

## Legionellagroeiopotentie van (leidingmaterialen in contact met) geremineraliseerd RO-water

Kimberly Learbuch en Paul van der Wielen (KWR), Maarten Lut (Oasen), Gang Liu (Chinese Academy of Science), Hauke Smidt (Wageningen University & Research)

**Onderzoek in een proefinstallatie liet zien dat grondwater dat is behandeld met omgekeerde osmose (RO) en vervolgens geremineraliseerd, nauwelijks groei van *Legionella pneumophila* veroorzaakt. Uit bepaalde leidingmaterialen kunnen echter stoffen vrijkomen die de groei van *L. pneumophila* wel weer kunnen bevorderen. Distributie van geremineraliseerd RO-water naar klanten van Oasen zal dus tot lagere legionella-aantallen in drinkwaterinstallaties leiden, mits leidingmaterialen worden toegepast die de groei van *L. pneumophila* niet bevorderen.**

Nederland is een van de weinige landen waar drinkwater wordt geleverd zonder chloor. Om groei van micro-organismen in het drinkwaterdistributiesysteem te voorkomen wordt de hoeveelheid biologisch afbreekbare stoffen beperkt [1]. Biologisch afbreekbare stoffen kunnen afkomstig zijn uit de bron van het water, maar ook van de materialen die worden gebruikt in het distributiesysteem of de binneninstallatie [2]. Ondanks de productie van drinkwater zonder veel biologisch afbreekbare stoffen en een beperking op het gebruik van groeibevorderende materialen, kan het toch voorkomen dat (biofilm)groei optreedt in het distributiesysteem [3]. De biofilm die aanwezig is in het distributiesysteem of de drinkwaterinstallatie kan een negatieve invloed hebben op de waterkwaliteit, door bijvoorbeeld groei van de bacterie *Legionella pneumophila* in de biofilm [1]. *L. pneumophila* is de voornaamste veroorzaker van legionellapneumonie ('veteranenziekte') en kan zich vermeerderen (in water) bij temperaturen tussen de 30 en 42°C [4]. In drinkwaterbiofilms groeit *L. pneumophila* alleen in aanwezigheid van bepaalde vrijlevende protozoasoorten (eencellige dierlijke organismen) [5]. Vrijlevende protozoa voeden zich in het drinkwaterdistributiesysteem met bacteriën die groeien in de biofilm. Bij opname door een gastheerprotozo wordt *L. pneumophila* niet verteerd, maar vermeerdert zich in deze protozo. Hierdoor raakt de protozo zo vol met *L. pneumophila*-cellen dat de protozocel op een gegeven moment knapt en de *L. pneumophila*-cellen vrijkomen in het watersysteem. Vervolgens kunnen deze vrijgekomen *L. pneumophila*-cellen weer worden opgenomen door andere gastheerprotozoa, waarna de cyclus zich herhaalt.

Recent onderzoek heeft een relatie aangetoond tussen de hoeveelheid biofilm en aantallen *L. pneumophila* in een drinkwatertestsysteem [4]. In dezelfde studie is ook aangetoond dat deze biofilmconcentratie afhankelijk is van de hoeveelheid gemakkelijk assimileerbaar organisch koolstof (AOC) in het drinkwater.

Drinkwater wordt in Nederland bereid uit oppervlaktewater of grondwater, dat met diverse zuiveringsprocessen wordt behandeld om drinkwater te produceren met een hoge mate van biologische stabiliteit. Eén relatief nieuw zuiveringsproces is membraanfiltratie met omgekeerde osmose (reverse osmosis, RO). RO verwijdert bijna alle ionen en organisch materiaal uit het water en dit resulteert in drinkwater met lage AOC-concentraties (<1 µg C/l) [6].

## Drinkwater behandelen met RO

Drinkwaterbedrijf Oasen wil het water met RO gaan behandelen. Omdat in het Drinkwaterbesluit ook minimumgehalten (bijvoorbeeld voor de hardheid) worden aangegeven, moet het water vervolgens worden geremineriseerd door filtratie over calciet, waardoor het calcium- en waterstofcarbonaatgehalte toenemen. Daarnaast wordt er magnesiumchloride gedoseerd, voordat het kan worden gedistribueerd naar de klanten.

Groeibevorderende stoffen voor micro-organismen kunnen niet alleen uit de bronnen voor drinkwater komen, maar ook uit leidingmaterialen die in het distributiesysteem en drinkwaterinstallatie worden gebruikt. Dit leidt tot biofilmvorming op de buiswand [7], [8]. Eerdere experimenten hebben laten zien dat deze biofilmvorming ook kan leiden tot vermeerdering van *L. pneumophila* wanneer het leidingmateriaal in contact staat met drinkwater, bereid uit grondwater dat is behandeld met een klassieke zuivering (beluchting en snelfiltratie) [9], [10], [11]. Het is echter onduidelijk in hoeverre leidingmateriaal groei van *L. pneumophila* kan veroorzaken wanneer het in contact staat met geremineriseerd RO-water. Het doel van de hier beschreven studie was om de legionellagroei-potentie (LGP) te onderzoeken van RO- en geremineriseerd RO-water en deze te vergelijken met drinkwater bereid met een conventionele grondwaterzuivering. Daarnaast is ook onderzocht wat de LGP is van leidingmaterialen wanneer deze in contact staan met geremineriseerd RO-water.

## Resultaten

### ***Legionellagroei-potentie (geremineriseerd) RO-water en conventioneel behandeld grondwater***

De LGP werd bepaald in de Boiler Biofilm Monitor (BBM). Dit testsysteem bootst een drinkwaterinstallatie na door water met een temperatuur van 38°C periodiek door een biofilmmonitor te laten stromen. Dit werd toegepast op RO-water en geremineriseerd RO-water, geproduceerd in de proefinstallatie van zuiveringsstation Kamerik. De resultaten werden vervolgens vergeleken met het reinwater dat werd geproduceerd met de conventionele grondwaterzuivering op Kamerik. De BBM bevat een boiler (30 liter) die drie keer per uur gedurende 20 seconden de biofilmmonitoren doorspoelt met 1,5 tot 2 liter van het te onderzoeken (drink)water, waarbij het water door menging van koud en warm (70°C) water een temperatuur heeft van 38°C. De biofilmmonitoren zijn gevuld met glazen ringen en geplaatst in een kast, waarin de temperatuur op 38°C wordt gehandhaafd en toetreding van licht werd verhinderd. Er werden ringen gebruikt van een inert materiaal (glas) zodat het materiaal geen invloed heeft op de uitkomsten. Ongeveer twee weken na het opstarten werd de BBM geïnoculeerd met *L. pneumophila*.

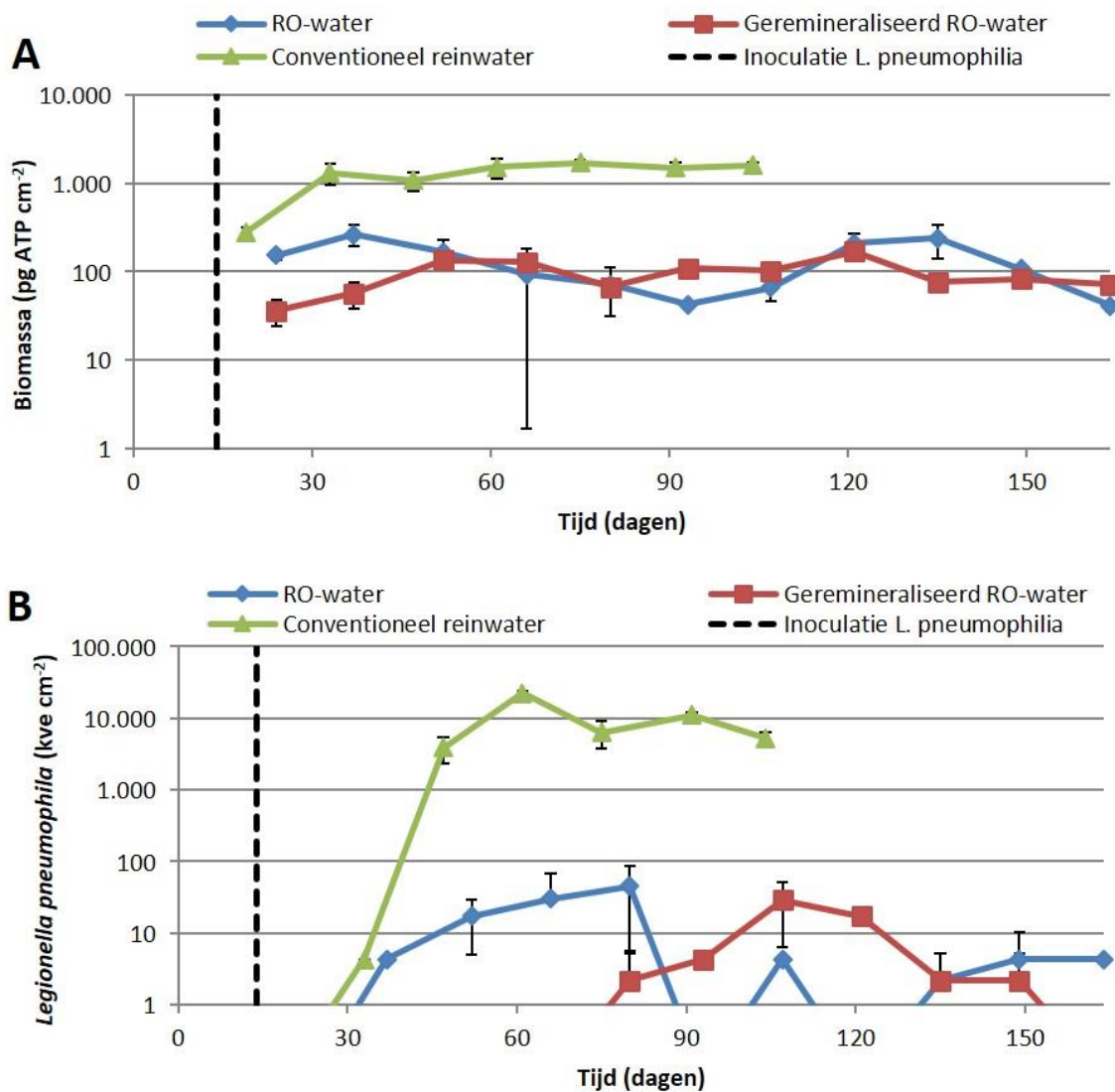
Als maat voor de hoeveelheid actieve microbiële biomassa werd de Adenosinetrifosfaat (ATP)-concentratie in de biofilm bepaald. Op de glazen ringen van de BBM die werd gevoed met conventioneel geproduceerd reinwater steeg de ATP-concentratie tot een maximum van 1700 pg (picogram,  $10^{-12}$ g) ATP/cm<sup>2</sup> op dag 75, waarna hij stabiel bleef tot het einde van het experiment (dag 104) (afbeelding 1A). De ATP-concentraties op de glazen ringen van de BBM die gevoed werd met RO-water en geremineriseerd RO-water stegen tot een maximum van 150 pg ATP/cm<sup>2</sup>, duidelijk lager dan die van het huidige reinwater. Er werd geen duidelijk verschil waargenomen tussen de ATP-concentraties in de biofilm gevoed met RO-water en die met geremineriseerd RO-water. Het remineralisatieproces lijkt dus geen groeibevorderend effect op de biofilm te hebben. De biofilmvormingspotentie (BVP) van de verschillende watertypes werd eveneens bepaald. De BVP van

het conventioneel reinwater was 1542 pg ATP/cm<sup>2</sup>, terwijl de BVPs van RO-water en geremineriseerd RO-water respectievelijk 238 en 133 pg ATP/cm<sup>2</sup> waren (afbeelding 2A). De BVP van RO-water en geremineriseerd RO-water waren dus onderling vergelijkbaar, maar ruim 10 keer lager dan de BVP van het reinwater.

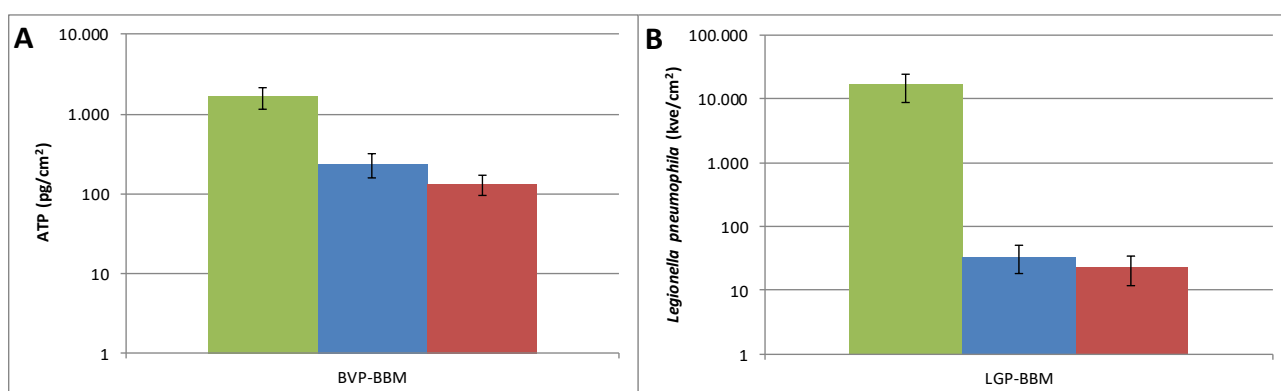
Na inoculatie met een stukje siliconenslang, waarop *L. pneumophila* was gegroeid, kon uit het water van alle drie de BBM's *L. pneumophila* worden gekweekt in aantallen variërend tussen 200 en 1000 kolonievormende eenheden (kve) per liter. De aantallen *L. pneumophila* in de biofilm op de glazen ringen van de met conventioneel reinwater gevoede BBM bereikten een maximum van ca. 20.000 kve/cm<sup>2</sup> op dag 61, waarna de *L. pneumophila*-aantallen stabiliseerden rond 10.000 kve/cm<sup>2</sup> tot het einde van het experiment (afbeelding 1B).

De aantallen *L. pneumophila* in de biofilm op de glazen ringen van de BBM gevoed met RO-water en geremineriseerd RO-water stegen tot respectievelijk 45 kve/cm<sup>2</sup> op dag 80 en 107 kve/cm<sup>2</sup> op dag 107. Vervolgens daalden de aantallen voor beide watertypen tot rond de detectielimiet van 4,3 kve/cm<sup>2</sup>.

De LGP van de drie verschillende watertypes werd ook bepaald. De LGP van het conventioneel reinwater was 16.601 kve/cm<sup>2</sup>, terwijl de LGP van RO-water en geremineriseerd RO-water respectievelijk 34 en 23 kve/cm<sup>2</sup> waren (afbeelding 2B). De LGP van RO-water en geremineriseerd RO-water waren dus vergelijkbaar, maar ongeveer drie log-eenheden lager dan de LGP van het reinwater.



Afbeelding 1. A) De ATP-concentratie en B) het aantal kolonievormende eenheden (kve) *L. pneumophila* op de glazen ringen uit de BBM, gevoed met de drie verschillende watertypes: conventioneel drinkwater (groen), RO-water (blauw) en geremineriseerd RO-water (rood)



Afbeelding 2. A) De biofilmvormingspotentie (BVP) en de legionellagroei-potentie (LGP) van conventioneel drinkwater (groen), RO-water (blauw) en geremineriseerd RO-water (rood) bepaald met de BBM

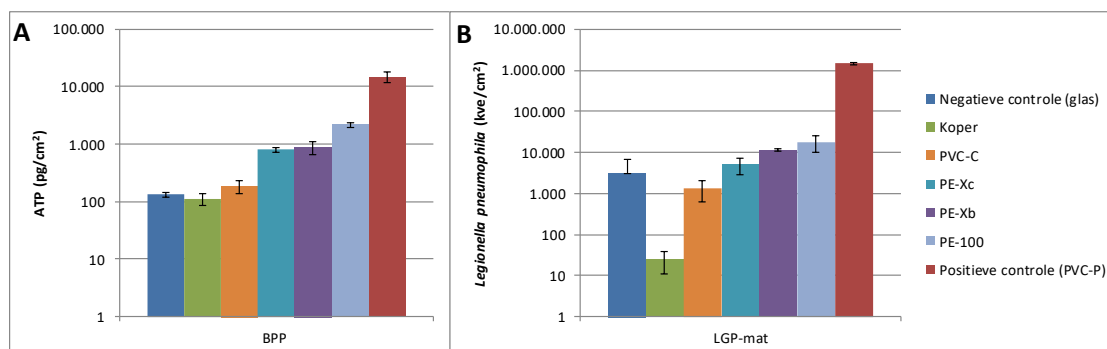
### Legionellagroeiopotentie van leidingmaterialen in contact met geremineraliseerd RO-water

De LGP van zes verschillende leidingmaterialen (koper, PE-Xb, PE-Xc, PVC-C, PE-100 en PVC-P) in contact met geremineraliseerd RO-water werd onderzocht in de biomassa-productiepotentietest (BPP) voor materialen [12], [13]. De zes onderzochte materialen worden veelvuldig gebruikt in drinkwaterinstallaties of in het drinkwaterdistributiesysteem. Naast deze zes materialen werd ook glas als negatief controlemateriaal onderzocht, terwijl PVC-P ook diende als positieve controle. Glas is een negatieve controle omdat het een inert materiaal is, want het geeft geen voedingsstoffen af. PVC-P is daarentegen een positieve controle omdat het in vergelijking met andere materialen veel groeibevorderende stoffen bevat. Daarnaast wordt PVC-P ook toegepast in drinkwaterinstallaties, bijvoorbeeld douche- en tuinslangen. In deze BPP-test wordt de BPP van de materialen bepaald door 150 cm<sup>2</sup> materiaal gedurende 32 weken te incuberen in 900 ml geremineraliseerd RO-water bij 30°C. Iedere week wordt het geremineraliseerde RO-water ververs.

Gedurende 16 weken ontwikkelde zich een natuurlijke biofilm op de zeven materialen, waarna *L. pneumophila* aan de monsterflessen werd toegevoegd. In de volgende 16 weken werden op drie momenten water en materialen uitgenomen voor analyse van ATP en *L. pneumophila*. De resultaten van de analyses werden gebruikt om de BPP en LGP [14] van de geteste leidingmaterialen te berekenen.

De leidingmaterialen koper en PVC-C hadden de laagste BPP-waarden (<200 pg ATP/cm<sup>2</sup>), PE-Xb, PE-Xc en PE-100 hadden hogere BPP-waarden (880, 794 en 2.204 pg ATP/cm<sup>2</sup> respectievelijk), terwijl het leidingmateriaal PVC-P de hoogste BPP had (14.885 pg ATP/cm<sup>2</sup>) (afbeelding 3A). De gevonden BPP-waarden voor de verschillende materialen in contact met geremineraliseerd RO-water zijn vergelijkbaar met BPP-waarden die eerder werden gevonden met conventioneel drinkwater [15], [16]. De zeer lage concentratie afbreekbare stoffen in het geremineraliseerde RO-water lijkt dus weinig invloed te hebben op de mate van biofilmvorming op leidingmaterialen. Hieruit wordt geconcludeerd dat de biofilmvorming op de meeste leidingmaterialen wordt veroorzaakt door de biologisch afbreekbare stoffen die uitlogen uit het materiaal.

De LGP van elk materiaal werd berekend door het gemiddelde te nemen van de gemeten aantallen *L. pneumophila* in de biofilm van week 24, 28 en 32. De LGP van koper was het laagst (25 kve/cm<sup>2</sup>) en PVC-P had de hoogste concentratie (1,4 x 10<sup>6</sup> kve/cm<sup>2</sup>) (afbeelding 3B). De materialen PVC-C, glas en PE-Xc hadden een LGP die varieerde van 1359 tot 5065 kve/cm<sup>2</sup> respectievelijk. PE-Xb en PE-100 hadden ongeveer een vijf keer hogere LGP (11.377 en 18.140 kve/cm<sup>2</sup>, respectievelijk) dan PVC-C, glas en PE-Xc.



Afbeelding 3. A) De biomassa-productiepotentie (BPP) en B) de legionellagroei-potentie (LGP) van de onderzochte leidingmaterialen in contact met geremineeraliseerd RO-water

### Conclusie

Het drinkwater geproduceerd met de conventionele grondwaterzuivering (beluchting en snelfiltratie) van zuiveringsstation Kamerik heeft een relatief hoge legionellagroei-potentie. In de drinkwaterinstallatie van een gebouw kan dit conventioneel drinkwater dus groei van *L. pneumophila* veroorzaken, ongeacht van welk materiaal de leidingen in de drinkwaterinstallatie zijn gemaakt. Het RO-water en geremineeraliseerd RO-water hebben daarentegen een zeer lage legionellagroei-potentie. In een drinkwaterinstallatie veroorzaken deze watertypen dus (vrijwel) geen groei van *L. pneumophila*. Het geremineeraliseerde RO-water voorkomt echter niet dat *L. pneumophila* zich kan vermeerderen in de biofilm op PE-leidingmaterialen in drinkwaterinstallaties. Wanneer het geremineeraliseerde RO-water, dat is geproduceerd met de proefinstallatie op zuiveringsstation Kamerik, wordt geleverd aan een drinkwaterinstallatie met leidingmaterialen die een lage groei-potentie hebben (koper, PVC-C), dan zal er nauwelijks of geen groei van *L. pneumophila* optreden in de drinkwaterinstallatie. Wanneer het geremineeraliseerde drinkwater echter wordt geleverd aan een drinkwaterinstallatie met leidingmaterialen die een relatief hoge groei-potentie hebben (PE-X of PVC-P) dan kan groei van *L. pneumophila* nog steeds optreden.

### Vervolgonderzoek/aanbevelingen

Aangezien de metingen zijn uitgevoerd met een proefinstallatie wordt aanbevolen metingen met BBM te herhalen op het reinwater, in het distributiesysteem en op locatie wanneer deze volledig zijn overgeschakeld naar full-scale geremineeraliseerd RO water.

Om de legionellagroei-potentie in drinkwaterinstallaties te verlagen wordt aanbevolen om het gebruik van materialen met een relatief hoge LGP (PE-X en PVC-P) zoveel mogelijk te beperken.

### Referenties

1. Kooij, D. van der, Veenendaal, H.R., Vrouwenvelder, J.S. (2003). 'Elucidation and control of biofilm formation processes in water treatment and distribution using the unified biofilm approach'. *Water Sci. Technol.* 47 (5), 83-90.
2. Escobar, I.C., Randall, A.A., Taylor, J.S. (2001). 'Bacterial growth in distribution systems: effect of assimilable organic carbon and biodegradable dissolved organic carbon'. *Environ. Sci. Technol.* 35 (17), 3442-3447.
3. Rittmann, B.E., Snoeyink, V.L. (1984). 'Achieving biologically stable water. *J. AWWA (Am. Water Works Assoc.)* 76 (10), 106-114.

4. Kooij, D. van der, Bakker, G.L., Italiaander, R., Veenendaal, H.R., & Wullings, B.A. (2017). 'Biofilm composition and threshold concentration for growth of legionella pneumophila on surfaces exposed to flowing warm tap water without disinfectant'. *Applied and Environmental Microbiology, AEM*. 02737-02716.
5. Kuiper, M.W., Wullings, B.A., Akkermans, A.D.L., Beumer, R.R., Kooij, D. van der (2004). 'Intracellular Proliferation of Legionella pneumophila in Hartmannella vermiformis in Aquatic Biofilms Grown on Plasticized Polyvinyl Chloride'. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (11), 6826-6833.
6. Gagliardo, P., Adham, S., Trussell, R., Olivieri, A. (1998). 'Water repurification via reverse osmosis'. *Desalination* 117 (1), 73-78.
7. Kooij, D. van der, Lieverloo, J. H. M. van, Shellart, J. Hiemstra, J. (1999). 'Maintaining quality without a disinfectant residual'. *J. AWWA* 91(1), 55-64.
8. Hamsch, B., J. Ashworth, Kooij, D. van der (2014). 'Enhancement of microbial growth by materials in contact with drinking water: problems and test methods' in *Microbial Growth in Drinking-Water Supplies. Problems, Causes, Control and Research Needs*, edited by D. van der Kooij and P. W. J. J. van der Wielen, pp. 339-361, IWA Publishing, London.
9. Kooij, D. van der, Veenendaal, H.R. Slaats, N. P. G., Vonk, D. (2002). 'Biofilm formation and multiplication of Legionella on synthetic pipe materials in contact with treated water under static and dynamic conditions' in *Legionella*, edited by R. Marre, Y. Abu Kwaik, C. Bartlett, N. P. Cianciotto, B. S. Fields, M. Frosch, J. Hacker and P. C. Luck, pp. 176-180, ASM Press, Washington, D.C.
10. Kooij, D. van der, Veenendaal, H.R., Scheffer, W.J. (2005). 'Biofilm formation and multiplication of Legionella in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene'. *Water Res* 39(13), 2789-2798.
11. Kooij, D. van der & Veenendaal, H. R. (2008). *Foundation of pass-fail criteria for the biomass production potential of materials in contact with treated water intended for human consumption*. (Vol. KWR 07.100). Nieuwegein: KWR.
12. Kooij, D. van der, Veenendaal, H.R. (2001). 'Biomass production potential of materials in contact with drinking water: method and practical importance'. *Water Sci. Technol. Water Supply* 1 (3), 39e45.
13. NEN-EN16421:2014 Influence of materials on water for human consumption - Enhancement of microbial growth (EMG).
14. Learbuch, K. L. G., Lut, M. C., Liu, G., Smidt, H., & Wielen, P. W. J. J. van der (2019). 'Legionella growth potential of drinking water produced by a reverse osmosis pilot plant.' *Water research* 157, 55-63.
15. Kooij, D. van der & Veenendaal, H. R. (2011). *Bepaling en beoordeling van de legionellagroei-potentie van drinkwater* (Vol. BTO 2011.037). Nieuwegein: KWR.
16. Kooij, D. van der, Veenendaal, H.R. (2014). 'Regrowth problems and biological stability assessment in The Netherlands'. In: van der Kooij, D., van der Wielen, P.W.J.J. (Eds.), *Microbial Growth in Drinking Water Supplies: Problems, Causes, Control and Research Needs*. IWA Publishing, London, United Kingdom, pp. 291-337.