

# Leidingmaterialen bevorderen microbiële groei



Groei van opportunistische ziekteverwekkers zoals *Legionella pneumophila* in drinkwaterinstallaties moet zoveel mogelijk worden voorkómen. Onderzoek bij KWR heeft eerder laten zien dat sommige leidingmaterialen de groei van micro-organismen kunnen bevorderen. Het is echter onduidelijk of bepaalde leidingmaterialen ook groei van opportunistische ziekteverwekkers bevorderen.

Dr. Paul W.J.J. van der Wielen, Principal Microbioloog  
bij KWR Watercycle Research Institute

De groei van micro-organismen in het drinkwaterdistributiesysteem en drinkwaterinstallaties in gebouwen kan tot problemen leiden waaronder groei van opportunistische ziekteverwekkers zoals *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *M. kansasii* [1-4]. Deze opportunistische ziekteverwekkers kunnen ziekte veroorzaken bij mensen met een verzwakt immuunsysteem (bv door ouderdom, andere onderliggende ziekte of een medische behandeling). *L. pneumophila* is van deze organismen de meest bekende en veroorzaakt de veteranenziekte. Per jaar zijn er ongeveer 300 tot 400 gemelde ziektegevallen met *L. pneumophila* in Nederland. *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *M. kansasii* veroorzaken voornamelijk longontsteking en/of huid/wondinfecties in patiënten. Deze ziektes zijn niet meldingsplichtig in Nederland, waardoor onduidelijk is hoeveel jaarlijkse ziektegevallen er in Nederland zijn. Specifieke onderzoeken hebben wel laten zien dat ziektegevallen met deze drie organismen met enige regelmaat worden aangetroffen in Nederland.

De Nederlandse drinkwaterbedrijven beperken de groei van micro-organismen in het distributiesysteem en drinkwaterinstallatie door drinkwater te produceren met zeer lage concentraties aan stoffen die door micro-

organismen kunnen worden gebruikt om zich te vermeerderen. Mede doordat de drinkwaterbedrijven in staat zijn om deze afbreekbare stoffen effectief te verwijderen tijdens de zuivering, kan het drinkwater in Nederland zonder residu van een desinfectiemiddel als chloor worden gedistribueerd. Stoffen die door micro-organismen in het drinkwatersysteem worden benut voor groei, kunnen echter ook afkomstig zijn uit leidingmaterialen die in het distributiesysteem en drinkwaterinstallatie worden toegepast. In eerder onderzoek is waargenomen dat vooral kunststof leidingmaterialen zoals polyethyleen (PE), polypropyleen (PP), polybutyleen (PB), zacht PVC (PVC-P) en natuurlijk of synthetisch rubber de groei van micro-organismen kunnen bevorderen [5].

Drinkwaterbedrijven in Nederland zijn daarom terughoudend in het gebruik van deze materialen in het distributiesysteem. Daarentegen worden PE-materialen ten koste van koper steeds vaker toegepast in drinkwaterinstallaties in gebouwen. Hoewel al is aangetoond dat bepaalde kunststoffen leidingmaterialen de groei van micro-organismen bevorderen, is het onduidelijk in hoeverre leidingmaterialen die in contact komen met drinkwater de groei van opportunistische ziekteverwekkers kunnen bevorderen. Het doel van de hier beschreven

studie is daarom om de invloed van leidingmaterialen op groei van *L. pneumophila*, *M. kansasii*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* te bepalen.

## BIOMASSAPRODUCTIEPOTENTIE-TEST VOOR MATERIALEN

De groeibevorderende eigenschappen van de verschillende materialen worden getest met de gestandaardiseerde biomassa-productiepotentie (BPP) test zoals beschreven in NEN-EN16421:2014. Binnen het hier beschreven onderzoek zijn de groeibevorderende eigenschappen van glas, koper, PVC-C, PE-Xb, PE-Xc, PE-100, PE-80 en PVC-P voor *L. pneumophila* bepaald. Hiervoor zijn deze materialen gedurende 16 weken geïncubeerd in met drinkwater gevulde flessen zoals beschreven voor de BPP test. Na deze 16 weken is *L. pneumophila* toegevoegd aan iedere fles (met een materiaal en drinkwater) en na een additionele incubatie van 8, 12 en 16 weken (totale incubatie 24, 28 en 32 weken) in de BPP-test is het water en materiaal bemonsterd. Vervolgens zijn de ATP-concentraties en de aantallen *L. pneumophila*, met behulp van kweek op BCYE agar, bepaald in het water en in de biofilm op het materiaal. Daarna zijn op een vergelijkbare manier de groeibevorderende eigenschappen van glas, koper, roestvrijstaal, PVC-C, PE-Xa,

PE-Xc, PE-100, PE-40, EPDM en PVC-P voor *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *M. kansasii* bepaald. Deze organismen zijn aan iedere fles met drinkwater en een materiaal toegevoegd op dag 0 of na 126 dagen incubatie in de BPP test. Na 1, 4, 8, 12, 16 (inoculatie dag 0) of na 24, 28 en 32 (inoculatie dag 126) weken incubatie zijn het water en de materialen bemonsterd en zijn de ATP-concentraties en aantallen *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *M. kansasii* bepaald in het water en de biofilm op het materiaal. *P. aeruginosa* is gemeten middels kweek op CN Pseudomonas agar, terwijl *A. fumigatus* en *M. kansasii* zijn bepaald met specifieke kwantitatieve PCR (qPCR) methoden op het 18SrRNA gen of het 16S-23S ITS gen.

## BIOMASSAPRODUCTIEPOTENTIE (BPP)

De biomassaproductiepotentie (BPP) van de verschillende materialen is berekend als maat voor de hoeveelheid microbiële groei die een materiaal in contact met drinkwater kan veroorzaken en deze zijn weergegeven in Tabel 1. Voor glas is een BPP van  $132 \pm 11$  pg ATP cm<sup>-2</sup> waargenomen en omdat glas een inert materiaal is, wordt deze groei veroorzaakt door de biologisch afbreekbare stoffen die in het drinkwater aanwezig zijn. Koper en PVC-C hebben BPP-waarden die vergelijkbaar zijn met glas en deze twee materialen bevatten dus weinig of geen biologisch afbreekbare stoffen die door micro-organismen kunnen worden omgezet tot biomassa. De PE-materialen (PE-Xb, PE-Xc en PE-100) daarentegen hadden een 6,0 tot 16,7 keer hogere biomassaproductie dan glas. Deze resultaten laten zien dat PE-materialen stoffen afgeven die door micro-organismen worden omgezet tot biomassa in de biofilm en/of water. De hoogste BPP-waarde is waargenomen voor PVC-P (113 keer hoger dan glas). De waargenomen BPP-waarden voor de verschillende materialen komen overeen met BPP-waarden die in eerder onderzoek ook voor deze materialen zijn waargenomen [5].

## GROEI VAN LEGIONELLA PNEUMOPHILA

*L. pneumophila* is in de biofilm van elk materiaal teruggevonden en deze aantallen variëren weinig in de tijd (Figuur 1). De aantallen *L. pneumophila* in de biofilm verschillen echter wel aanzienlijk tussen de materialen (Figuur 1 en Tabel 1). In vergelijking met glas zijn de *L. pneumophila* aantallen lager in de biofilm op koper, terwijl de aantallen op PVC-C vergelijkbaar zijn met glas. De aantallen *L. pneumophila* in de biofilm op PE-gebaseerde materialen zijn daarentegen 1,6 tot 5,8 keer hoger dan op glas, terwijl op PVC-P de aantallen 475 keer hoger

Materiaal	BPP (pg ATP cm <sup>-2</sup> )		<i>L. pneumophila</i> (kve cm <sup>-2</sup> )	
	Gemiddelde	St.dev	Gemiddelde	St.dev
Glas	132	11	$3,1 \times 10^3$	$3,7 \times 10^3$
Koper	112	26	$2,5 \times 10^1$	$1,4 \times 10^1$
PVC-C	185	45	$1,4 \times 10^3$	$7,2 \times 10^2$
PE-Xb	880	208	$1,1 \times 10^4$	$6,3 \times 10^2$
PE-Xc	794	69	$5,1 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$
PE-100	2.204	207	$1,8 \times 10^4$	$8,1 \times 10^3$
PVC-P	14.885	3.300	$1,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$

Tabel 1. De biomassaproductiepotentie (BPP) in pg ATP cm<sup>-2</sup> en *L. pneumophila* aantallen in kve cm<sup>-2</sup> in de biofilm voor de verschillende materialen die zijn getest op groeibevordering voor *L. pneumophila*.

zijn. De lagere aantallen *L. pneumophila* in de biofilm op koper worden waarschijnlijk veroorzaakt door de afgifte van koperionen op het materiaaloppervlakte en die een bacteriostatisch of afdodend effect hebben op *L. pneumophila* [6]. In een eerdere studie is waargenomen dat dit beschermende effect van koper maar tijdelijk is en dat wanneer voldoende corrosieproduct op het koperoppervlakte is geaccumuleerd, de aantallen *L. pneumophila* toenemen tot vergelijkbare aantallen als waargenomen op roestvrijstaal [6]. De resultaten van de hier beschreven studie geven aan dat het gebruik van nieuwe PE of PVC-P materialen in het distributiesysteem of drinkwaterinstallatie een risico vormt voor groei van *L. pneumophila*, terwijl dit risico afwezig of lager is wanneer nieuw koper of PVC-C wordt gebruikt. Naast het leidingmateriaal beïnvloeden ook andere condities (bv drinkwaterkwaliteit, temperatuur, hydraulische condities) de groei van *L. pneumophila* in het drinkwatermilieu [7]. Groei van *L. pneumophila* in drinkwaterinstallaties wordt momenteel beheerst door productie van drinkwater met een zeer hoge kwaliteit, het voorkomen van doodlopende leidingen in de drinkwaterinstallatie en temperatuurbeheer (in koudwaterleidingen een watertemperatuur lager dan 25°C en in warmwaterleidingen een watertemperatuur hoger dan 60°C). Doordat uit de hier beschreven studie blijkt dat sommige leidingmaterialen de groei van *L. pneumophila* kunnen bevorderen, is het in het kader van het voorzorgprincipe raadzaam om het toepassen van leidingmaterialen te beperken die groei van *L. pneumophila* bevorderen in drinkwaterinstallaties (PE(x) materialen en PVC-P). De Nederlandse overheid zou hier een belangrijke rol in kunnen nemen door alleen leidingmaterialen toe te laten die niet de groei van *L. pneumophila* bevorderen.

## GROEI VAN PSEUDOMONAS AERUGINOSA

De gemiddelde aantallen *P. aeruginosa* van

ieder getest materiaal zijn weergegeven in Tabel 2. De aantallen *P. aeruginosa* op glas, koper, RVS, PVC-C, PE-Xa, PE-Xc, PE-40 en PE-100 zijn één week na toevoeging van *P. aeruginosa* verhoogd (tot 280 kve cm<sup>-2</sup>). Na week 1 nemen de aantallen af tot onder de detectiegrens van 8,4 kve cm<sup>-2</sup>, waardoor de gemiddelde *P. aeruginosa* aantallen voor deze materialen laag zijn. Op EPDM en PVC-P vermeerderd *P. aeruginosa* zich in de BPP-test en dat leidt tot relatief hoge gemiddelde aantallen (respectievelijk  $2,2 \times 10^3$  en  $1,7 \times 10^5$  kve cm<sup>-2</sup>; Tabel 2). Het toevoegen van *P. aeruginosa* in de BPP-test van de verschillende materialen op dag 126 leidt niet tot verhoogde aantallen van *P. aeruginosa* bij de onderzochte materialen (inclusief PVC-P; Tabel 2). Het verschil in aantallen *P. aeruginosa* op PVC-P tussen toevoeging op dag 0 of dag 126 komt doordat zich na 126 dagen in de BPP-test een natuurlijke biofilm op PVC-P heeft ontwikkeld. Deze natuurlijke biofilm voorkomt waarschijnlijk dat *P. aeruginosa* zich op het materiaal kan vestigen en vermeerderen. *P. aeruginosa* lijkt dus een initiële kolonist te zijn wanneer nieuw



Figuur 1. De aantallen *Legionella pneumophila* in de biofilm op verschillende materialen bepaald na 24, 28 en 32 weken in de BPP-test. *L. pneumophila* is daarbij aan ieder materiaal toegevoegd na 16 weken incubatie in de BPP test.

EPDM of PVC-P materialen in contact komen met drinkwater, maar dat in de tijd het organisme moeite heeft om zich te handhaven in de biofilm. Over het algemeen lijken de onderzochte materialen geen verhoogd risico te geven voor groei van *P. aeruginosa* in het distributiesysteem en/of drinkwaterinstallatie.

## GROEI VAN ASPERGILLUS FUMIGATUS

De groei van *A. fumigatus* wordt door alle materialen bevorderd wanneer *A. fumigatus* op dag 0 is toegevoegd aan de materialen in de BPP test (Tabel 2). De gemiddelde *A. fumigatus* aantallen zijn het laagst voor glas ( $1,8 \times 10^3$  genkopieën  $\text{cm}^{-2}$ ) en het hoogst voor PVC-P ( $2,2 \times 10^5$  genkopieën  $\text{cm}^{-2}$ ). De gemiddelde *A. fumigatus* aantallen van de overige materialen zijn 1,5 tot 5 keer verhoogd ten opzichte van glas. Alle onderzochte materialen bevorderen ook groei van *A. fumigatus* wanneer het organisme op dag 126 is toegevoegd aan de BPP-test. De gemiddelde aantallen *A. fumigatus* zijn daarbij voor de meeste materialen hoger dan wanneer *A. fumigatus* op dag 0 aan de BPP-test is toegevoegd (Tabel 2). Het is onduidelijk waar deze verhoogde aantallen door worden veroorzaakt. Mogelijk dat de meer volwassen biofilm die op dag 126 aanwezig is op de materialen hogere concentraties en meer verschillende extracellulaire polymere verbindingen (EPS) bevat, die als substraat voor groei van *A. fumigatus* kunnen dienen [8]. Een uitzondering op de hogere *A. fumigatus* aantallen die zijn waargenomen na toevoeging op dag 126 versus dag 0 is PVC-P. De *A. fumigatus* aantallen op PVC-P zijn 28,6 keer lager wanneer *A. fumigatus* op dag 126 in plaats van dag 0 is toegevoegd. Dit laat zien dat andere niet-materiaal gerelateerde condities de groei van *A. fumigatus* ook beïnvloeden. De gemiddelde *A. fumigatus* aantallen zijn voor de meeste leidingmaterialen (met uitzondering van PVC-P) verhoogd ten opzichte van glas wanneer *A. fumigatus* op dag 126 aan de BPP test is toegevoegd (Tabel 2). Uit de resultaten wordt geconcludeerd dat de onderzochte leidingmaterialen de groei van *A. fumigatus* verhogen in vergelijking met een inert materiaal als glas.

## GROEI VAN MYCOBACTERIUM KANSASII

De groei van *M. kansasii* op materialen in contact met drinkwater is alleen bestudeerd nadat het organisme op dag 126 is toegevoegd aan de materialen in de BPP test. De gemiddelde *M. kansasii* aantallen op glas zijn 613 genkopieën  $\text{cm}^{-2}$  (Tabel 2), wat laat zien dat *M. kansasii* zich in de biofilm op het glasoppervlak weet te vermeerderen door opname van nutriënten die in het drinkwater aanwezig zijn. De *M. kansasii*

Materiaal	<i>P. aeruginosa</i>		<i>A. fumigatus</i>		<i>M. kansasii</i>
	Op dag 0	Na 126 dagen	Op dag 0	Na 126 dagen	Na 126 dagen
Glas	0,4	1,3	$1,8 \times 10^3$	$7,4 \times 10^4$	613
Koper	< 0,1	NBa	$5,2 \times 10^3$	NB	NB
RVS	0,3	NB	$3,5 \times 10^3$	NB	NB
PVC-C	1,6	1,4	$5,1 \times 10^3$	$1,2 \times 10^5$	600
PE-Xa	0,9	NB	$5,4 \times 10^3$	NB	NB
PE-Xc	0,2	NB	$3,4 \times 10^3$	NB	NB
PE-100	0,3	1,6	$4,7 \times 10^3$	$1,5 \times 10^5$	1004
PE-80	NB	4,4	NB	$1,1 \times 10^5$	1774
PE-40	0,3	1,4	$2,6 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5$	735
EPDM	$2,2 \times 10^3$	NB	$3,7 \times 10^3$	NB	NB
PVC-P	$1,7 \times 10^5$	0,1	$2,2 \times 10^5$	$7,7 \times 10^3$	114

Tabel 2. Geometrisch gemiddelde van *P. aeruginosa* ( $\text{kve cm}^{-2}$ ), *A. fumigatus* (genkopieën  $\text{cm}^{-2}$ ) en *M. kansasii* (genkopieën  $\text{cm}^{-2}$ ) bepaald 8, 12 en 16 weken nadat ieder organisme was toegevoegd op dag 0 of na 126 dagen in de BPP test met verschillende materialen a NB: niet bepaald.

aantallen in de biofilm op PVC-C zijn vergelijkbaar met glas, dus PVC-C bevordert de groei van *M. kansasii* niet. De gemiddelde *M. kansasii* aantallen op PE-40, PE-80 en PE-100 zijn 1,2 tot 2,9 keer hoger dan op glas (Tabel 2). De groei van *M. kansasii* op PVC-P is lager dan op glas, hoewel voor PVC-P de hoogste totale microbiële biomassa (ATP) is waargenomen. PVC-P bevat dus in vergelijking met de andere materialen hogere concentraties aan groeibevorderende stoffen. Het is mogelijk dat deze stoffen niet door *M. kansasii* kunnen worden afgebroken of dat het organisme minder goed is aangepast aan dergelijke hoge concentraties, waardoor andere organismen *M. kansasii* weg concurreren. Uit de resultaten wordt geconcludeerd dat de geteste PE-materialen het risico op groei van *M. kansasii* in het drinkwatersysteem kunnen verhogen.

## CONCLUSIES

- De geteste PE-Xb, PE-Xc, PE-100 en PVC-P bevorderen de groei van *L. pneumophila* in het distributiesysteem en drinkwaterinstallatie wanneer de overige condities (bv temperatuur) gunstig zijn voor groei van *L. pneumophila*, terwijl koper en PVC-C de groei van *L. pneumophila* niet bevorderen;
- De geteste leidingmaterialen bevorderen niet de groei van *P. aeruginosa* in het distributiesysteem en drinkwaterinstallatie;
- De geteste leidingmaterialen verhogen de groei van *A. fumigatus* in vergelijking met een inert materiaal zoals glas. De mate waarin de groei van *A. fumigatus* wordt verhoogd is echter onafhankelijk van het leidingmateriaaltype (koper, RVS, PE-Xa, PE-Xc, PE-100, PE-40 en EPDM);
- De geteste PE-40, PE-80 en PE-100 bevoe-

ren de groei van *M. kansasii* in het distributiesysteem en drinkwaterinstallatie wanneer de overige condities gunstig zijn voor groei van *M. kansasii*, terwijl PVC-C en PVC-P de groei van *M. kansasii* niet bevorderen;

- Gebaseerd op het voorzorgprincipe en de waargenomen verhoogde groei van *L. pneumophila* en/of *M. kansasii* op PE-materialen, EPDM en PVC-P wordt aangeraden om het gebruik van PE-gebaseerde leidingmaterialen, EPDM en PVC-P in het distributiesysteem en drinkwaterinstallatie zoveel mogelijk te beperken.
- De Nederlandse overheid zou een belangrijke rol kunnen nemen in dit voorzorgprincipe door alleen leidingmaterialen toe te laten die niet de groei van *L. pneumophila* bevorderen.

## DANKWOORD

Dit werk is gefinancierd door het gezamenlijk bedrijfstakonderzoek (BTO) van de Nederlandse drinkwaterbedrijven.

## BRONNEN

1. Edberg SC, Gallo P, Kontnick C. 1996.
2. Falkinham JO, 3rd, Norton CD, LeChevallier MW. 2001.
3. Lawrence C, Reyrolle M, Dubrou S, Forey F, Decludt B, Goulvestre C, Matsiota-Bernard P, Etienne J, Nauciel C. 1999.
4. van der Wielen PW, van der Kooij D. 2013.
5. Hamsch B, Ashworth J, van der Kooij D. 2014.
6. van der Kooij D, Veenendaal HR, Scheffer WJ. 2005.
7. Van der Kooij D. 2014. Legionella in drinking-water supplies, p 127-175.
8. Rhodes JC. 2006. *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. *Med Mycol* 44:S77-S81.