang voor de Nederlandse drinkwatersituatie

Naast *L. pneumophila* zijn ook andere opportunistische ziekteverwekkers in staat om zich te vermeerderen in het drinkwaterdistributiesysteem. Een literatuurstudie heeft laten zien dat in Nederland ziekteverwekkende soorten van *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. fumigatus* mogelijk in staat zijn om zich te vermeerderen in het drinkwaterdistributiesysteem en een volksgezondheidskundige betekenis kunnen hebben (van der Wielen en van der Kooij, 2009). Moleculaire detectie methoden zijn gebruikt om te achterhalen of deze organismen aanwezig zijn in het drinkwater dat werd bemonsterd van verschillende voorzieningsgebieden in Nederland (van der Wielen en van der Kooij, 2011 en van der Wielen, 2014a). De resultaten toonden aan dat *A. fumigatus*, *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* aanwezig waren in ongeveer 5 tot 10% van de drinkwatermonsters (Hofman en van der Wielen, 2015). Van deze drie micro-organismen is het nog onbekend of patiëntstammen overeenkomen met drinkwaterstammen. Daarom loopt er momenteel een BTO-onderzoek of drinkwaterstammen van deze micro-organismen ook bij patiënten worden aangetroffen.

De huidige kennis over de relatie tussen de watertemperatuur en de groei van *A. fumigatus*, *S. maltophilia* en *P. aeruginosa*, is gebaseerd op BTO-onderzoek (van der Wielen, 2013; van der Wielen, 2014b). De resultaten en conclusies hiervan zijn hieronder beschreven. Voor zover bekend zijn er geen andere onderzoeken uitgevoerd naar deze relatie. Het Duitse onderzoek wordt besproken in Bijlage II.

TABEL 2. DE MINIMALE, MAXIMALE EN OPTIMUMTEMPERATUUR VOOR GROEI VAN *A. FUMIGATUS*, *P. AERUGINOSA*, *S. MALTOPHILIA*, *L. PNEUMOPHILA* EN *L. ANISA* TIJDENS KWEEK OP EEN GESCHIKT AGARMEDIUM. UIT: BTO 2014.217(S) (VAN DER WIELEN, 2014B).\*: LAAGST/HOOGST GETESTE TEMPERATUUR WAARBIJ GROEI OP TRAD.

Micro-organisme	Bron	Minimum temperatuur (°C)	Optimum temperatuur (°C)	Maximum temperatuur (°C)
<i>A. fumigatus</i> CBS 122886	Patiënt	15	35 - 45	>50*
<i>A. fumigatus</i> CBS 112389	Milieu	15	35 - 45	>50*
<i>P. aeruginosa</i> KI 1.1/st406	Patiënt	10	25 - 40	>45*
<i>P. aeruginosa</i> M103998	Drinkwater	10	25 - 40	>45*
<i>S. maltophilia</i> M113554	Patiënt	15	25 - 35	40
<i>L. pneumophila</i>	Drinkwater/patiënt	20	30 - 40	42 - 43
<i>L. anisa</i>	Drinkwater	< 20*	25 - 30	39

Groei van reïnculturen van deze drie opportunistische pathogenen is getest bij verschillende temperaturen op geschikt agarmedium (Tabel 2, van der Wielen, 2014b). Van *A. fumigatus* groeit zowel een patiëntstam als een milieustam bij temperaturen vanaf de 15°C, waarbij 50°C de hoogste geteste temperatuur was, terwijl de *P. aeruginosa* stammen bij iets lagere temperaturen groeien: 10°C en 45°C. Dit zijn de laagst en hoogst geteste temperaturen en



niet het maximale temperatuurbereik, aangezien bij deze temperaturen nog groei op trad. De patiëntstam van *S. maltophilia* heeft het kleinste temperatuurbereik van deze drie organismen: 15°C en 40°C. Groei bij hoge en lage temperaturen lijkt dus een algemeen kenmerk te zijn voor de meeste opportunistische pathogenen. Echter, het temperatuurbereik van *L. pneumophila* en *L. anisa* is, zoals hierboven beschreven, kleiner.

In afwezigheid van andere bacteriën en optimale condities kunnen deze drie opportunistische pathogenen dus groeien bij hoge en lage temperaturen. Echter, in de praktijksituatie zijn deze bacteriën altijd in competitie met micro-organismen die van nature voorkomen in het drinkwaterecosysteem en groeien ze onder limiterende condities. Hierdoor kan het temperatuurbereik waaronder deze opportunistische pathogenen zich kunnen vermeerderen in drinkwater afwijken van de gevonden resultaten met reïncultures onder optimale nutriëntcondities. Daarom is de invloed van temperatuur op groei van opportunistische pathogenen ook onderzocht in biofilmmonitoren die worden doorstroomd met drinkwater (van der Wielen, 2014b). De kolommen in de biofilmmonitor zijn gevuld met 20 stuks PVC-P ringen waarbij bovenin de kolom twee PVC-P ringen zijn geplaatst waarop *A. fumigatus*, *S. maltophilia* of *P. aeruginosa* is gegroeid in een batch test. De temperatuur van het voedende water varieerde per kolom en het water werd continu verversd. Wekelijks werd per kolom één PVC-P ring bemonsterd waarbij het ATP-gehalte is bepaald. De *P. aeruginosa* aantallen zijn bepaald met kweek en kwantitatieve qPCR waarbij het aantal aanwezige DNA-kopieën wordt gemeten. De aantallen van *A. fumigatus* in de biofilm zijn alleen met qPCR bepaald.

Groei van *P. aeruginosa* in een natuurlijke biofilm werd getest op 17,2°C, 20,1°C, 25,0°C, 36,9°C, 38,0°C en 40,0°C. De ATP concentratie van de biofilm in alle kolommen was na 31 dagen stabiel op 14.000 - 24.000 pg ATP/cm<sup>2</sup>. *P. aeruginosa* werd op kweek slechts een enkele keer aangetroffen: 12 kve/cm<sup>2</sup> op dag 17 bij 25°C, 0,79 kve/cm<sup>2</sup> op dag 38 bij 36,9°C, 0,16 kve/cm<sup>2</sup> op dag 31 bij 38,0°C en 2 kve/cm<sup>2</sup> op dag 17 bij 40,0°C. Bij de twee laagste temperaturen was *P. aeruginosa* niet detecteerbaar met kweek (detectiegrens: 0,01 kve/cm<sup>2</sup>). Met de qPCR analyse werd alleen op dag 38 bij 20,1°C en op dag 92 bij 38,0°C *P. aeruginosa* aangetroffen. In het algemeen kan worden gesteld dat *P. aeruginosa* zich wel in de biofilm in zeer beperkte mate kortstondig kan handhaven bij temperaturen tussen 25,0°C en 40,0°C. *P. aeruginosa* wordt niet vaker gedetecteerd bij hogere of lagere temperaturen, de temperatuur lijkt groei dus niet duidelijk te beïnvloeden. Het organisme is echter niet in staat om zich dusdanig te vermeerderen dat het blijvend de biofilm weet te koloniseren.

Groei van *A. fumigatus* is in dezelfde, dynamische, opstelling getest bij vijf temperaturen: 17,3°C, 24,2°C, 37,9°C, 37,3°C en 40,2°C. De biofilm was stabiel na 31 dagen (11.000 tot 53.000 pg ATP/cm<sup>2</sup>). Met qPCR werd bij alle temperaturen DNA van *A. fumigatus* aangetroffen, echter de aantallen waren relatief laag en in de meeste gevallen net boven de detectiegrens. Alleen bij 24,2°C was *A. fumigatus* vrij consequent aanwezig, op acht van de tien dagen werd *A. fumigatus* aangetroffen. Bij de overige temperaturen werd in twee of drie biofilmringen DNA aangetroffen, waarbij voor alle temperaturen het meetpunt na 113 dagen positief was. Dit is een indicatie dat *A. fumigatus* in staat is om bij de geteste temperaturen de biofilm te koloniseren en zich daar te handhaven in aanwezigheid van de autochtone microbiële flora. *A. fumigatus* kan bij de geteste temperaturen groeien, maar een hogere temperatuur lijkt slechts een beperkte stimulans te zijn voor groei.

Een nadeel van de gebruikte qPCR methode is dat het onduidelijk is of het DNA afkomstig is van levende of dode micro-organismen. Zeker gezien slechts sporadisch en in lage aantallen DNA van *A. fumigatus* en *P. aeruginosa* is gedetecteerd. Desondanks kan wel geconcludeerd worden dat bij drinkwatertemperaturen onder de 25°C, *A. fumigatus* en *P. aeruginosa* de

biofilm kunnen koloniseren en zich daarin kunnen handhaven. Dit komt overeen met onderzoek waarbij beide micro-organismen, en ook *S. maltophilia*, zijn aangetroffen in het Nederlandse drinkwater waarvan de temperatuur onder de 25°C ligt (van der Wielen en van der Kooij, 2011, van der Wielen, 2013, van der Wielen, 2014a).

Internationaal onderzoek naar het vóórkomen van *P. aeruginosa* in het drinkwater van verschillende landen laat zien dat in landen met een hogere water- en luchttemperatuur (Togo, Israël; watertemperatuur: 26°C - 32°C) 25-30% meer *P. aeruginosa* voorkomt in het drinkwater vergeleken met landen met een lagere luchttemperatuur (Midden-Europa). De drinkwatertemperatuur is in deze landen ook hoger (26°C -32°C) dan in de koelere landen (Papapetropoulou *et al.*, 1994; Reitler *et al.*, 1957; Schubert *et al.*, 1975; Shehabi *et al.*, 2005). De hogere *P. aeruginosa* aantallen in het drinkwater lijken dus veroorzaakt te worden door de hogere watertemperaturen, hoewel ook verschillen in waterkwaliteit een rol zouden kunnen spelen. Voor *S. maltophilia* is er een indicatie dat eenzelfde relatie bestaat, aangezien bij metingen op twee locaties in het distributiesysteem in de zomer een significant hoger aantal DNA kopieën in het water gemeten vergeleken met de winter (van der Wielen, 2013).

## 4 Conclusies en aanbevelingen

### 4.1 Conclusies

*L. pneumophila* kan in drinkwatersystemen groeien indien de temperatuur gedurende minstens 7 dagen hoger is dan 30°C. De resultaten van bovenstaande onderzoeken zijn behaald in een laboratoriumsituatie die de condities in een natuurlijke drinkwaterbiofilm nabootst. Uit de Duitse metingen in het distributienet blijkt dat er bij de lagere temperaturen geen duidelijk verband is tussen het voorkomen van *L. pneumophila* en *Legionella spp.* in het water en de watertemperatuur en dat het risico dus klein is. Het is echter niet bekend in hoeverre deze resultaten te vertalen zijn naar de Nederlandse praktijk situatie.

Bij een lage watertemperatuur (10°C - 15°C) kunnen *A. fumigatus*, *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* in een reïncultuur groeien. De beperkte beschikbare resultaten geven de indicatie dat deze drie pathogenen, in tegenstelling tot *L. pneumophila* ook in staat zijn zich bij lagere temperaturen te vermeerderen en er dus een mogelijk risico is. Omdat bij de huidige drinkwatertemperatuur deze opportunistische pathogenen al worden aangetroffen, lijken klimaatverandering en hotspots heel belangrijk want de bacterie aantallen nemen mogelijk toe bij hogere temperaturen. Dit is nog niet geheel duidelijk en moet nog verder onderzocht worden.

In Tabel 3 is een overzicht gegeven van de resultaten van het literatuuronderzoek. Uit deze resultaten kan worden geconcludeerd dat wanneer de drinkwatertemperatuur voor een langere periode boven de 10 tot 15°C uitkomt, er een verhoogd risico kan zijn dat deze opportunistische pathogenen vaker worden aangetroffen in het drinkwatermilieu, mits de overige omstandigheden voor groei van deze organismen ook aanwezig zijn. Aanvullend onderzoek is echter nodig naar de precieze invloed van temperatuur op de groei van deze organismen, om betrouwbaarder te kunnen aangeven bij welke temperaturen het risico op vermeerdering van deze organismen aanwezig is.

In afwezigheid van andere bacteriën en optimale condities kunnen de opportunistische pathogenen groeien op een groot bereik van temperaturen. Echter, in de praktijk situatie zijn deze pathogenen altijd in competitie met micro-organismen die van nature voorkomen in het drinkwaterecosysteem en groeien ze onder limiterende condities. Hierdoor kan het temperatuurbereik waaronder deze opportunistische pathogenen zich kunnen vermeerderen in drinkwater afwijken van de gevonden resultaten in het lab onder (optimale/gecontroleerde) nutriëntcondities.

Daarnaast is het onduidelijk of de aanwezigheid van deze micro-organismen in drinkwater ook daadwerkelijk een risico voor de volksgezondheid oplevert. Het is namelijk mogelijk dat de drinkwaterstammen van *A. fumigatus*, *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* niet verantwoordelijk zijn voor ziekte bij patiënten. Daarom wordt momenteel een studie binnen het BTO uitgevoerd om te achterhalen of drinkwaterstammen en patiëntstammen van deze organismen genotypisch hetzelfde zijn. Wanneer de uitkomsten van die studie bekend zijn, kan een betere schatting worden gemaakt over het eventuele risico van deze organismen in drinkwater voor de volksgezondheid.

TABEL 3.OVERZICHT VAN DE INVLOED VAN TEMPERATUUR OP GROEI VAN OPPORTUNISTISCHE PATHOGENEN IN DRINKWATER (IN GEEL DE NOG TE ONDERZOEKEN ASPECTEN)

	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aspergillus Fumigatus</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<b>Voorkomen in NL drinkwater</b>	Zelden	5-10% (lagere aantallen)		
<b>Groei in het water</b>	Nee	Ja, 20 - 40°C	Nauwelijks, voornamelijk in biofilm/sediment	Ja, aangetoond bij 22°C, 30°C en 37°C
<b>Relatie patiënt- met drinkwaterstammen</b>	Soms (drinkwater is echter niet de enige bron)	Onbekend	Drinkwater kan een rol spelen bij infectie	Drinkwater speelt waarschijnlijk een rol bij verspreiding
<b>Temperatuurbereik voor groei (°C) voor reincultures<sup>a</sup></b>	20 - 42/43°C	10 - >45°C	15 - >50°C	15 - >40°C
<b>Optimale groeitemperatuur voor reincultures<sup>a</sup></b>	30-40°C, max 42°C	25 - 40°C	35 - 45°C	25 - 35°C
<b>Minimale groeitemperatuur in biofilm (met competitie)</b>	34,5°C	Kan zich kortstondig en in beperkte mate handhaven in de biofilm bij 25 - 40°C, niet bij 17 - 25°C	Kan de biofilm koloniseren en zich daar handhaven bij 17.3 - 40.2°C. Groei is mogelijk, maar hogere temperatuur lijkt geen/beperkte stimulans te zijn	Nog niet getest op groei en handhaving in biofilm
<b>Opmerkingen</b>	Hogere aantallen of vaker aangetroffen in landen met hogere drinkwatertemperatuur. Kan zich slecht handhaven in, en groeien in, de biofilm bij 8 - 29°C. In Duits drinkwater vaker aangetroffen in de winter.	Hogere aantallen of vaker aangetroffen in landen met hogere drinkwatertemperatuur. In Duits drinkwater vaker aangetroffen in de winter.		In de zomer hogere <i>S. maltophilia</i> aantallen dan in winter in NL distributienet.

<sup>a</sup> De temperatuurrange en optimale temperatuur voor groei is bepaald voor reincultures. In het drinkwatermilieu (met concurrerende micro-organismen) kan deze temperatuurrange en/of optimale temperatuur voor groei afwijken.

#### 4.2 Aanbevelingen

De groei-experimenten van *A. fumigatus* en *P. aeruginosa* herhalen onder statische condities, waarbij het water niet continu wordt verversd. De verwachting is dat met deze methode betrouwbaarder achterhaald kan worden of en bij welke temperatuur de opportunistische pathogenen de biofilm kunnen koloniseren en er groei plaats kan vinden. Uit de Duitse experimenten met de biofilmmonitor blijkt dat dit een goede optie is. Hiermee kan ook groei bij hogere temperaturen worden getest.

Neem voor de Nederlandse situatie een veiligheidsmarge in acht voor de temperatuur en voor de duur van de warmere periode om eventuele groei van *L. pneumophila* te voorkomen. Dit houdt in dat wanneer gedurende meer dan zeven dagen de watertemperatuur hoger is dan 28°C er een potentieel gevaar is voor groei van *L. pneumophila*. Dit advies is ook in een eerdere studie gegeven (van der Wielen en Medema, 2014). Voor *L. pneumophila* houdt dit in dat er geprobeerd moet worden om de temperatuur in het distributienet hieronder te houden. Voor de andere opportunistische pathogenen moet de relatie tussen groei en de duur van de blootstelling aan hogere temperatuur nog worden onderzocht.

Dagelijkse metingen van monsters op hotspots- (Agudelo-Vera, 2017) en referentielocaties (locatie in hetzelfde gebied waarbij de watertemperatuur lager is) uitvoeren. Daarbij wordt een eerste meting uitgevoerd indien gedurende een periode van meer dan vijf dagen een watertemperatuur van boven de 28°C wordt gemeten. De monsters worden geanalyseerd op de vier opportunistische ziekteverwekkers (*L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia*). Naast het bepalen van deze vier micro-organismen worden ook algemeen microbiologische parameters bepaald (*Aeromonas*, KG22 en ATP). De informatie uit een dergelijk project kan worden gebruikt om een risicobeoordeling van de betreffende locatie te maken.



## 5 Referenties

- Agudelo-Vera, C. M., E. J. M. Blokker, P. W. J. J. van der Wielen and B. Raterman. 2015. Drinking water temperature in future urban areas. BTO 2015.012. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
- Agudelo-Vera C.M. 2017. Hotspots in het leidingnet. BTO 2017.023. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
- Fields BS, Benson RF, Besser RE. 2002. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. Rev. Vol 15, pp 506-526.
- Grobe S, Wagner J, Wingender J. 2014. Sicherung der Trinkwasserqualität bei der Wasserverteilung bei veränderten Bodentemperaturen. Dynaklim-Publikation. No 52, juli 2014
- Hofman, J. and P. van der Wielen. 2015. Warmte en Koude uit Drinkwater en Riolerings - Risico's. BTO 2015.002. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
- Papapetropoulou, M., J. Iliopoulou, G. Rodopoulou, J. Detorakis, and O. Paniara. 1994. Occurrence and antibiotic-resistance of Pseudomonas species isolated from drinking water in southern Greece. J. Chemother. 6:111-116.
- Paszko-Kolva C, Shahamat M, Colwell RR. 1992. Long-term survival of Legionella pneumophila serogroup 1 under low-nutrient conditions and associated morphological changes. FEMS Microbiol. Ecol. Vol 102, pp 45-55.
- Reitler R, Seligmann R. 1957. Pseudomonas aeruginosa in drinking water. J. Appl. Bacteriol. 20:145-150
- Schubert R, Scheiber P. 1975. Das Vorkommen von Pseudomonas aeruginosa im Grundwasser, Oberflächenwasser und in Wasserversorgungsleitungen in tropischen Gebieten. Gas Wasserfach 116:413-415
- Shehabi AA, Masoud H, Maslamani FA. 2005. Common antimicrobial resistance patterns, biotypes and serotypes found among Pseudomonas aeruginosa isolates from patient's stools and drinking water sources in Jordan. J. Chemother. 17:179-183
- van der Kooij D, Brouwer-Hanzens AJ, Veenendaal HR en Wullings BA. 2016. Multiplication of Legionella pneumophila sequence types 1, 47 and 62 in buffered yeast extract broth and biofilms exposed to flowing tap water at temperatures of 38°C to 42°C. AEM, vol 82, no 22, pp 6691-6700
- Van der Kooij D. 2014. Chapter 6: Legionella in drinking-water supplies. Uit: Microbial Growth in Drinking-Water Supplies. Problems, Causes, Control and Research Needs.

- Van der Wielen PWJJ, Italiaander R, Wullings BA, Heijnen L en van der Kooij D – Chapter 7: opportunistic pathogens in drinking water in the Netherlands. Uit: *Microbial Growth in Drinking-Water Supplies. Problems, Causes, Control and Research Needs*. 2014
- van der Wielen PWJJ, van der Kooij D – Nontuberculous mycobacteria, fungi, and opportunistic pathogens in unchlorinated drinking water in the Netherlands. 2013, *AEM*, vol 79, no 3, pp 825-834.
- Van der Wielen, P.W.J.J. 2014a. Effect van waterkwaliteit, seizoen, drinkwaterinstallatie in verblijftijd/afstand op KWR 09.056. Invloed van de watertemperatuur op de groei van *Legionella pneumophila* en *Legionella anisa* in biofilms. BTO 2014.015. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
- Van der Wielen, W. J. J. 2014b. Rol van drinkwater, biofilm en temperatuur op groei van opportunistische pathogenen. BTO 2014.217(s). KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
- Van der Wielen, P.W.J.J., and van der Kooij, D. 2009. Literatuurstudie naar opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen die zich in drinkwater kunnen vermeerderen. Eigenschappen en prioritering aanvullend onderzoek in relatie tot opwarming van het leidingwater. BTO(s) 2009.001. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
- Van der Wielen, P.W.J.J., and van der Kooij, D. 2011. Opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater. BTO(s) 2011.035. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
- Van der Wielen. P.W.J.J. 2013. Micro-organismen in sedimentfracties en op de buiswand in het voorzieningsgebied van Kamerik. Speerpuntonderzoek Oasen. KWR 2013.019. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
- Van der Wielen. P.W.J.J., and G.J. Medema. 2014. Kwalitatieve microbiologische risicoanalyse watersysteem olifantenkas Dierenpark Emmen. KWR 2014.036. KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein.
- WHO. 2000. 'Legionnaires' disease, Europe, 1999. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2000. Pp 347-352.
- Wullings BA, van der Kooij D. 2006. Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella* spp. In drinking water treated at temperatures below 15C. *AEM*. Vol 72, no 1, pp 157-166.

## Bijlage I Groei van *Legionella spp.* en *L. pneumophila* in Duits drinkwater

In Duitsland is in en om de stad Oberhausen het drinkwater, op verschillende locaties (o.a. bos, park, binnenstad en bedrijventerrein) bemonsterd (Grobe *et al.*, 2014). In de zomer, herfst en winter is hier de watertemperatuur gemeten: 14,9°C - 21,0°C (zomer), 6,8°C - 12,3°C (herfst) en 6,0°C - 9,6°C (winter) en is de aanwezigheid van een aantal pathogenen bepaald. *Legionella spp.* zijn gedetecteerd met kweek en *Legionella spp.* en *L. pneumophila* met de FISH-methode waarmee ook levende, maar niet kweekbare, bacteriën worden gedetecteerd. Met kweek werd er in geen enkel monster *Legionella spp.* aangetroffen, terwijl met FISH in alle watermonsters in de herfst en winter *Legionella spp.* gedetecteerd werd (het watermonster in de zomer was niet geanalyseerd met FISH). *L. pneumophila* werd in de herfst met FISH in 75% van de watermonster aangetroffen, in de winter 100% en in de zomer 12,5%. Opvallend is dat bij hogere watertemperaturen minder watermonsters *L. pneumophila* bevatten. In het onderzoek worden helaas geen concentraties of aantallen genoemd.

Om het vóórkomen in de biofilm te bepalen, is op alle locaties op de normale drinkwaterleiding een by-pass leiding aangesloten. Deze by-pass leiding bevat uitneembare coupons voor analyse van de biofilm. Voor deze coupons zijn verschillende materialen gebruikt (PE80/100, EPDM en RVS) en gedurende minstens 6 maanden zijn deze doorstroomd met drinkwater om een biofilm te vormen. *L. pneumophila* werd met de kweekmethode alleen in de herfst aangetroffen (concentratie in de biofilm: 3-29 kve/100 ml). Met FISH werd *Legionella spp.* in alle jaargetijden en op alle materialen in 100% van de biofilmmonsters gedetecteerd. Met als enige uitzondering het biofilmmonster genomen in de herfst waarbij op RVS in 75% van de biofilmmonsters *Legionella spp.* werd gedetecteerd. De aanwezigheid van *L. pneumophila* varieerde meer. Op PE80/10 coupons was in elk jaargetijde 75% van de biofilmmonsters positief. Op EPDM was 37,5% (herfst), 100% (winter) en 87,5% (zomer) positief en op RVS was 37,5% (herfst), 57% (winter) en 12,5% (zomer) van de biofilmmonsters positief. De hoogste aantallen *Legionella spp.* werden aangetroffen in de zomer op EPDM ( $2 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  cellen/cm<sup>2</sup>), op PE lagen de concentratie 5 tot 50 keer lager. Afhankelijk van de monsternamelocatie werden de hoogste *L. pneumophila* aantallen gemeten in de winter (park, stadsrand, binnenstad, landbouwgrond:  $2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  FISH-positieve cellen/cm<sup>2</sup>), of in de zomer (bos, bedrijventerrein, dichtbij het drinkwaterproductiestation:  $3 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$  FISH-positieve cellen/cm<sup>2</sup>). Voor zowel *Legionella spp.* als *L. pneumophila* werd er geen duidelijk verband gevonden tussen de aantallen in de biofilm en de watertemperatuur. Een mogelijke verklaring is dat de hoogste temperaturen waarbij is gemeten, nog ruim onder de optimum temperatuur voor *L. pneumophila* liggen, en *L. pneumophila* daarom niet kan concurreren met andere micro-organismen. Opvallend is dat in het Nederlandse drinkwater vrijwel nooit *L. pneumophila* met qPCR wordt gedetecteerd. *Legionella spp.* is wel altijd aanwezig in het Nederlandse drinkwater, maar de legionella soorten die worden aangetroffen staan niet bekend als ziekte verwerkers. Een mogelijke verklaring voor de detectie van *L. pneumophila* in het Duitse drinkwater is methodologisch. Als de qPCR niet specifiek genoeg is voor *L. pneumophila*, kunnen ook andere *Legionella* soorten worden gedetecteerd. Of dit ook daadwerkelijk het geval is, is niet duidelijk.

In een dynamische biofilmreactor, doorstroomd met Duits drinkwater, is op PE80 en EPDM materialen gedurende 14 dagen een biofilm gegroeid bij verschillende temperaturen (8°C, 12°C, 16°C, 21°C, 23°C, 27°C, 29°C). Na dosering van *L. pneumophila* aan het water, is de biofilmreactor 20 uur stilgezet om de bacteriën te kunnen laten hechten aan de biofilm. Vervolgens werd de doorstroming herstart en gedurende 28 dagen is de hechting en mogelijke groei gemeten met kweek en FISH. Na 1 dag is *L. pneumophila* bij alle temperaturen, behalve 21°C, aanwezig in de biofilm. De concentratie in de biofilm is niet afhankelijk van de temperatuur, alleen bij 8°C en 25°C is de concentratie 10 tot 100 keer lager vergeleken met de overige temperaturen. *L. pneumophila* kan zich bij de geteste temperaturen niet goed handhaven in de biofilm. Bij 23°C en 25°C werd *L. pneumophila* tot dag 21 gedetecteerd in de biofilm en het afvoerende water en bij 29°C tot dag 14. Bij 16°C was er na 1 dag geen *L. pneumophila* meer detecteerbaar. Voor de overige temperaturen (8°C, 12°C en 21°C) varieerde dit. Na 28 dagen was *L. pneumophila* nog aanwezig in de biofilm bij 21°C en 12°C, maar was het in het water al na 1, respectievelijk 14 dagen afwezig. Bij 8°C was er na 14 dagen geen *L. pneumophila* meer aanwezig in zowel de biofilm als het water. Indien er extra groeistoffen aan het water werden gedoseerd kon *L. pneumophila* zich minder goed handhaven in de biofilm. De hier geteste temperaturen zijn dus niet optimaal voor groei en handhaving van *L. pneumophila* in de biofilm. Deze resultaten spreken ook de resultaten met natuurlijke monsters tegen, waarbij de hoogste aantallen in de winter werden gevonden.

## Bijlage II Groei van *P. aeruginosa* in Duits drinkwater

In Oberhausen, Duitsland, zijn naast *Legionella spp.* en *L. pneumophila* (zoals beschreven in 2.5) ook andere pathogenen gemeten (Grobe *et al.*, 2014). *P. aeruginosa* werd met kweek in geen enkel watermonster aangetroffen, maar werd wel gedetecteerd met FISH: 62,5% (herfst), 75% (winter) en 0% (zomer) van de watermonsters was positief. Deze resultaten suggereren een inverse relatie tussen de aantallen *P. aeruginosa* en de temperatuur, waarbij koudere temperaturen leiden tot hogere aantallen.

*P. aeruginosa* werd in de biofilm met FISH gedetecteerd op alle materialen (concentratie tussen  $5 \times 10^4$  –  $5 \times 10^5$  cellen/cm<sup>2</sup>). Op PE80/100 was 100% (herfst en winter) en 75% (zomer) van de biofilm monsters positief. Op EPDM was 100% (herfst), 87,5% (winter) 62,% (zomer) positief en op RVS was 37,5% (herfst en zomer), 50% (winter) positief. Bij hogere watertemperaturen (zomer of bijvoorbeeld het meetpunt in de binnenstad) werd het minst vaak *P. aeruginosa* aangetroffen. Terwijl bij lagere temperaturen *P. aeruginosa* vaker en met hogere aantallen aanwezig was.

In een dynamische biofilmreactor, die in deze Duitse studie is gebruikt, is *P. aeruginosa* één dag na dosering aanwezig in de biofilm bij alle temperaturen (8°C, 12°C, 16°C, 21°C, 23°C, 27°C, 29°C). Bij watertemperaturen boven de 21°C waren de aantallen in de biofilm duidelijk hoger. Na 28 dagen was *P. aeruginosa* bij alle temperaturen nog aanwezig in de biofilm en in het afvoerende water. Alleen bij 25°C werd er in de biofilm, gevormd op PE, na 21 dagen geen *P. aeruginosa* meer gedetecteerd. Dosering van extra groeistoffen aan het water had nauwelijks effect op de aanwezigheid van *P. aeruginosa* in de biofilm, alleen bij 12°C en 21°C was de bacterie afwezig in het water na 14 respectievelijk 21 dagen. Ook bij de hoogste temperatuur, 29°C, vond er geen vermeerdering plaats. Bepaling van het aantal aanwezige bacteriën in de biofilm liet zien dat er een netto afname plaats vindt, na 28 dagen zijn de aantallen 1,5 tot 5,5 log lager. Het is hierbij niet met zekerheid te zeggen of er geen groei heeft plaatsgevonden. Mogelijk vind er wel (beperkte) groei plaats, maar is dit niet zichtbaar omdat de afname door afsterving of uitspoeling groter is. Aangezien de bacterie na 28 dagen nog aanwezig is en niet volledig verdwenen, is dit een indicatie dat er mogelijk enige groei plaatsvindt.

De tot nu toe beschikbare resultaten laten zien dat bij lage temperaturen er al een risico bestaat voor *P. aeruginosa*. De *P. aeruginosa* aantallen nemen mogelijk toe bij hogere temperaturen, maar dit is nog niet geheel duidelijk en moet nog verder onderzocht worden.